

CHRISTOPHE LE LAY

**MISE EN ÉVIDENCE ET CARACTÉRISATION
IN VITRO DE L'ACTIVITÉ ANTIFONGIQUE DE
LA NISINE Z, UNE BACTÉRIOCINE PRODUITE
PAR *LACTOCOCCUS LACTIS* SSP. *LACTIS* BIOVAR
DIACETYLLACTIS UL719, SUR *CANDIDA ALBICANS***

Mémoire présenté
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de maîtrise en Sciences et Technologie des Aliments
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

DÉPARTEMENT DES SCIENCES DES ALIMENTS ET DE NUTRITION
FACULTÉ DES SCIENCES DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

© Christophe Le Lay, 2009

RÉSUMÉ

Candida albicans est l'espèce la plus communément identifiée dans les pathologies fongiques buccales. Les traitements des infections à *C. albicans* se font par le biais d'antifongiques. L'efficacité des antifongiques est cependant limitée aux formes prolifératives et non aux formes stationnaires de *C. albicans*. De plus, plusieurs cas de résistance de *C. albicans* aux antifongiques ont été rapportés. Par conséquent, trouver une nouvelle molécule antifongique a toute son importance pour le traitement des cas de candidoses. Le but de cette étude est d'évaluer l'activité fongicide de la nisine Z. Pour ce faire, nous avons analysé l'effet de la nisine sur l'inhibition de *C. albicans* en utilisant la méthode de l' "Alamar blue". L'efficacité de la nisine Z, à bloquer la transformation de *C. albicans* de la forme blastospore à la forme hyphe (plus virulente), a été évaluée par observation microscopique et par dénombrement des différentes formes. Nos résultats montrent que la nisine Z inhibe la croissance de *C. albicans* avec des pourcentages d'inhibition de 70, 63 et 53 % pour des concentrations respectives de 1000, 500 et 100 µg/ml. Cependant, seule la concentration de 1000 µg/ml permet de réduire de 45 % la transformation de *C. albicans* par rapport au contrôle. Ces résultats sont confirmés par l'observation microscopique. En conclusion, la nisine Z réduit la prolifération et la transformation de *C. albicans*, suggérant sa potentielle utilisation pour le traitement des candidoses.

AVANT-PROPOS

Ce mémoire comporte tout d'abord une introduction générale présentant la problématique, l'hypothèse et les objectifs de cette étude. Le premier chapitre correspond à la revue de littérature. Le second, sous forme d'article scientifique, porte sur le travail expérimental et sur les résultats obtenus lors de cette étude. Finalement, une discussion générale suivie d'une conclusion incluant des perspectives d'avenir y sont présentées.

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement le Dr Fliss, mon directeur de recherche, et lui exprimer ma plus sincère gratitude pour son soutien, sa présence, ses encouragements et sa confiance au cours de ces années. Je suis heureux de faire parti de l'équipe et de bénéficier de ses connaissances et de son expertise scientifique.

Je tiens également à remercier le Dr Rouabhia, mon co-directeur, pour son expertise, sa confiance et son soutien au cours de ce projet. J'ai apprécié l'apport des connaissances au niveau du domaine de la médecine dentaire qui était un monde inconnu au début du projet.

Merci à l'appui financier du conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), de l'institut de recherche en santé du Canada (IRSC), de la faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation de l'université Laval (FSAA, département des aliments et de nutrition) et de l'institut des nutraceutiques et des aliments fonctionnels (INAF) et du groupe de recherche en écologie buccale (GREB).

Je remercie tout mes amis (Élise, Arnaud, Alice, Gilles, Guillaume, David, Iraz, Marie-Hélène et les autres...) pour votre soutien et votre présence. Une attention spéciale pour le Dr Ehab Kheadr, qui m'a donné le goût pour la recherche. Merci à toute l'équipe du laboratoire et merci Boris pour ton aide sur le projet.

Je remercie tout spécialement mes parents, Brigitte et Jean-François, mes grand-parents, Jeanine et Gabriel, ainsi que le reste de ma famille pour tout leur soutien et cela malgré la grande distance nous séparant. Ils m'ont toujours encouragé à aller jusqu'au bout de mes

rêves. Je leur serai toujours infiniment reconnaissant pour m'avoir permis de réaliser cette étape de ma vie et de m'y épanouir.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	I
AVANT-PROPOS.....	II
TABLE DES MATIÈRES.....	IV
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS	VII
INTRODUCTION GÉNÉRALE	8
CHAPITRE 1 :	10
REVUE DE LITTÉRATURE.....	10
1.1. LES CANDIDOSES	11
1.1.1. Épidémiologie.....	11
1.1.2. Classification	12
1.2. CANDIDA ALBICANS	15
1.2.1. Description générale.....	15
1.2.2. Le commensalisme	15
1.2.3. Le polymorphisme	15
1.2.4. La pathogénicité.....	17
1.2.4.1. <i>Variabilité structurale</i>	18
1.2.4.1.1. Variabilité génétique.....	18
1.2.4.1.2. Variabilité morphologique.....	19
1.2.4.2. <i>Facteurs sécrétés ou expression potentialisant la virulence</i>	19
1.2.4.2.1. Les protéinases.....	19
1.2.4.2.2. Les phospholipases	20
1.3. LES MOLÉCULES ANTIFONGIQUES	21
1.3.1. Les polyènes	21
1.3.2. Les pyrimidines.....	22
1.3.3. Les dérivés azolés	23
1.3.4. Les échinocandines	26
1.4. DÉVELOPPEMENT DE RÉSISTANCES AUX MOLÉCULES ANTIFONGIQUES	28
1.4.1. La résistance aux polyènes	28
1.4.2. La résistance aux pyrimidines.....	28
1.4.3. La résistance aux dérivés azolés	29
1.4.3.1. <i>Diminution de l'accumulation intracellulaire des dérivés azolés</i>	29
1.4.3.2. <i>Altération de la composition en stérols de la membrane</i>	29
1.4.3.3. <i>Altération ou surproduction de la cible enzymatique des dérivés azolés</i>	30
1.4.4. La résistance aux échinocandines	30
1.5. LES BACTÉRIOCINES	31
1.5.1. Généralités	31
1.5.1.1. <i>Définition</i>	31
1.5.1.2. <i>Classification</i>	32

1.5.1.3. Mécanisme de biosynthèse	33
1.5.1.4. Spectre d'inhibition et mode d'action	34
1.5.2. Nisine	36
1.5.2.1. Propriétés chimiques et moléculaires	36
1.5.2.2. Mode d'action	37
1.5.2.3. Biosynthèse	38
1.5.2.4. L'innocuité de la nisine	39
1.5.2.4.1. Données toxicologiques	40
1.5.2.4.1.1. Effets in vitro de la nisine	40
1.5.2.4.1.2. Toxicité aiguë	40
1.5.2.4.1.3. Toxicité chronique	40
1.5.3. Effets des bactériocines sur <i>Candida albicans</i>	42
1.6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	43
CHAPITRE 2 :	44
NISIN Z INHIBITS THE GROWTH OF <i>C. ALBICANS</i> AND ITS TRANSITION FROM BLASTOSPORE TO HYPHAL FORM.....	44
2.1. RÉSUMÉ	45
2.2. ABSTRACT	46
2.3. INTRODUCTION	47
2.4. EXPERIMENTAL PROCEDURE	48
2.4.1. Bacterial strains and growth media	48
2.4.2. <i>C. albicans</i> cultures	49
2.4.3. Nisin Z production and purification	49
2.4.4. Assessment of bacteriocin activity	50
2.4.5. Effect of nisin Z on <i>C. albicans</i> growth	51
2.4.6. Effect of nisin Z on <i>C. albicans</i> transition	52
2.4.7. Ultrastructural investigations	53
2.4.8. Statistical analysis	54
2.5. RESULTS	54
2.5.1. Nisin Z reduced <i>C. albicans</i> growth	54
2.5.2. Nisin Z-inhibited germ tube formation by <i>C. albicans</i>	55
2.5.3. Effect of nisin Z on <i>C. albicans</i> ultrastructure	55
2.6. DISCUSSION	56
2.7. ACKNOWLEDGMENTS	58
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE	65
CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES	69
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	71

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 : Nisin Z recovery following extraction and purification	59
--	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Les différentes morphologies de <i>C. albicans</i>	17
Figure 1.2 : Structures chimiques de polyènes	22
Figure 1.3 : Structure chimique du 5-FC	23
Figure 1.4 : Structures chimiques de dérivés azolés	24
Figure 1.5 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez les <i>Candida</i>	25
Figure 1.6 : Structures chimiques d'échinocandines	27
Figure 1.7 : Mode d'action des bactériocines sur la membrane cytoplasmique	35
Figure 1.8 : Structure de la nisine	37
Figure 2.1 : Later effect of nisin Z on <i>C.albicans</i> growth	60
Figure 2.2 : Early effect of nisin Z on <i>C. albicans</i> growth	61
Figure 2.3 : Effect of nisin Z on <i>C. albicans</i> yeast-to-hyphae transition	62
Figure 2.4 : Scanning electron micrographs of <i>C. albicans</i> with or without nisin Z	63
Figure 2.5 : Transmission electron micrographs of <i>C. albicans</i> with or without nisin Z	64

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	acide désoxyribonucléique
Ala	alanine
ANOVA	analyse de la variance
ARN	acide ribonucléique
Asn	asparagine
ATP	adénosine triphosphate
AU	arbitrary unit
CFU	colonie formant unité
Ctrl	control
Da	dalton
Dha	déhydroalanine
Dhb	déhydrobutyrine
FADH	flavin adenine dinucleotide
FBS	fetal bovine serum
FMNH	hydroflavin mononucleotide
FUMP	fluoro-uridine monophosphate
Gly	glycine
GRAS	generally recognized as safe
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
PBS	phosphate buffer saline
pH	potentiel d'hydrogène
Rpm	révolution par minute
SAP	secreted aspartyl proteinase
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
Tyr	tyrosine
UI	unité internationale
UMP	uracile monophosphate
Val	valine
VIH	virus d'immunodéficience humaine

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les pathologies fongiques touchant l'être humain sont aussi connues sous le nom de mycoses humaines. Celles-ci ont divers degrés de sévérité, allant d'infections superficielles et bénignes à des infections invasives et mortelles. Selon des études épidémiologiques menées dans plusieurs pays, leur incidence a augmenté au cours des deux dernières décennies (Banerjee *et al.*, 1991; Edmond *et al.*, 1999; Pfaller *et al.*, 2000). Cette hausse est, paradoxalement, attribuable aux progrès de la médecine moderne. En effet, l'augmentation de la survie de certaines populations de patients grandement immunodéprimés (cas de naissances prématurées, infectées par le virus de l'immunodéficience humaine ou les grands brûlés), le développement d'interventions médicales invasives et les traitements à l'aide d'antibiotiques à large spectre sont tous des avancées médicales ayant créées des classes de patients susceptibles de développer des mycoses.

Malgré l'existence d'une panoplie de molécules antifongiques, comme le fluconazole et l'amphotéricine B, visant le traitement des infections fongiques, peu d'entre elles sont utilisées aujourd'hui. En effet, l'utilisation de ces molécules chimiques en médecine humaine est limitée à cause de leur toxicité et des effets secondaires qu'elles engendrent (Georgopapadakou *et al.*, 1994). De plus, les faibles progrès réalisés dans le domaine des antifongiques limitent le développement de molécules efficaces et utilisables.

Depuis quelques années, les instances médicales rapportent l'émergence de souches résistantes à certaines molécules antifongiques. Cette résistance est attribuable principalement à l'utilisation abusive de ces substances antifongiques chez l'humain. Le développement de thérapies alternatives devient donc une priorité pour le secteur de la santé.

Parmi les alternatives envisageables, l'usage de bactériocines, des molécules considérées comme naturelles, non toxiques et possédant un large spectre d'action, pourrait représenter une solution prometteuse en remplacement des antifongiques traditionnels dans le

traitement de pathologies fongiques comme la candidose. Des études préliminaires, effectuées par des membres des équipes du Dr I. Fliss et du Dr M. Rouabhia (2003), ont montré que la nisine Z, bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719, a un effet d'inhibition envers certaines souches de *Candida*.

Le but de ce projet de maîtrise est d'évaluer le potentiel antifongique des bactériocines de bactéries lactiques, notamment la nisine Z, pour inhiber la croissance des souches de *Candida* utilisées comme modèle et qui sont largement incriminées dans les mycoses de type candidose. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la candidose qui est un regroupement d'infections fongiques pathologiques causées par des levures opportunistes appartenant au genre *Candida*. Ces infections peuvent être localisées sur différentes muqueuses, comme celles de la cavité buccale, de l'œsophage, du tractus gastro-intestinal ou du vagin, sur l'épiderme ainsi que sous les ongles (Mathews *et al.*, 2002). Plus précisément, notre étude touche aux candidoses orales, où l'espèce la plus communément incriminée dans ces infections est *Candida albicans*.

CHAPITRE 1 :
REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. LES CANDIDOSES

Le terme candidose est utilisé pour regrouper les infections fongiques causées par les espèces de levures dites opportunistes qui sont du genre *Candida*, dont l'espèce la plus communément isolée est *Candida albicans*. Il existe différents types de candidose : les candidoses digestives, qui regroupent les candidoses buccales, oropharyngées, oesophagiennes et gastro-intestinales, les candidoses vaginales, les candidoses cutanées et les onychomycoses (pathologies de l'ongle) (Odds, 1987; Jarvis, 1995; Elewski, 1998; Mathews *et al.*, 2002).

1.1.1. Épidémiologie

Les candidoses buccales occupent une place importante en pathologie ORL (Oto-Rhino-Laryngologie). La présence de *Candida* chez les individus sains et chez plusieurs groupes de patients a largement été rapportée (Odds, 1988). En effet, la cavité buccale de 31 à 55 % des sujets sains serait colonisée par des levures du genre *Candida* (Odds, 1988).

Les candidoses buccales sont fréquentes aux âges extrêmes de la vie. Chez le nouveau-né, l'immaturation du système immunitaire et le développement incomplet de la flore bactérienne expliqueraient une prévalence du muguet buccal de l'ordre de 5 à 7 % (Stamos *et al.*, 1995). Chez les sujets âgés, les patients édentés ou porteurs de prothèses dentaires sont particulièrement exposés. En effet, une mauvaise hygiène buccodentaire, un diabète mal contrôlé ainsi qu'une prise de médicaments associée à la sénescence sont souvent associés aux infections buccales (Jarvis, 1995; Maertens *et al.*, 2001).

Le déséquilibre de la flore intestinale consécutif à une antibiothérapie, ainsi que la diminution des sécrétions buccales (hyposialie) sont les principaux facteurs locaux qui favorisent la prolifération de *Candida* (Weesemayer *et al.*, 1987). La corticothérapie locale (traitement de l'asthme) joue également un rôle dans la prolifération de *Candida* (Weesemayer *et al.*, 1987). La candidose surviendrait en raison d'une diminution

quantitative et qualitative des sécrétions salivaires et du déficit fonctionnel des polynucléaires dont la capacité phagocytaire serait réduite. Les lésions épithéliales de la muqueuse (aphtose, mucite) sont fortement colonisées par les *Candida*. Le rôle du tabac est admis dans l'apparition des candidoses buccales, en raison des altérations de la muqueuse buccale chez les fumeurs (Weesemayer *et al.*, 1987).

Les patients présentant un cancer sont aussi sujets à ce type de candidose, en raison d'une part, de l'effondrement de leurs défenses et d'autre part, de la toxicité propre aux traitements contre le cancer (AbiSaid *et al.*, 1997). Les traitements immunosuppresseurs, notamment chez les patients transplantés, sont également incriminés. C'est essentiellement chez le groupe de patients atteints du Syndrome d'Immuno-Déficience Acquise (SIDA) que l'on observe une fréquence beaucoup plus importante d'individus porteurs. Les candidoses buccales touchent près de 95 % des individus atteints du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) (Mc Intyre, 2001).

1.1.2. Classification

On peut classer les candidoses en deux grands groupes : les candidoses superficielles et les candidoses profondes. Les candidoses superficielles, les infections à *Candida*, les plus fréquemment rencontrées traduisent le passage de l'état commensal à l'état pathogène des levures comme *C. albicans*; les candidoses buccales font parties de ce groupe. Les candidoses profondes et systémiques sont, respectivement, définies quand un organe profond est touché, quand il y a plusieurs sites profonds touchés ou lors d'une dissémination hématogène de *Candida*.

➤ *Candidose pseudomembraneuse aiguë et chronique (muguet aigu et chronique)*

La candidose pseudomembraneuse, appelée aussi muguet, est une maladie caractérisée par la présence d'un enduit blanchâtre ou blanc jaunâtre, évoquant le lait caillé et couvrant la muqueuse buccale, la langue, le palais, la gencive et l'oropharynx. Cet enduit (pseudomembrane) se détache facilement et laisse apparaître une muqueuse rouge érosive (Prescott *et al.*, 1995; Akpan *et al.*, 2002). Une candidose pseudomembraneuse chronique

est, quant à elle, une candidose pseudomembraneuse aiguë qui n'a pas été traitée et, dans ce cas, les enduits blanchâtres deviennent adhérents.

Les facteurs déclenchants la candidose pseudomembraneuse sont multiples et variés. Elle survient tant chez des patients qui sont aux âges extrêmes de la vie (nouveaux-nés, sujets âgés), qui souffrent de malnutrition, d'un déficit immunitaire, d'un diabète non insulino-dépendant ou qui sont soumis à la prise de corticoïdes par voie orale ou systémique ou à une chimiothérapie anticancéreuse (Prescott *et al.*, 1995 ; Akpan *et al.*, 2002). Cette pathologie est douloureuse et inconfortable à cause de l'inflammation, des sensations de goût métallique et de brûlures dans la bouche (Ruhnke, 2002).

➤ Candidose érythémateuse

La candidose érythémateuse est caractérisée par une muqueuse buccale rouge. L'intensité de la coloration des taches varie du rouge vif au rose pastel. Ces rougeurs sont souvent localisées au niveau du palais, de la langue et de la muqueuse buccale (Cannon *et al.*, 1999). Les patients expriment une sensation douloureuse de brûlure (Cannon *et al.*, 1999).

Elle survient dans un contexte d'antibiothérapie à large spectre, prise sur une période prolongée chez les sujets âgés, lors de prise de corticoïdes par voie orale, ou encore chez les gros fumeurs et les porteurs de prothèses dentaires (Cannon *et al.*, 1999).

➤ Candidose hyperplasique

La candidose hyperplasique est caractérisée par la présence de plaques blanches adhésives au niveau de la muqueuse buccale et de la langue (Cannon *et al.*, 1999)

➤ Perlèche angulaire

La perlèche angulaire ou fissurée est caractérisée par la présence de fissures ou de croûtes au niveau des commissures labiales. Elle survient souvent avec une candidose buccale et est

favorisée par une prothèse dentaire inadaptée, un tic de léchage des commissures ou par un déficit en vitamine B (Cannon *et al.*, 1999).

1.2. *CANDIDA ALBICANS*

1.2.1. Description générale

Les espèces de *Candida* sont des organismes eucaryotes et non photosynthétiques comme tous champignons (Akpan and Morgan, 2002). Il existe environ 150 espèces de *Candida*, ubiquitaires et généralement saprophytes vis-à-vis de leur environnement, mais seul un petit nombre d'entre elles, tel que *C. albicans*, se révèle pathogène pour l'homme.

1.2.2. Le commensalisme

C. albicans est une espèce commensale à l'humain, c'est à dire capable d'établir une colonisation asymptomatique, et donc de croître sur une surface corporelle sans causer d'infection. *C. albicans* colonise différentes régions comme l'oropharynx, le vagin, ainsi que le tractus gastro-intestinal, ce dernier étant le réservoir principal de *C. albicans* (Odds, 1988).

1.2.3. Le polymorphisme

C. albicans est une levure qui peut croître sous diverses formes selon les conditions environnementales retrouvées : soient les formes blastospore, mycélienne ou pseudomycélienne (Odds, 1988; Samaranayake *et al.*, 1990).

La conidiogénèse est de type blastique solitaire (blastospore), c'est-à-dire qu'une nouvelle spore est formée à partir d'une cellule mère par simple bourgeonnement. Le bourgeon se forme généralement à proximité de la cicatrice du bourgeon formé au cours du cycle cellulaire précédent, ou au pôle opposé (modèle bipolaire). Le bourgeon s'agrandit progressivement jusqu'à atteindre une taille critique, puis la croissance cesse. Le noyau se

divise ensuite au niveau de la jonction entre cellule mère et cellule fille, puis une cloison se forme entre les deux cellules qui vont bientôt se séparer (Sanchez-Martinez *et al.*, 2001; Calderone, 2002; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway *et al.*, 2004).

C. albicans peut également se multiplier selon un mode blastique acropète, aboutissant à la formation d'un pseudomycélium. Cette forme filamenteuse particulière est produite par une cellule mère, à partir d'un bourgeon situé généralement sur l'un de ses pôles. Ce dernier se développe différemment, de façon tubulaire et cylindrique, donnant naissance à une cellule fille très allongée. Après la formation de la cloison, la nouvelle cellule reste attachée à la cellule mère, et bourgeonne à son tour selon le même mécanisme. Ceci aboutit à la formation d'une structure plus ou moins longue, présentant des étranglements au niveau des contacts intercellulaires. Des blastospores peuvent ensuite se développer au niveau de ces zones de constriction, donnant naissance à des ramifications latérales et conférant ainsi au pseudomycélium un aspect buissonnant. Cette structure a cependant tendance à se dissocier (Sanchez-Martinez *et al.*, 2001; Calderone, 2002; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway *et al.*, 2004).

C. albicans produit également du mycélium vrai. Au début de la germination, le bourgeon formé s'allonge. Ce tube germinatif mesure deux à trois fois la longueur de la cellule mère et possède un diamètre régulier. À ce stade, il existe une continuité cytoplasmique entre le blastospore et le tube formé. Dans 50 % des cas, le bourgeon se forme à n'importe quel endroit du blastospore, sinon, il se forme selon le modèle bipolaire. Lors de la formation du blastospore, une grande vacuole apparaît dans la cellule mère. Le bourgeon émerge, grandit, puis le noyau du blastospore migre dans le tube et s'y divise. Puis, un des noyaux fils retourne dans la cellule mère. Le tube germinatif présente une croissance apicale, il se cloisonne et se ramifie au fur et à mesure de son allongement, ce qui lui confère un aspect arborescent appelé mycélium. Ce filament est donc formé d'articles cylindriques uninucléés et séparés par des septa. Les cloisons ne sont pas étanches, puisqu'un pore septal persiste

(Sanchez-Martinez *et al.*, 2001; Calderone, 2002; Sudbery *et al.*, 2004; Whiteway *et al.*, 2004).

Selon les conditions environnementales, les trois formes peuvent coexister et une forme peut donner naissance à une autre. En effet, les hyphes peuvent se séparer pour donner des blastospores et celles-ci peuvent croître pour donner naissance à des hyphes ou des pseudohyphes (figure 1.1). La production de diverses formes est associée à la température, le pH et plusieurs autres facteurs environnementaux (Odds, 1994; Mooney *et al.*, 1995; Odds, 1988; Samaranayake *et al.*, 1990).

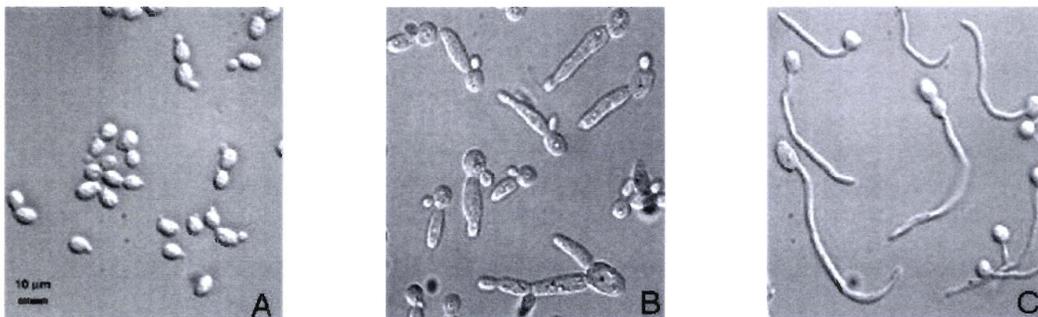


Figure 1.1 : Les différentes morphologies de *C. albicans* (blastospore (A), pseudohyphe (B), hyphe (C) (www.usask.ca/biology/kaminskyj/collab.html))

1.2.4. La pathogénicité

Les espèces isolées chez l'homme possèdent un potentiel pathogène. Dans le cas de *C. albicans*, sa pathogénicité est largement associée à sa capacité d'adaptation à l'environnement, qui est aussi liée à sa variabilité structurale. L'expression et/ou la sécrétion d'un certain nombre de facteurs potentiels de virulence par le champignon jouent aussi un rôle non négligeable dans sa pathogénicité. Chez *C. albicans*, ces facteurs

potentiels de virulence suggérés sont la morphologie, les facteurs d'adhésion et les activités extracellulaires lipolytique ou protéolytique (Odds, 1994).

1.2.4.1. Variabilité structurale

1.2.4.1.1. Variabilité génétique

De nombreuses études ont été réalisées sur *C. albicans* et ont montré que certains gènes étaient déterminants dans sa pathogénicité. Kelly *et al.* (2004) ont caractérisé le gène *CaACE2* qui serait impliqué dans le mécanisme de régulation membranaire. Ils ont démontré qu'une délétion du gène *CaACE2* amenait un défaut au niveau de la séparation des cellules. Les cellules mutantes ont une adhérence réduite aux surfaces plastiques et ne sont plus virulentes dans un modèle murin (Kelly *et al.*, 2004). Le gène *CaACE2* joue donc un rôle majeur dans la morphologie et l'adhésion de *C. albicans*.

Une étude de Zheng *et al.* (2004) a montré que le gène *HGCI*, qui encode pour la cycline *G1*, n'est pas exprimé lorsque la levure est sous forme de blastospore, mais est induit rapidement lorsque les conditions s'y prêtent (37°C, en présence de sérum). Ils ont montré que la délétion de ce gène, dans une cellule sous la forme de blastospore, empêchait le passage sous la forme d'hyphe dans les conditions optimales de croissance (37°C, en présence de sérum). Le gène *HGCI* coderait donc probablement pour un composant du mécanisme de la formation d'hyphe et serait un gène régulateur de l'expression du changement de forme (Zheng *et al.*, 2004).

Deux autres gènes ont fait l'objet d'études : *ALS3* et *HWPI*. Ils codent pour des adhésines, qui sont des protéines membranaires retrouvées seulement chez la forme hyphe. Une étude a montré que des mutants *ALS3* étaient moins virulents après une inoculation par voie intraveineuse (Fu *et al.*, 2002). De même pour le gène *HWPI*, les mutants avaient une faible virulence, après une inoculation par voie intraveineuse sur des souris (Sundstrom *et al.*, 2002; Sharkey *et al.*, 2005). Lo *et al.* (1997) ont montré par le biais de délétions, que les gènes *EFG1* et *CPH1* étaient impliqués dans la formation d'hyphes. La délétion du gène

CPHI a un impact moindre par rapport à la délétion de *EFG1*. La double délétion de *CPHI* et *EFG1* entraîne une perte de la virulence de *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997).

1.2.4.1.2. Variabilité morphologique

C. albicans peut être considéré comme polymorphe. Il peut en effet prendre plusieurs aspects visibles en microscopie. Les principaux stades morphologiques sont : blastospore, pseudohyphes et hyphes. Toutes ces formes sont virulentes, mais la forme blastospore ne peut être virulente que dans les cas de candidoses systémiques, comme cela a été montré par Lo *et al.*, (1997). La forme mycélienne est requise pour permettre l'insertion dans les tissus (Lo *et al.*, 1997).

1.2.4.2. Facteurs sécrétés ou expression potentialisant la virulence

1.2.4.2.1. Les protéinases

Les protéinases sont certainement les enzymes de *C. albicans* les mieux étudiées. Les protéinases aspartiques sécrétées (ou SAPs) font partie d'une famille de dix membres : SAP1 à SAP10 (Monod *et al.*, 1994). La forme mycélienne de *C. albicans* exprime et sécrète davantage de SAPs que la forme blastospore.

Des études sur un modèle oral (Schaller *et al.*, 1998) et cutané (Schaller *et al.*, 2000) d'infection à *C. albicans* ont suggéré que les protéinases SAP1-3 étaient celles exprimées durant les infections superficielles. Ces SAPs seraient responsables de l'adhésion (Watts *et al.*, 1998), des dommages cellulaires de l'hôte (Schaller *et al.*, 1999) et de la virulence (De Bernardis *et al.*, 1999).

De leur côté, Staib *et al.* ont montré que les SAPs 4-6 étaient les plus exprimées dans le cas de modèle d'infection systémique à *C. albicans*. Dans ce modèle d'infection, les SAPs 4-6 contribueraient à la virulence en résistant à l'attaque phagocytaire de l'hôte (Borg-von

Zepelin *et al.*, 1998, Staib *et al.*, 2000) et seraient responsables de dommages cellulaires de l'hôte, de l'invasion (Kretschmar *et al.*, 1999) et de la virulence (Hube *et al.*, 1997; Sanglard *et al.*, 1997).

1.2.4.2.2. Les phospholipases

Les phospholipases jouent aussi un rôle dans la pathogénicité de *Candida*. La production de ces enzymes est plus importante chez les souches isolées de produits pathologiques que chez celles ayant un comportement commensal.

Barrettbee *et al.* (1985) ont été les premiers à évaluer le rôle des phospholipases extracellulaires dans la virulence de *C. albicans* dans un système murin. Ils ont montré une corrélation entre l'activité phospholipasique et deux paramètres de la pathogénicité. Plus l'activité phospholipasique est forte et plus les souches de *C. albicans* étaient adhérentes aux cellules épithéliales et pathogènes (Barrettbee *et al.*, 1985). De plus, une étude a montré que les phospholipases étaient impliquées dans le processus d'invasion des tissus par *C. albicans* (Ibrahim *et al.*, 1995).

1.3. LES MOLÉCULES ANTIFONGIQUES

Afin de traiter les candidoses, il existe un arsenal thérapeutique bien diversifié : les molécules antifongiques. Ces molécules sont regroupées en plusieurs classes : les polyènes, les pyrimidines, les dérivés azolés et une nouvelle classe : les échinocandines. La section, qui suit décrit les différentes molécules antifongiques utilisées ainsi que leur mode d'action.

1.3.1. Les polyènes

Les polyènes sont des antifongiques naturels produits à partir d'extrait de culture d'actinomycètes du genre *Streptomyces*. Leur structure complexe est caractérisée par un nombre variable de doubles liaisons conjuguées CH=CH (Hamilton, 1973; Ryley *et al.*, 1981).

Les polyènes agissent en formant un complexe insoluble avec un stérol membranaire, et plus précisément avec l'ergostérol. En effet, les polyènes ont une très forte affinité avec l'ergostérol, constituant majeur de la membrane cellulaire fongique (Brajtburg *et al.*, 1996). Une fois complexés, il y a formation de canaux hydrophiles. Ceux-ci provoquent une fuite des constituants vitaux de la cellule, pouvant causer la mort cellulaire (Dekruif *et al.*, 1974). Effectivement, la fuite des ions potassium (K^+) et magnésium (Mg^{2+}) vers le milieu extérieur, entraîne une acidification à l'intérieur de la cellule et amène la mort cellulaire (Lampen, 1966). Les polyènes fragilisent donc la membrane cellulaire fongique par le biais de troubles de perméabilité de celle-ci. Les polyènes agissent aussi sur la stimulation de la consommation d'oxygène et la diminution de la synthèse des composés azotés. Il est à noter que la nystatine est utilisée en industrie fromagère pour le contrôle des moisissures.

Il existe différents polyènes : l'amphotéricine B et la nystatine (figure 1.2).

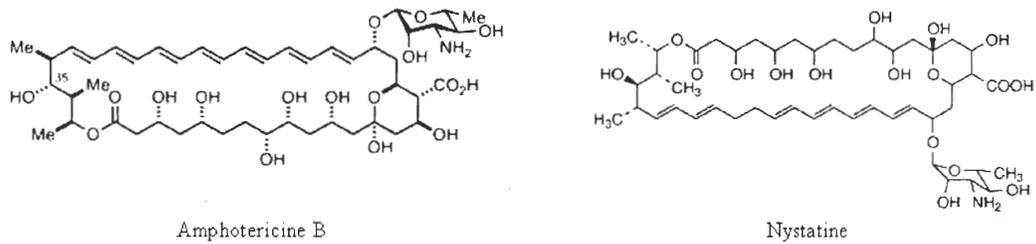


Figure 1.2 : Structures chimiques de polyènes (Bolard, 1986)

1.3.2. Les pyrimidines

Le 5-fluorocytosine (flucytosine ou 5-FC) (figure 1.3) est un dérivé fluoré de la pyrimidine qui a une activité inhibitrice sur de nombreuses espèces de levures (Bennett, 1974). Le mode d'action du 5-FC se situe au niveau de la synthèse d'acides nucléiques fongiques. En effet, le 5-FC pénètre la cellule fongique grâce à une enzyme, la cytosine perméase. Une fois à l'intérieur de la cellule, le 5-FC est converti en 5-fluorouracile (5-FU) par une autre enzyme, la cytosine désaminase. Le 5-FU est ensuite converti par l'UMP pyrophosphorylase en acide 5-fluorouridylique (FUMP). Une fois phosphorylé, le FUMP peut incorporer l'ARN fongique et entraîner l'arrêt de la production protéique (Polak *et al.*, 1975). Le 5-FU peut aussi être converti en l'acide 5-fluorodéoxyuridine monophosphaté, qui est un puissant inhibiteur de la thymidilate synthétase, enzyme impliquée dans la synthèse d'ADN et la division nucléaire (Diasio *et al.*, 1978).

Au final, le 5-FC joue par interférence avec le métabolisme de la pyrimidine, aussi bien au niveau de la synthèse de l'ADN, ARN et protéique dans la cellule fongique.

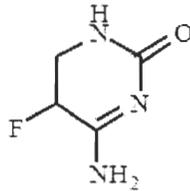


Figure 1.3 : Structure chimique du 5-FC (François *et al.*, 2005)

1.3.3. Les dérivés azolés

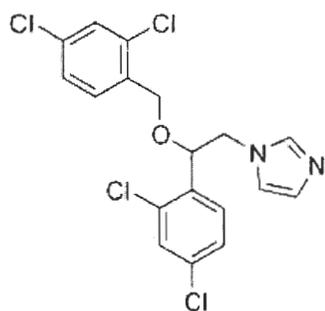
Il s'agit de molécules de synthèse issues de la modification du noyau azolé. Ce groupe d'antifongiques a en commun un noyau azolé contenant deux atomes d'azote (imidazolé) ou trois atomes d'azote (triazolé).

Le mode d'action des azolés est très complexe et fait intervenir différents mécanismes amenant à l'inhibition de deux cytochromes P450 impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol (figure 5). Les deux cytochromes P450 sont identifiés différemment : le cytochrome P450 ayant l'activité lanestérol 14 α -déméthylase (C14 lanestérol déméthylase) est codé par le gène *ERG11 (CYP51)* et celui ayant une activité de C22-stérol désaturase est codé par le gène *ERG5 (CYP61)* (Kelly *et al.*, 1997). Les résultats de traitements avec des dérivés azolés ont montré une accumulation de stérols 14 α -méthylé ainsi qu'une inhibition de toutes les réactions subséquentes, incluant la C22-stérol désaturase de la voie de synthèse de l'ergostérol (Kelly *et al.*, 1997). L'ergostérol (figure 1.5) agit comme biorégulateur de la fluidité membranaire et par conséquent de l'intégrité membranaire de la cellule fongique (Nozawa *et al.*, 1986). Avec une diminution, voire une disparition de l'ergostérol, et un remplacement par des stérols inhabituels, la perméabilité et la fluidité de la membrane sont altérées. Par conséquent, l'activité des « membrane bound enzyme » qui

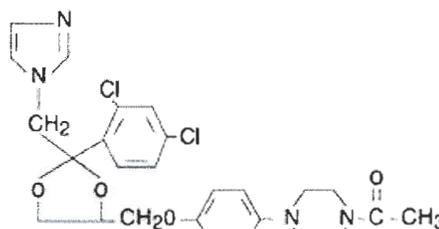
sont impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire est aussi altérée (Marichal *et al.*, 1985).

Les dérivés azolés interviennent aussi au niveau des mitochondries en perturbant leurs mécanismes oxydatifs, aboutissant à une accumulation létale de peroxyde d'hydrogène (Borgers, 1980).

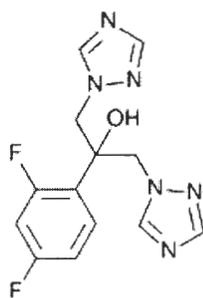
Il existe différents dérivés azolés : le miconazole, le kétoconazole (imidazolé) et le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole (triazolé) (figure 1.4).



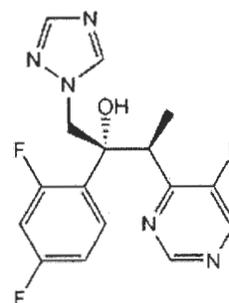
Miconazole



Ketoconazole



Fluconazole



Voriconazole

Figure 1.4 : Structures chimiques de dérivés azolés (Francois *et al.*, 2005)

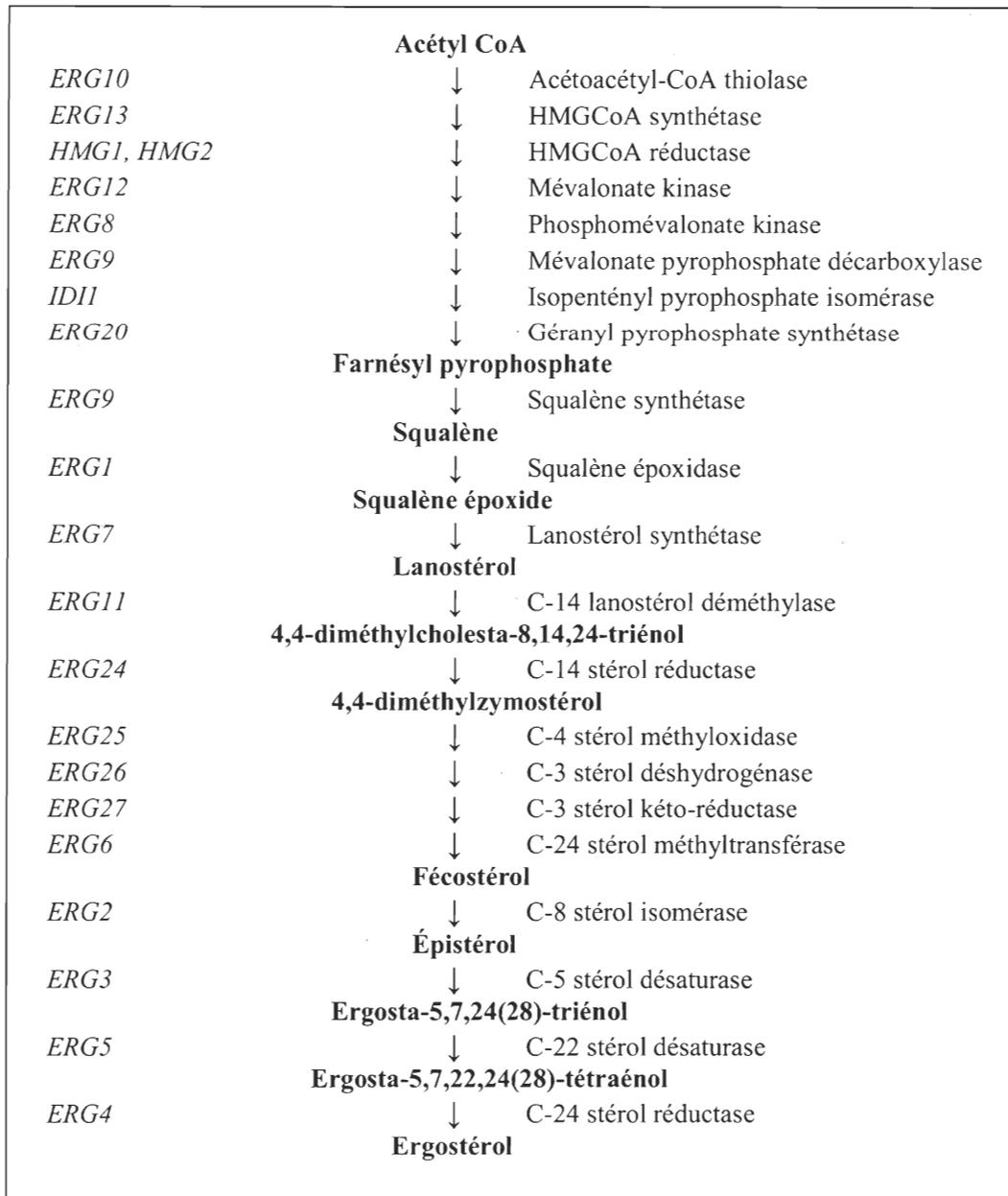


Figure 1.5 : Voie de biosynthèse de l'ergostérol chez les *Candida*.

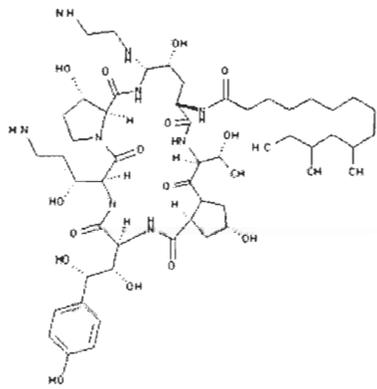
1.3.4. Les échinocandines

Les échinocandines sont des métabolites fongiques secondaires. Elles sont constituées d'un hexapeptide cyclique avec des chaînes aliphatiques de différentes tailles (Turner *et al.*, 1997).

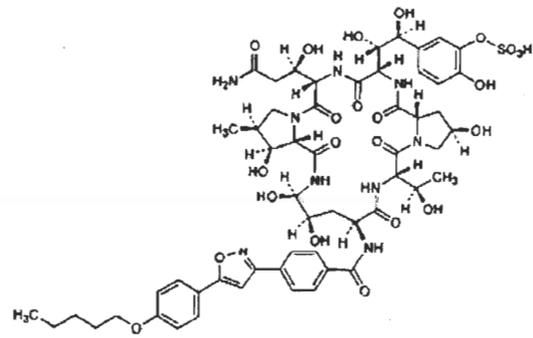
Les échinocandines se différencient des autres antifongiques par leur mode d'action original. En effet, elles inhibent la synthèse de la paroi fongique. Cette paroi représente une cible de choix, car elle est présente chez la plupart des champignons pathogènes, mais est inexistante chez les cellules des mammifères. Plus précisément, les échinocandines inhibent de façon non compétitive la (1; 3)- β -D-glucane synthétase (Hector, 1993). La paroi cellulaire fongique a une structure rigide qui est constituée d'un large panel de polysaccharides, tels que la (1; 3)- β -D-glucane, la (1; 4)- β -D-glucane, la (1; 6)- β -D-glucane, la chitine, les mannanes, l' α -glucanes et une variété de glycoprotéines (Bernard *et al.*, 2001; Klis *et al.*, 2001). Le (1; 3)- β -D-glucane est le principal constituant de la paroi fongique.

L'inhibition de la (1; 3)- β -D-glucane synthétase par les échinocandines (complexe enzymatique nécessaire à la formation des polymères de glucanes) empêche ainsi l'incorporation des glucanes et des protéines associées aux glucanes dans la paroi fongique (Kurtz *et al.*, 1997; de Lucca *et al.*, 1999; Walsh *et al.*, 2000).

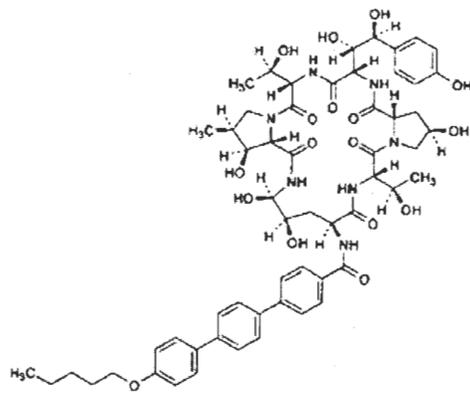
L'activité des échinocandines se concentre sur la synthèse de nouvelles parois, avec une réduction du bourgeonnement des levures et une inhibition de la croissance à l'extrémité des filaments pour les champignons filamenteux (Kurtz *et al.*, 1994; Bowman *et al.*, 2002). Il existe différentes échinocandines : la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine (figure 1.6).



Caspofungine



Micafungine



Anidulafungine

Figure 1.6 : Structures chimiques d'échinocandines (Denning, 2003)

1.4. DÉVELOPPEMENT DE RÉSISTANCES AUX MOLÉCULES ANTIFONGIQUES

Malgré leur diversité, l'efficacité des molécules antifongiques est limitée par l'émergence de souches résistantes. Cette résistance est attribuable à l'utilisation abusive et souvent prolongée d'antifongiques, ce qui permet aux souches de développer des stratégies pour lutter contre ces molécules et ainsi d'y devenir résistantes. Cette section montre les résistances développées aux différentes molécules antifongiques.

1.4.1. La résistance aux polyènes

La résistance aux polyènes est un phénomène rare. Elle est souvent causée par une diminution du taux d'ergostérol dans la membrane cellulaire fongique réduisant ainsi l'interaction avec les polyènes (Ellis, 2002). De plus, certaines cellules fongiques ont une mutation dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol et produisent des composés pour lesquels les polyènes ont une très faible affinité (Ellis, 2002). Barker *et al.* (2004) ont généré une souche résistante à l'amphotéricine B et ont comparé le profil des gènes exprimés par rapport à la même souche, mais non résistante. Il en est ressorti que 134 des gènes ont montré une différence d'expression : ils étaient soit surexprimés, soit sous-exprimés. En plus des gènes de stress cellulaire *DDR48* et *RTA2*, les gènes *ERG5*, *ERG6* et *ERG25* de la biosynthèse de l'ergostérol sont surexprimés. L'analyse des stérols de la membrane révèle une prédominance de stérols intermédiaires (éburicol et lanostérol) pour la souche résistante comparée à la souche non résistante avec l'ergostérol (Barker *et al.*, 2004).

1.4.2. La résistance aux pyrimidines

La résistance au 5-FC peut résulter d'une entrée réduite dans la cellule pouvant être causée par un déficit ou une altération de l'activité de la cytosine perméase. Elle peut aussi être causée par une diminution ou une perte d'activité de l'UMP-pyrophosphorylase, molécule

responsable de la conversion du 5-FC en FUMP (Whelan, 1987; Iwata, 1992). Une étude sur la résistance au 5-FC chez *C. albicans* a été effectuée sur le séquençage de 4 gènes *FCA1*, *FUR1*, *FCY21* et *FCY22* qui codent respectivement pour une cytosine déaminase, une UPRT (uracile phosphoribosyl-transférase) et 2 cytosines perméases (Hope *et al.*, 2004). Cette étude a montré que la résistance au 5-FC était accrue quand le gène *FUR1* avait subi une mutation.

1.4.3. La résistance aux dérivés azolés

On décrit plusieurs mécanismes de résistance des levures aux dérivés azolés, incluant la diminution de l'accumulation intracellulaire des dérivés azolés, l'altération de la composition en stérols de la membrane et la surproduction ou la mutation des cibles enzymatiques des dérivés azolés, la lanostérol 14 α -déméthylase.

1.4.3.1. Diminution de l'accumulation intracellulaire des dérivés azolés

L'accumulation intracellulaire des dérivés azolés peut être réduite par un manque de pénétration, à cause d'un faible taux d'ergostérol dans la membrane. Une possible diminution du ratio entre la phosphatidyl-choline et la phosphatidyl-éthanolamine dans le plasma membranaire peut changer les fonctions barrières de la membrane (Loeffler *et al.*, 2003). De plus, une importante cause de la réduction de l'accumulation des drogues est la présence d'un système actif d'efflux sortant qui tente de refouler ces azolés hors de la cellule. Pour les souches résistantes, ce système d'efflux est très développé (Sanglard *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1999; Barchiesi *et al.*, 2000; Sanguinetti *et al.*, 2005). Ceci est dû à la surexpression des gènes codant pour ces systèmes d'efflux (Niimi *et al.*, 2004).

1.4.3.2. Altération de la composition en stérols de la membrane

Les levures résistantes sont capables de modifier la voie de biosynthèse de l'ergostérol, qui de ce fait supprime l'effet délétère des azolés, en évitant ainsi la formation par ces derniers de métabolites toxiques à partir de stérols méthylés en position 14- α . Chez *C. albicans*, le

14 α -méthylfécostérol peut être métabolisé par l'enzyme Δ -5-6-désaturase (codé par le gène *ERG3*) en un produit toxique (Kelly *et al.*, 1997). Cette étude a montré que les souches résistantes aux dérivés azolés avaient une mutation dans le gène *ERG3*.

1.4.3.3. Altération ou surproduction de la cible enzymatique des dérivés azolés

Des études ont montré que des mutations du gène *ERG11* engendrent une diminution de l'affinité entre les dérivés azolés et les enzymes (14 α -déméthylase) (Kelly *et al.*, 1999; Lamb *et al.*, 2000) ou une surexpression du gène *ERG11* (Pinjon *et al.*, 2003; Chau *et al.*, 2004), mais ce mécanisme de résistance aurait un effet plus réduit.

1.4.4. La résistance aux échinocandines

La résistance aux échinocandines est un phénomène très rare (Stevens *et al.*, 2004). Pour le peu de cas répertoriés aujourd'hui, un mécanisme semble être identifié. Il s'agirait d'une mutation dans la protéine Fks1p, un constituant essentiel de l'enzyme 1-3- β -D-glucane synthase (Park *et al.*, 2005; Katiyar *et al.*, 2006; Laverdiere *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006).

1.5. LES BACTÉRIOCINES

Depuis plusieurs années, les bactériocines ont fait l'objet d'une attention croissante étant donné leurs propriétés antimicrobiennes. En effet, certaines bactériocines sont actives contre les pathogènes alimentaires ou les bactéries responsables d'altérations. Elles ont un spectre d'action très variable (De Vuyst *et al.*, 1994). De plus, les bactériocines présentent une sécurité d'utilisation puisqu'elles sont produites par des souches non pathogènes, sont non toxiques et sont détruites par les enzymes digestives (protéases).

1.5.1. Généralités

1.5.1.1. Définition

Les bactériocines sont des protéines (polypeptides) ayant une activité bactériostatique dirigée contre une espèce en général taxonomiquement proche de la souche productrice (Tagg *et al.*, 1976). Les bactériocines sont produites par une vaste gamme d'espèces bactériennes et forment un groupe hétérogène en ce qui concerne les souches productrices, le spectre antimicrobien, le mode d'action et les propriétés physico-chimiques (Daeschel, 1989).

Une autre définition plus récente a été proposée pour les définir. Selon celle-ci, les bactériocines sont des produits de synthèse ribosomique bactériens, modifiés ou non, qui sont sécrétés à l'extérieur de la cellule. Elles ont un spectre d'action bactéricide restreint, caractérisé par l'inclusion d'au moins quelques souches semblables à la bactérie productrice et contre lesquelles, celle-ci a un mécanisme de protection spécifique (Jack *et al.*, 1995).

1.5.1.2. Classification

Les bactériocines font parties de l'une des plus importantes catégories de molécules antimicrobiennes (Sahl *et al.*, 1998). La nature physico-chimique de ces peptides, particulièrement chez ceux produits par les bactéries à Gram positif, a montré une grande diversité (Jack *et al.*, 1995). Une trentaine de ces peptides, dits de classe I, contiennent les acides aminés modifiés thioether lanthionine et méthyllanthionine, déhydrobutyryne et dehydroalanine. Ils sont appelés lantibiotiques pour «antibiotiques contenant de la lanthionine» (Sahl *et al.*, 1998). Par delà leurs applications respectivement alimentaire et clinique, les bactériocines et les antibiotiques présentent un certain nombre de différences. Contrairement aux bactériocines, les antibiotiques sont synthétisés comme métabolites secondaires et possèdent une toxicité et/ou des effets secondaires avérés (Hansen, 1993). C'est la raison pour laquelle le terme d'agents de conservation biologiques fut proposé pour cette classe de peptides antimicrobiens (Hurst, 1981).

La classe I, correspondant aux lantibiotiques, se divise en deux sous catégories reposant sur les aspects structuraux et fonctionnels des peptides les composant (Jung, 1991). Les peptides amphiphiles, flexibles, allongés et formant des pores dans les membranes bactériennes (Sahl, 1991.) forment la première de ces sous catégories et correspondent au type « a » (épidermine, Pep5, nisine). Les peptides de type « b » possèdent, à contrario, une structure globulaire et rigide (actagardine, cinnamycine, mersacidine), inhibant le fonctionnement de certaines enzymes (Hosoda *et al.*, 1996; Brotz *et al.*, 1998).

La classe II correspond à de petits peptides ne contenant pas de résidus modifiés dans leur séquence et étant thermostables, également sous divisés en deux type « a » et « b » (Klaenhammer, 1993). Une classe IIc, ou type « c », avait initialement été créée, reposant sur la spécificité de l'utilisation du système de sécrétion (*sec*) par les bactériocines la composant (Nes *et al.*, 1996). La démonstration que le système *sec* pouvait être emprunté par les bactériocines de la classe IIa suggéra son élimination (Cintas *et al.*, 1997). Les peptides de la classe IIa englobent les peptides de type pédiocine, actifs contre *Listeria* spp. et portant une séquence conservée (Tyr-Gly-Asn-Gly-Val) ainsi qu'un pont disulfure formé

par deux résidus de cystéine à leur extrémité N-terminale (Nes *et al.*, 1996). Les bactériocines de la classe IIb se caractérisent principalement par la nécessité d'être en présence de deux peptides différents pour être actives, comme les lactococcines G et M et la lactacine F (Klaenhammer, 1993).

Les bactériocines de grandes tailles (> 30 kDa) et thermosensibles comme les lactocines A et B, l'helveticines (J, V-1829) et l'acidophilucine A, composent la classe III (Klaenhammer, 1993). L'idée d'une quatrième classe, constituée de bactériocines pouvant se complexer avec d'autres macromolécules, avait été soumise par Klaenhammer (1993). Cependant, ce type de bactériocines n'a jamais été purifiée à ce jour. De plus, plusieurs données laissent supposer que cette théorie ne résulte que d'un artefact expérimental (Cleveland *et al.*, 2001). Les complexes, auxquels la plantaricine S semblait participer, résultaient des propriétés cationiques et hydrophobes de la bactériocine. L'activité bactériocinogène reste exclusivement associée aux petits peptides antibactériens après dissociation des complexes (Jimenez-Diaz *et al.*, 1995).

1.5.1.3. Mécanisme de biosynthèse

Alors que la plupart des antibiotiques sont synthétisés durant la phase stationnaire, presque toutes les bactériocines révèlent une cinétique de métabolite primaire. Par conséquent, la composition du milieu de croissance et la température de fermentation sont deux facteurs très importants qui influencent le niveau de production de la bactériocine (De Vuyst *et al.*, 1994).

La plupart des bactériocines sont produites dans un milieu complexe et à une température optimale pour la croissance de la souche productrice. Généralement, le pH optimal de production est légèrement inférieur au pH optimal de croissance.

En raison de leur nature protéique, les bactériocines sont synthétisées par un mécanisme ribosomique commun aux autres protéines, impliquant la transcription et la traduction.

Elles peuvent ainsi être codées par des gènes localisés sur un plasmide ou sur un chromosome, et organisées sous forme d'opérons (De Vuyst *et al.*, 1994).

La plupart des bactériocines sont produites sous forme de précurseur ayant une extension N-terminale hélicoïdale de 18 à 24 acides aminés. Cette extension est détachée de façon post-traductionnelle afin de libérer la bactériocine mature.

1.5.1.4. Spectre d'inhibition et mode d'action

De façon générale, la majorité des bactériocines produites par des bactéries à Gram positif présentent un spectre d'activité plus large contre des espèces à Gram positif apparentées ou non à l'espèce productrice. Au contraire, les bactériocines produites par les bactéries à Gram négatif ont un spectre très restreint (Tagg *et al.*, 1976).

Le mode d'action est réalisé en deux étapes (Plate *et al.*, 1972). La première est une étape d'adsorption de la bactériocine, à des récepteurs spécifiques ou non, sur la surface de la cellule grâce à son caractère hydrophobe marqué (figure 1.7, I). La seconde étape est la formation de pores (figure 1.7, II) causé par un enchaînement de réaction qui altère la perméabilité membranaire. Ce phénomène entraîne alors une perturbation du transport membranaire et une dissipation de la force ionique inhibant ainsi la production d'énergie et la biosynthèse des protéines ou des acides nucléiques. Cela conduit à la mort de la cellule (figure 1.7, III).

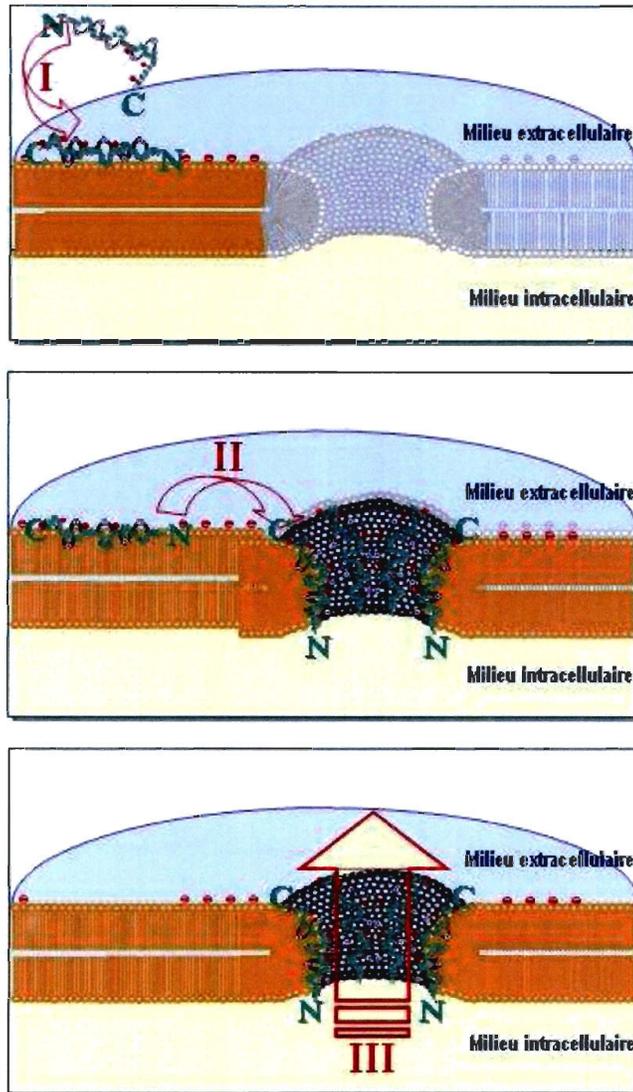


Figure 1.7 : Mode d'action des bactériocines sur la membrane cytoplasmique (Sahl *et al.*, 1998)

1.5.2. Nisine

Le terme nisine décrit historiquement une famille d'antibiotiques polypeptidiques (types A, B, C, D et E) produits par *Lactococcus lactis* (Hurst, 1981; Jarvis *et al.*, 1971). On sait aujourd'hui que les formes B à E sont en fait les produits de dégradation de la nisine A et ne sont donc pas des entités à part entière (Harris *et al.*, 1992). Les trois formes actives de nisine produites naturellement sont la nisine A, la nisine Z et la nisine Q.

1.5.2.1. Propriétés chimiques et moléculaires

La nisine A et la nisine Z (figure 1.8) ne diffèrent que par un seul résidu d'acide aminé en position 27 (l'histidine dans la nisine A est remplacée par l'asparagine dans la nisine Z) (Mulders *et al.*, 1991), tandis que la nisine A et la nisine Q diffèrent de quatre acides aminés à la position 15 (l'alanine dans la nisine A est remplacée par la valine dans la nisine Z), à la position 21 (la méthionine dans la nisine A est remplacée par la leucine dans la nisine Z), à la position 27 (l'histidine dans la nisine A est remplacée par l'asparagine dans la nisine Z) et à la position 30 (l'isoleucine dans la nisine A est remplacée par la valine dans la nisine Z) (Fukao *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude a montré que la nisine Z a une meilleure solubilité que la nisine A (à des pH neutres et alcalins) et donc se diffuse mieux (De Vos *et al.*, 1993). Meghrouh *et al.* (1997) ont mis en évidence la production de la nisine Z par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719. Son poids moléculaire est de 3330,4 Da et est constituée de 34 acides aminés. L'analyse de la structure tridimensionnelle de la nisine dans les solutions aqueuses par spectrométrie à résonance nucléaire magnétique (RMN) a mis en évidence la présence de boucles thioéthers donnant une structure pentacyclique à la molécule (Van De Ven *et al.*, 1991; Lian *et al.*, 1992). Ainsi, la nisine est caractérisée par la présence de trois résidus insaturés (2 Dha et 1 Dhb) et de cinq résidus thioéthers, une lanthionine (DAIa-S-Ala) et 4 β -méthyllanthionine (DAIa-S-Ala).

Les acides aminés non usuels seraient responsables des propriétés fonctionnelles de la nisine, de sa thermostabilité ainsi que de son action bactéricide (Chan *et al.*, 1989; Klaenhammer, 1993). La nisine est un peptide cationique (Van Der Meer *et al.*, 1993)

possédant un point isoélectrique basique de 8 (De Vuyst *et al.*, 1994). Elle possède un caractère amphiphile : hydrophobe du côté N-terminal et hydrophile du côté C-terminale (Kuipers *et al.*, 1991). Cependant, la nisine est sensible à l'action de l' α -chymotrypsine et à la pronase (Meghrous *et al.*, 1997).

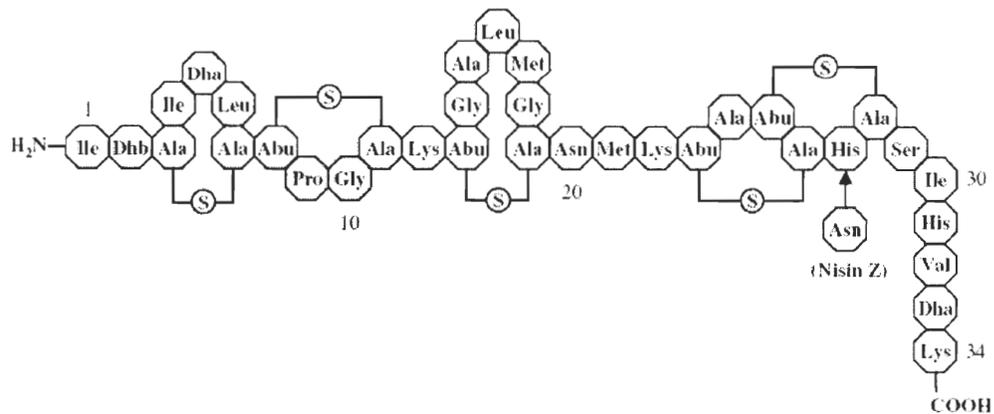


Figure 1.8 : Structure de la nisine (Cheigh *et al.*, 2005)

1.5.2.2. Mode d'action

Les bactériocines peuvent altérer différentes fonctions essentielles à la vie de la cellule cible (transcription, traduction, biosynthèse de la paroi bactérienne), mais les membranes cytoplasmiques restent les principales cibles d'action (Oscàriz *et al.*, 2001). Une étude rapporte que la dissipation de la force proton motrice par la formation de pores au niveau de la membrane cytoplasmique est un mécanisme d'action commun à la plupart des bactériocines (Bruno *et al.*, 1993).

Bien que plusieurs auteurs (Lyon *et al.*, 1991; Toba *et al.*, 1991) ont rapporté que la majorité des bactériocines s'adsorbent d'une manière spécifique aux cellules sensibles,

d'autres travaux ont montré que la nisine n'en fait pas partie (Klaenhammer, 1993) ce qui traduit son large spectre d'activité.

La nisine agit comme un détergent cationique (Harris *et al.*, 1989). L'action de dépolarisation des membranes par la nisine s'accompagne de la formation de pores dans la double couche phospholipidique entraînant un épuisement de la force proton motrice des cellules cibles. Ceci provoque un afflux non spécifique d'acides aminés, de cations, une perte de potentiel membranaire et du gradient de pH, une fuite d'ATP et conduit ainsi à une situation incompatible avec la viabilité cellulaire (Sahl *et al.*, 1987; Klaenhammer, 1993).

Il a été montré que la nisine avait comme cible membranaire le lipide II. Le lipide II est le précurseur de la voie de biosynthèse du peptidoglycane. On le retrouve généralement sur la face externe de la membrane cytoplasmique à la fin de sa biosynthèse. Il est alors accessible pour la fixation de la bactériocine. La nisine peut avoir un effet bactéricide en inhibant la biosynthèse du peptidoglycane. Cette inhibition résulte de la formation d'un complexe entre la bactériocine et le lipide II (Chan *et al.*, 1996).

Des études cinétiques sur des isolats de parois et des enzymes purifiées ont démontré des activités antimicrobiennes de la nisine (Bierbaum *et al.*, 1988). En effet, les molécules de nisine étaient capables d'activer de façon non spécifique des enzymes dont l'action entraînerait la dégradation de larges portions de la paroi cellulaire (Bierbaum *et al.*, 1988). Les enzymes comprennent la N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase et la β -N-acétylglucosaminidase, se fixent aux constituants polyanioniques de la paroi, comme des acides teichoïques, lipoteichoïques et teichuroniques, et régulent la division et le renouvellement de la paroi (Ghuysen, 1968).

1.5.2.3. Biosynthèse

Le gène de structure du précurseur des nisines A, Z et Q a été cloné et séquencé (Buchman *et al.*, 1988; Mulders *et al.*, 1991; Zendo *et al.*, 2003). Il code pour la pré-nisine, un peptide de 57 acides aminés comprenant la séquence leader suivie d'une séquence de 34 acides aminés semblable à la nisine mature. Ce peptide contient des résidus de sérine, thréonine et

cystéine qui sont des précurseurs de Dha et Dhb, lanthionine et β -methyllanthionine. La sérine et la lanthionine se déshydratent et se transforment en déhydroalanine et en déhydrobutyrine par une hydrolyse enzymatique. Après, une addition stéréospécifique produit des groupements thiols des résidus cystéine à la double liaison des acides aminés déshydratés pour former les résidus lanthionine et β -methyllanthionine renforçant ainsi la structure cyclique de la nisine (Gross *et al.*, 1971). Après ces modifications, la séquence leader est clivée et la nisine mature est excrétée dans le milieu extracellulaire.

1.5.2.4. L'innocuité de la nisine

La nisine a reçu le statut de GRAS (generally recognized as safe) et est la seule bactériocine approuvée comme agent de conservation par l'organisation mondiale de la santé (FDA, 1988; Delves-Broughton *et al.*, 1996). Sa forme commerciale est utilisée dans de nombreux procédés alimentaires.

Des études de toxicité ont été réalisées par la « Food and Drug Administration » (FDA, 1988) et ont montré que la nisine (formule commerciale contenant 2.25 % de nisine pure) pouvait être consommée sans risque à une dose journalière maximum de 2.9 mg par personne, soit 116 103 unités internationales (1 μ g = 40 unités internationales, UI). La dose journalière maximum autorisée par le comité scientifique européen sur l'alimentation est de 0.13 mg de nisine pure par personne (EFSA, 2001). Ce comité s'est basé sur les données toxicologiques de la nisine qui seront montrées ci-après.

Des études ont montré que la nisine n'est pas détectée dans la salive 10 minutes après avoir consommé du lait chocolaté contenant 0.005 mg de nisine par kilogramme (Claypool *et al.*, 1966). La nisine est aisément inactivée par la pancréatine à pH 8.0 suite à un traitement de 15-30 minutes à une température de 37°C (Heineman.B *et al.*, 1966; Jarvis *et al.*, 1969). L'inactivation de la nisine par la pancréatine et l'alpha-chymotrypsine a été également rapportée (Jarvis *et al.*, 1969).

1.5.2.4.1. Données toxicologiques.

1.5.2.4.1.1. Effets in vitro de la nisine

La nisine brute n'a eu aucun effet sur la mobilité des leucocytes et n'a pas causé d'hémolyse à une concentration de 1:250 (4 mg/ml) (Mattick *et al.*, 1947). Aucune hémolyse des leucocytes n'a été causée par la nisine pure en 22 heures à une concentration de 20 000 UI/ml (0.5 mg/ml) (Hirsch *et al.*, 1949). Une certaine cytotoxicité a cependant été observée après 48 heures d'incubation avec les cellules de SV40-HC et les variétés de cellules de Vero (3.4 millimètres) avec une toxicité plus prononcée pour les cellules de SV40-HC (0.85 mm) en employant le test d'exclusion au bleu trypan (Murinda *et al.*, 2003). À la concentration de 400 µg/ml, la nisine s'est avérée *in vitro* spermicide (Reddy *et al.*, 2004).

Des cobayes ont été sensibilisés à la nisine par injection intrapéritonéale ; aucune sensibilisation ne s'est produite après l'administration par voie orale (Frazer *et al.*, 1962). Il n'y a aucune évidence de la sensibilisation à la nisine sur les sujets humains.

1.5.2.4.1.2. Toxicité aiguë

On a rapporté que la LD₅₀ orale de la nisine chez les rats est supérieure à 25 mg/kg (Frazer *et al.*, 1962), considérant que chez la souris, Hara *et al.* (1962) ont évalué cette LD₅₀ à 174 mg/kg.

1.5.2.4.1.3. Toxicité chronique

Six groupes de 10 rats mâles sevrés ont été alimentés pendant 12 semaines avec des régimes contenant 20 %, 30 % ou 40 % de fromage ne contenant aucune nisine ou environ

100 000 unités de nisine/g ; ici, le fromage était la seule source de protéines. Les prises de nisine étaient 1.2×10^6 UI/kg par jour (30mg/kg par jour), 1.8×10^6 UI/kg par jour (45 mg/kg par jour), et 2.4×10^6 UI/kg par jour (60 mg/kg par jour). On a observé aucune différence significative dans le taux de gain de poids entre le groupe témoin et les groupes expérimentaux. Aucune différence significative dans le pourcentage de mort après 12, 18 et 24 mois n'a été notée. Aucun changement a été observé dans l'état ou le comportement clinique des animaux, et aucune anomalie était trouvée à l'autopsie ou sur l'étude histologique des organes principaux (Frazer *et al.*, 1962).

Des doses quotidiennes orales de nisine ont été données à cinq groupes de rats (mâle et femelle) pendant une période de 90 jours aux doses égales à 0.5 UI/kg par jour (0.0125 µg/kg par jour), 5 UI/kg par jour (0.125 µg/kg par jour), 50 UI/kg par jour (1.25 µg/kg par jour), 500 UI/kg par jour (012.5 µg/kg par jour), 5 000 UI/kg par jour (125 µg/kg par jour) respectivement par l'alimentation par sonde gastrique. Aucune différence n'a été observée dans la croissance, les analyses de sang, les poids et les volumes de divers organes et les examens histologiques de divers organes entre les animaux témoins et ceux des groupes expérimentaux. On peut noter que les doses examinées étaient très basses (Hara *et al.*, 1962).

Des effets de l'alimentation orale de la nisine chez cinq rats mâles et cinq femelles ont été étudiés pour 12 semaines à un niveau quotidien de 0.25 mg/g d'alimentation (alimentation de 10 000 UI/g). Ce niveau correspond à approximativement 15-20 mg/kg par jour. Aucun effet n'a été noté sur le poids des animaux et on a observé aucun signe d'anomalies à l'autopsie (Pesquera, 1966).

Finalement, aucune grande incidence sur les tumeurs n'a été rapportée dans l'étude chronique (Frazer *et al.*, 1962).

1.5.3. Effets des bactériocines sur *Candida albicans*

Quelques études ont évalué l'effet de bactériocines sur des levures telles que *Candida albicans*. La souche, *Lactobacillus pentosus* TV35b, a été isolée à partir de sécrétions vaginales d'une femme enceinte. *Lactobacillus pentosus* TV35b produit un peptide « bacteriocin-like », la pentocin TV35b. Ce peptide a montré une activité inhibitrice contre des souches de *Candida albicans* (Okkers *et al.*, 1999).

Des souches de lactobacilles anaérobies ont été isolées à partir de la flore vaginale de femmes pré-ménopausées. Ces lactobacilles se sont avérés producteurs de composés « bacteriocin-like ». Parmi eux, on retrouve les composés produits par *Lactobacillus crispatus* 6L07 et *Lactobacillus jensenii* 5L08. Ils ont démontré une activité inhibitrice envers des souches de *Candida albicans* (Kaewsrichan *et al.*, 2006).

La bactériocine L23, produite par *Lactobacillus fermentum* L23, a été testée contre 15 souches de *Candida albicans*. Les résultats ont montré que 95 % des souches étaient inhibées par la bactériocine L23 (Pascual *et al.*, 2008).

Malgré ces études qui ont été effectuées, il y en a peu qui montrent l'effet des bactériocines sur les levures telles que *Candida albicans*. De plus, ces molécules antifongiques n'ont jamais fait l'objet de caractérisations poussées et on parle plus de « bacteriocin-like substances ».

1.6. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

1.6.1. Hypothèse

La nisine Z, produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719, a un effet inhibiteur sur les souches de *Candida albicans* à l'origine des infections pathologiques fongiques.

1.6.2. Objectifs

1.6.2.1. *Objectif général*

Le but de ce projet est d'étudier l'effet de la nisine Z produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719 sur des isolats cliniques de *C. albicans*.

1.6.2.2. *Objectifs spécifiques*

Objectif 1 : Produire, à grande échelle et avec un haut taux de pureté, la nisine Z produite par *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL719.

Objectif 2: Évaluer les effets de la nisine Z sur la croissance et sur le pouvoir pathogène de différents isolats cliniques de *C. albicans*.

CHAPITRE 2 :

NISIN Z INHIBITS THE GROWTH OF *C. ALBICANS* AND ITS TRANSITION FROM BLASTOSPORE TO HYPHAL FORM

Christophe Le Lay ^{1,2}, Boris Akerey ², Ismaïl Fliss ¹, Muriel Subirade ¹
and Mahmoud Rouabhia ²

Publié dans:
Journal of Applied Microbiology
volume105, issue 5 (2008) 1630–1639

1. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation,
Département des sciences des aliments et de nutrition, Pavillon Paul-Comtois, local 1413,
Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

2. Groupe de recherche en écologie buccale, Faculté de Médecine Dentaire,
Pavillon de Médecine dentaire, Université Laval, Québec, Canada G1K 7P4

2.1. RÉSUMÉ

Objectif: Étudier l'efficacité de la nisine Z, un peptide antimicrobien produit par certaines souches de *Lactococcus lactis*, contre la croissance et la transition de *C. albicans*.

Méthodes et résultats: *C. albicans* a été cultivées en présence de diverses concentrations de nisine Z (1000, 500 et 100 µg/ml) à différents moments. La croissance de *C. albicans* a été déterminée en utilisant la méthode d'Alamar Blue. La transition de la levure de la forme blastospore à la forme hyphale a été évaluée grâce à des observations au microscope optique. L'effet de la nisine Z sur l'ultrastructure *C. albicans* a été suivi par microscopie électronique à balayage et à transmission. Nos résultats montrent que la nisine Z inhibe la croissance de *C. albicans* à partir de 500 µg/ml. Cette inhibition est à la fois temps-et dose-dépendante. La nisine Z est également active contre la transition de *C. albicans* en inhibant de manière significative la transformation de la forme blastospore à la forme hyphale. Le traitement avec la nisine Z conduit à des perturbations de l'ultrastructure de *C. albicans*.

Conclusion: Nos résultats indiquent que la nisine Z réduit significativement la croissance et la transition de *C. albicans*. Ces effets peuvent avoir eu lieu grâce à des modifications ultrastructurales de cette levure.

Importance et impact: Pour la première fois, les effets de la nisine Z sur *C. albicans* ont été étudiés. Ces résultats suggèrent donc que la nisine Z aurait des propriétés antifongiques, et pourrait être utilisée comme une molécule antifongique.

2.2. ABSTRACT

Aim: To investigate the efficacy of nisin Z, an antimicrobial peptide produced by certain strains of *Lactococcus lactis* against *C. albicans* growth and transition.

Methods and results: *C. albicans* was cultured in the presence of various concentrations of nisin Z (1000, 500, and 100 µg/ml) for different time points. *C. albicans* growth was determined using the Alamar Blue assay. The yeast's transition from blastospore to hyphal form was assessed through optical microscope observations. The effect of nisin Z on *C. albicans* ultrastructure was followed by scanning and transmission electron microscopy. Our results show that nisin Z inhibited *C. albicans* growth beginning at 500 µg/ml. This inhibition was both time- and dose-dependent. Nisin Z was also active against *C. albicans* transition by significantly inhibiting the transformation of *C. albicans* from blastospore to hyphal form. Treatments with nisin Z lead to ultrastructural disturbances of *C. albicans*.

Conclusion: our findings indicate that nisin Z significantly reduced *C. albicans* growth and transition. These effects may have occurred through ultrastructural modifications of this yeast.

Significance and Impact: For the first time, nisin Z effect on *C. albicans* was investigated. These results therefore suggest that nisin Z may have antifungal properties, and could be used as an antifungal molecule.

2.3. INTRODUCTION

Candida species are the most common opportunistic fungal pathogens in humans, with *C. albicans* being the most prevalent pathogen in mucosal and systemic fungal infections (Pfaller *et al.*, 2002; Trick *et al.*, 2002). In addition to *C. albicans*, *C. glabrata* is now emerging as an important agent in both mucosal and bloodstream infections (Pfaller, 1996; Vazquez, 1999).

The *C. albicans* fungus causes both systemic and local disease. During the initiation of systemic candidiasis, blood-borne organisms invade the endothelial cell lining of the vasculature to infect deeper tissue. Fungal invasion of the superficial oral epithelial cells is a characteristic of oropharyngeal candidiasis (Farah *et al.*, 2000; Eversole *et al.*, 1997; Drago *et al.*, 2000). *C. albicans* invasion of host cells, such as oral epithelial cells, is necessary for the organism to damage these cell types *in vitro* (Filler *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2005). Host cell invasion and damage are likely critical virulence attributes of *C. albicans* (Park *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2004; Phan *et al.*, 2000; Chiang *et al.*, 2007). Candidiasis is treated with antifungal agents such as polyene antibiotics, flucytosine, and azoles (Bustamante, 2005; Kuriyama *et al.*, 2005). Currently available antifungals are limited in both number and level of effectiveness. The latter may be due to a lack of specific targets that make it possible to discriminate between eukaryotic fungal cells and mammalian cells. The clinical usefulness of these antifungals is also hampered by the undesirable side effects often associated with them and by the emergence of resistance to them (Kuriyama *et al.*, 2005; Pfaller *et al.*, 2005). Antifungal drug resistance is fast becoming a major concern for the growing number of immunocompromised individuals and has resulted in a dramatic increase in the incidence of opportunistic and systemic fungal infections. The rise in resistance and the changes in the spectrum of *Candida* infections have generated greater interest in the development of new antifungal drugs using multiple synthetic and natural molecules.

Nisin, an antimicrobial peptide of the lantibiotic family, is produced by a number of strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Breukink *et al.*, 1999; Carr *et al.*, 2002). This peptide has been used as a food preservative because of its high antibacterial activity and nontoxicity for humans (Breukink *et al.*, 1999a). Nisin is a ribosome-synthesized, post-translationally modified peptide characterized by intra-molecular rings formed by the rare thioether amino acids lanthionine and 3-methylanthionine (Gross *et al.*, 1971; Buchman *et al.*, 1988). Nisin shares some properties with other pore-forming antibacterial peptides, such as cationic peptides displaying a net positive charge and amphipathicity (Breukink *et al.*, 1999a; Garcera *et al.*, 1993). The mode of action of nisin involves an interaction with the membrane-bound cell wall precursor lipid II, concomitant with pore formation in the cytoplasmic membrane of the target organism (van Heusden *et al.*, 2002; Breukink *et al.*, 1999). Evidence shows that nisin displays high antibacterial activity against Gram-positive bacteria, and to a lesser extent, Gram-negative bacteria (van Heusden *et al.*, 2002; Breukink *et al.*, 1999b). Because nisin Z has been shown to react to bacteria, and as our quest was to find an antifungal agent with a possible reduced *Candida* resistance, we hypothesized that nisin Z had antifungal potential. Our goal was therefore to investigate the efficacy of nisin Z against *C. albicans* growth and transition from blastospore to hyphal form.

2.4. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.4.1. Bacterial strains and growth media

Lactococcus lactis subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* UL719 isolated from raw milk cheese (Djae *et al.*, 1995) was used as a nisin Z-producing strain (Meghrou, Lacroix, Bouksaim, LaPointe and Simard, 1997). *Pediococcus acidilactici* UL5, from our collection, was used as the indicator organism for the nisin Z activity assay (Bouksaim *et al.*, 1998). The bacterial cultures were maintained in 20 % glycerol stock at -80°C. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* UL719 and *Pediococcus acidilactici* UL5 were reactivated in MRS broth (De Man *et al.*, 1960) obtained from Difco Laboratories, Sparks, MD, USA. Each bacterial culture was cultivated overnight at 30°C. Prior to each

experiment, each bacterial strain was subcultured at least three times (inoculation at 1 %, v/v) at 24 hour intervals.

2.4.2. *C. albicans* cultures

Two clinical isolates of *C. albicans* strains were cultured in Sabouraud dextrose broth (Difco™, Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) supplemented with 0.1 % glucose at pH < 5.6. The cultures were grown to the stationary phase for 18 h at 37°C in a shaking water bath. The blastoconidia were collected, washed with PBS, counted using a hemocytometer (Rouabhia *et al.*, 2002), adjusted to 10³/ml, and used to test the performance of nisin Z at various concentrations.

2.4.3. Nisin Z production and purification

The standard procedure used for the purification of nisin Z is that described by Daoudi *et al.*, 2001. Briefly, 15 L of whey permeate (SWP) containing 6 % (w/v) dry whey permeate (Foremost Ingredients, Baraboo, WI, USA), 2 % (w/v) yeast extract (Rosell Institute, Montréal, QC, Canada), and 0.1 % Tween 80 (T80) (Sigma, St. Louis, MO, USA) was inoculated at 2 % (v/v) with an overnight culture of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* UL719 grown in MRS broth. The incubation was performed for 16 h in a 22 L bioreactor (Biogenie, Sainte-Foy, QC, Canada) at 30°C. Agitation was maintained during the fermentation at 70 rpm and the pH was controlled at 6 by the addition of 6 N NH₄OH (Amiali *et al.*, 1998). Following fermentation, the cells were removed by centrifugation at 8000 rpm for 40 min (Savant Instruments, Hicksville, NY, USA), and the supernatant was concentrated to 4 L by a lab-scale ultra filtration system (Model lab unit 1812, Filtration Engineering Co. Inc., New Hope, MN, USA) with a type PM1 1-kDa molecular mass cut-off membrane (Romico Inc., Woburn, MA, USA). Ammonium sulphate was slowly added at 4°C under constant stirring to reach 60 % saturation to precipitate the bacteriocin from the supernatant. Following centrifugation at 8000 rpm for 30 min, a small pellet and a

significant volume of floating aggregates were obtained. These two fractions contain most of nisin were combined and dialyzed three times for 24 h at 4°C against 20 L of 0.01 N HCl using a 1,000 Da molecular mass cut-off dialysis bag (Spectrum, Houston, TX, USA). The dialyzed sample was injected into a Sep-pack C₁₈ cartridge microcolumn (Waters, Milford, MA, USA) and eluted with a continuous gradient of acetonitrile (45-65 %). The fraction of nisin Z collected was concentrated by evaporation (Rotavapor RE111, Büchi, Flawil, Switzerland). The concentrated bacteriocin was then purified by reverse-phase liquid chromatography (RP-HPLC), as described by Meghrouh et al. (1997), using a preparative C₁₈ reverse phase column (Ultrasphere ODS, 5 mm diameter, Beckman, Mississauga, Ontario, Canada). The collected fraction of nisin Z was lyophilised (Freeze Dry System, Labconco, Kansas City, MO, USA), and stored in 10 mg aliquots at -80°C in a nitrogen atmosphere until use. Protein concentration was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, Calif.). The purity of the recovered nisin Z was confirmed by RP-HPLC with an analytical C₁₈ column (Table 2.1).

2.4.4. Assessment of bacteriocin activity

Bacteriocin activity was quantified by two different methods: the agar diffusion test and the critical-dilution micromethod.

Agar diffusion test: Bacteriocin activity was qualitatively determined by the agar well diffusion method, as described by Wolf *et al.*, 1996. Briefly, 25 ml of molten MRS containing 0.75 % (w/v) agar medium were cooled at 47°C and seeded with 1 % (v/v) of an overnight culture of *Pediococcus acidilactici* UL5. Seeded agar was then poured into a sterile Petri dish and allowed to solidify at room temperature. Wells (7 mm) were cut in the solidified agar using a sterile metal cork borer and were filled with 80 µl of sample of nisin Z. The plates were left at 4°C for 2 h to enable the diffusion of the tested aliquot and were then incubated at 30°C for 18 h, after which time the absence or presence and the diameter of the inhibition zones were determined.

Critical-dilution micromethod: Two-fold serial dilutions of 125 µl of tested sample were added to wells of a flat bottomed microtest™ polystyrene microplate (96 well microtest, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). Each well contained 125 µl of MRS

broth (Meghroun *et al.*, 1997). Each well was inoculated with 50 μ l of diluted 1000-fold *Pediococcus acidilactici* UL5 overnight culture (final concentration of approximately 10^6 UFC/ml). Plates were incubated at 30 °C for 18 h and absorbances at 650 nm were then measured using a Thermo-max molecular device spectrophotometer (OPTI-Resources, Quebec, PQ, Canada). Bacteriocin activity, expressed in arbitrary units per milliliter (AU/ml), was defined as the highest bacteriocin dilution showing complete inhibition of the indicator strain (absorbances equal to that in uninoculated medium), calculated as $AU/ml = 2^n \times (1000/125)$ where (n) is the number of wells showing inhibition of the indicator strain (Table 1).

2.4.5. Effect of nisin Z on *C. albicans* growth

a) *Assessment at later culture periods.* *C. albicans* was seeded in a 96 well plate at 10^3 *C. albicans* per well in Sabouraud dextrose broth. Each well was supplemented or not with nisin Z at 100, 500 and 1000 μ g/ml. For the positive control, *C. albicans* was cultured in the presence of 5 μ g/ml of amphotericin B, and for the negative control, *C. albicans* was cultured without nisin Z. The cultures were then incubated at 37°C for 24, 48 and 72 h. Following each culture period, *C. albicans* growth was assessed using the Alamar Blue™ (AB) test, a water-soluble dye that has been used to quantify the *in vitro* viability of various cells (Fields *et al.*, 1993; Ahmed *et al.*, 1994). This product is stable and non-toxic to cells (Ahmed *et al.*, 1994). When added to cell cultures, the oxidized form of AB enters the cytosol and converts to the reduced form by mitochondrial enzyme activity and by accepting electrons from NADPH, FADH, FMNH, and NADH, as well as from cytochromes. This redox reaction is accompanied by a color shift of the culture medium from indigo blue to fluorescent pink, which can be easily measured by fluorometric reading. The *C. albicans* cultures were incubated at 30°C for various times. Cell growth was evaluated by the reduction of the fluorochrome Alamar Blue™ (BioSource International, Camarillo, CA, USA), which was added to the wells (20 μ l) for an additional 4 h at 37°C (Zhi-Jun *et al.*, 1997). The fluorescence of the supernatants was monitored at an excitation wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm using a fluorometer

(Fluoroskan Ascent FL, Thermolabsystems, Brussels, Belgium). Each experiment was done in triplicate. The percentages of inhibition were calculated using the following equation:

$$\left(1 - \frac{\text{Fluorescence}_{\text{cells + sample}} - \text{Fluorescence}_{\text{medium}}}{\text{Fluorescence}_{\text{cells}} - \text{Fluorescence}_{\text{medium}}} \right) \times 100$$

b) *Assessment at early culture periods.* *C. albicans* was seeded in a 96-well plate at 10^3 *C. albicans* per well in Sabouraud dextrose broth. Each well was supplemented or not with nisin Z at 100, 500, and 1000 $\mu\text{g/ml}$. For the positive control, *C. albicans* was cultured in the presence of 5 $\mu\text{g/ml}$ of amphotericin B, and for the negative control, *C. albicans* was cultured without nisin Z. The cultures were incubated at 37°C for 4, 8, 12, 16, and 24 h. Following each culture period, *C. albicans* growth was assessed using the AB test, as described above. Each experiment was repeated 4 times.

2.4.6. Effect of nisin Z on *C. albicans* transition

One of the virulence factors for *C. albicans* is its phenotypical transition from blastospore to hyphal form. Clearly, a key to understanding the pathogenicity of this fungus lies in the regulatory processes that direct its transition and pathogenesis. Multiple factors promote *C. albicans* transition, including the presence of proteins (such as serum) in the culture medium. To determine the effect of nisin Z on the yeast-to-hyphae transition, *C. albicans* (10^6 cells) was grown in 1 ml of Sabouraud dextrose broth containing 20 % FBS (Fetal Bovine Serum). Nisin Z was added at various concentrations (100, 500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$). Control *C. albicans* cultures with and without FBS alone were included. Control *C. albicans* with FBS and 5 $\mu\text{g/ml}$ of amphotericin B was also included in our experimental model. The cultures were incubated at 37°C, observed microscopically at 3, 6 and 24 h, and photographed to record the blastospore-to-hyphae transition. To calculate the percentage of transition, three aliquots from each culture were used to determine the number of blastospores and hyphae by means of a hemocytometer and an optical microscope, as previously described (Rouabhia *et al.*, 2002). The percentage of transition was determined using the following formula:

$$\frac{\text{Number of hyphae}}{\text{Number of blastospores + hyphae}} \times 100$$

2.4.7. Ultrastructural investigations

2.4.7.1. Scanning electron microscopy

C. albicans was fixed in 3 % (v/v) glutaraldehyde in PBS (pH 7.4) and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (10 %, v/v, increments to 100 %). A drop was placed onto a round glass coverslip for critical-point drying (CPD 030; Balzers, Liechtenstein, Germany). The sample was mounted onto an aluminum slab using silver paint (Agar Scientific). Sputter coating was performed (S150B, Edwards, London, United Kingdom) and the image was viewed using a scanning electron microscope (Jeol JSM 6360 LV (Soquelec, Montréal, QC, Canada).

2.4.7.2. Transmission electron microscopy

C. albicans was fixed in cacodylate buffer, pH 6.9, containing 1 % (v/v) paraformaldehyde and 2 % (v/v) glutaraldehyde, for 1 h at 4°C. The suspensions were centrifuged and dehydrated in successive washes of ethanol for 30 min. The *C. albicans* pellets were embedded in Spurr resin and ultra-thin sections were obtained (Ultratome III, LKB, Bromma, Sweden). These sections were then mounted onto a 0.5 % Pioloform (in chloroform)-coated 3.05 mm copper grid and stained with 3 % aqueous uranyl acetate and 0.1 % lead citrate prior to imaging by means of a transmission electron microscope (1200, JEOL).

2.4.8. Statistical analysis

Each experiment was performed at least three times. Experimental values are given as means \pm SD. The statistical significance of the differences between the control and test values was evaluated using a one-way ANOVA t-test. The data were analyzed using the SAS version 8.2 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

2.5. RESULTS

2.5.1. Nisin Z reduced *C. albicans* growth

C. albicans cultures were incubated with nisin Z for 24, 48 and 72 h to determine whether the bacteriocin had any adverse effect on *C. albicans* growth. As shown in Figure 2.1, nisin Z reduced *C. albicans* proliferation. After 72 h of contact with nisin Z, the growth inhibition of *C. albicans* ranged between 30 and 40 %, depending on the concentration of nisin Z used, while after 48 h, the inhibition ranged between 30 and 45 %, also depending on the amount of nisin Z used. After 24 h of contact with nisin Z, the results were highly revelatory. In the presence of a high concentration of nisin Z, *C. albicans* growth inhibition was over 70 %, and even at a low concentration, we observed an over 50 % reduction in *C. albicans* growth. Treatment of nisin Z with proteinase-K inhibited nisin Z effect on *Candida* growth (data not shown). These unique results show that nisin Z was indeed effective against *C. albicans* growth, with a higher effect recorded at 24 h post-contact with the bacteriocin. It was therefore very interesting to investigate *C. albicans* growth in the presence of nisin Z at the early culture periods. As shown in Figure 2.2, the effect of nisin Z on *C. albicans* growth began at 16 h and reached its maximum at 24 h where we observed a significant growth inhibition of *C. albicans* with even a small concentration of nisin Z. The overall results suggest the usefulness of nisin Z as an antifungal agent for potential clinical applications to control *Candida* infections.

2.5.2. Nisin Z-inhibited germ tube formation by *C. albicans*

C. albicans cultures were supplemented with 20 % FBS. Nisin Z was added simultaneously with the FBS, and the cultures were then maintained for various incubation periods. As shown in Figure 2.3, germ tube formation was significantly reduced ($p < 0.01$) as early as 3 h, compared to that observed with the untreated cultures. The inhibition of germ tube formation was significant ($p < 0.05$, $p < 0.01$) at high concentrations of nisin Z (500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$, respectively; Figure 2.3). At low concentrations (100 $\mu\text{g/ml}$), nisin Z had no inhibitory effect on *C. albicans* transition. Interestingly, at 500 and 1000 $\mu\text{g/ml}$, the inhibition of *C. albicans* transition from blastospore to hyphal form was maintained over time. Although the inhibition was very high at 3 h post-contact with nisin Z, a significant ($p < 0.01$) inhibition of *C. albicans* transition was also observed at 6 h and 24 h. These results demonstrate for the first time that nisin Z is active against the transition of *C. albicans*, suggesting the usefulness of nisin Z as an antifungal agent. Further studies will still needed to shed light on the cellular and molecular effect of nisin Z against *C. albicans* infection.

2.5.3. Effect of nisin Z on *C. albicans* ultrastructure

2.5.3.1. Scanning electron microscopy

Aerobic growth of *C. albicans* cells in Sabouraud medium at 37°C showed typical yeast cells displaying the characteristic bud scars (Figure 2.4a). No development of pseudohyphae (chains of elongated unseparated blastospores) was observed in the cultures with or without nisin Z or amphotericin B. Following the addition of nisin Z, the external morphology of the cells did not appear as smooth as that of the untreated cells, which indicates a possible loss of cytosolic volume. Indeed, nisin Z basically distorted the cell wall surface at high concentrations (Figures 2.4d and e). Interestingly, the membrane shape of *C. albicans* cultured in the presence of nisin Z did not resemble that observed in the presence of amphotericin B, which suggests that nisin Z had a definite effect on the *C. albicans* membrane, contrary to the effect by the amphotericin B. Pseudohyphae were

not observed at any of the concentrations of nisin Z used in our study. The untreated and treated cultures alike produced no true hyphae (presence of septa between the elongated cells).

2.5.3.2. Transmission electron microscopy

Incubation of *C. albicans* in the presence of nisin Z caused notable alterations in the internal morphology, compared to the control cells (Figure 2.5). Non-treated *C. albicans* displayed a normal cellular morphology with typical dense cytoplasm and a distinct cell wall. However, after 24 h with nisin Z (Figure 2.5), large, irregular cytoplasmic vacuoles were detected (Figures 2.5b, c and d). Peripheral vacuoles were present that were not visible in organisms from the control culture (Figure 2.5a compared to Figures 2.5b, c and d). Treatment with nisin Z also resulted in the increased granulation of the cytoplasm and diminished cell membrane definition with increasing concentrations (Figures 2.5b, c and d) in comparison with the control (Figure 2.5a).

2.6. DISCUSSION

An increasing number of antimicrobial peptides with *in vitro* activity against bacterial human pathogens (Montesinos, 2007) have been proposed as an alternative in the development of novel anti-bacterial disease control strategies (Jaynes *et al.*, 1987; Rao, 1995; Lopez-Garcia *et al.*, 2000). Comparative needs have also been identified in the field of fungal pathogenesis control. As some available antifungal agents are ineffective (in terms of resistance) and may cause significant side effects, the medical community is turning their interest toward new anti-fungal molecules. In this context, we investigated the efficacy of nisin Z in *Candida*, with the primary focus being the control of *C. albicans* growth in the presence of nisin Z. This peptide slowed the growth control properties of *C. albicans* at early and late culture periods, with a higher inhibitory effect observed at the longest contact period. This led us to two hypotheses: Either nisin Z was stable, remaining active for a long period of time and affecting the growth of *C. albicans* up to 72 h, or the

peptide modulated the yeast's growth mechanism at the early contact period, and this effect was prolonged over a long period. The mechanism engaged by nisin Z on *C. albicans* growth at longer culture periods therefore definitely warrants further investigation. Although the growth inhibition with nisin Z was less than that obtained with amphotericin B, the results were nevertheless very interesting. Study is in progress to investigate the possible synergistic effect of amphotericin B and nisin Z against *C. albicans* growth. These data are in accordance with previously reported findings (Okkers *et al.*, 1999), where *C. albicans* activity was downregulated by pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus*. On the other hand, *Candida* growth inhibition seems to be induced by isolated nisin Z but not isolated oral Lactic acid bacteria (Topisirovic *et al.*, 2006). With our results, and because nisin Z had no effect on *C. albicans* at the exponential phase, we further suggest that nisin Z acted on the non-dividing (stationary phase) of *C. albicans*. The antifungal activity of nisin Z seems to be limited to *C. albicans*. Indeed, it has been reported that nisin A was inactive against *Saccharomyces cerevisiae* (Dielbandhoesing *et al.*, 1998). Further study is needed to assess the effect of nisin A on *C. albicans*, and nisin z on *Saccharomyces cerevisiae*. *C. albicans* pathogenesis can also occur through the transition from blastospore to hyphae (Felk *et al.*, 2002; Korting *et al.*, 2003). We observed that nisin Z decreased *C. albicans* transition, and although this inhibition was not total, nisin Z may nevertheless show potential as an active molecule against *C. albicans* infections. This study is in agreement with another work in which supernatant collected from lactic acid bacterial cultures downregulated *C. albicans* activity (Sookkhee *et al.*, 2001). Also Okkers *et al.* (1999) showed that pentocin, a bacteriocin-like peptide extracted from *Lactobacillus pentosus*, has an inhibitory effect on *C. albicans* growth, yet a stimulating effect on its transition. The effect of nisin Z on *C. albicans* growth and transition may be confirmed by *C. albicans* morphological changes, as nisin Z-treated *C. albicans* did in fact display changes in cell morphology that are comparable to those obtained with garlic (Lemar *et al.*, 2002). The observed morphological change is supported by our ultrastructural analyses which showed that nisin Z-treated *C. albicans* displayed highly vacuolated cells. This is in agreement with previously reported studies using Ciclopirox olamine treatment (Niewerth *et al.*, 2003). *C. albicans* causes multiple forms of candidiasis such as oral, ocular and vaginal candidiasis. Like other fungal

infections vulvovaginal candidiasis is a significant problem affecting 75 % of all women at least once during their lifetime (Sobel *et al.*, 1998). The efficacy of a new molecule like nisin Z against *Candida* infections could be an important medical advance. In conclusion, our findings indicate that nisin Z significantly reduced *C. albicans* growth and transition. These effects may have occurred through ultrastructural modifications of this yeast. Further research will be necessary before nisin Z can be considered as a valuable addition to the arsenal of antifungal drugs.

2.7. ACKNOWLEDGMENTS

This study was financially supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (Collaborative Health Research Projects (CHRP) program), and a grant from NSERC-discovery program.

Table 2.1. Nisin Z recovery following extraction and purification.

	Volume (ml)	Protein (mg)	Total activity (AU/mg protein)	Specific activity (AU/mg)	Nisin Z* (mg)	Recovery (%)
Fermented medium	15,000	55960	4.95×10^7	884	618	100
Ultrafiltered supernatant	4,000	21196	4.90×10^7	2207	612	99
Sep-Pak C ₁₈ eluate	300	584	1.67×10^7	286815	123	20
RP-HPLC eluate	70	130	3.20×10^7	307692	104	17

* Nisin Z (mg) was quantified by the microtitration test using standards of pure nisin Z concentrations. (AU) refers to arbitrary units; Recovery (%) was obtained by dividing the amount (mg) of nisin Z obtained after ultrafiltration by the amount (mg) nisin Z obtained in fermented medium.

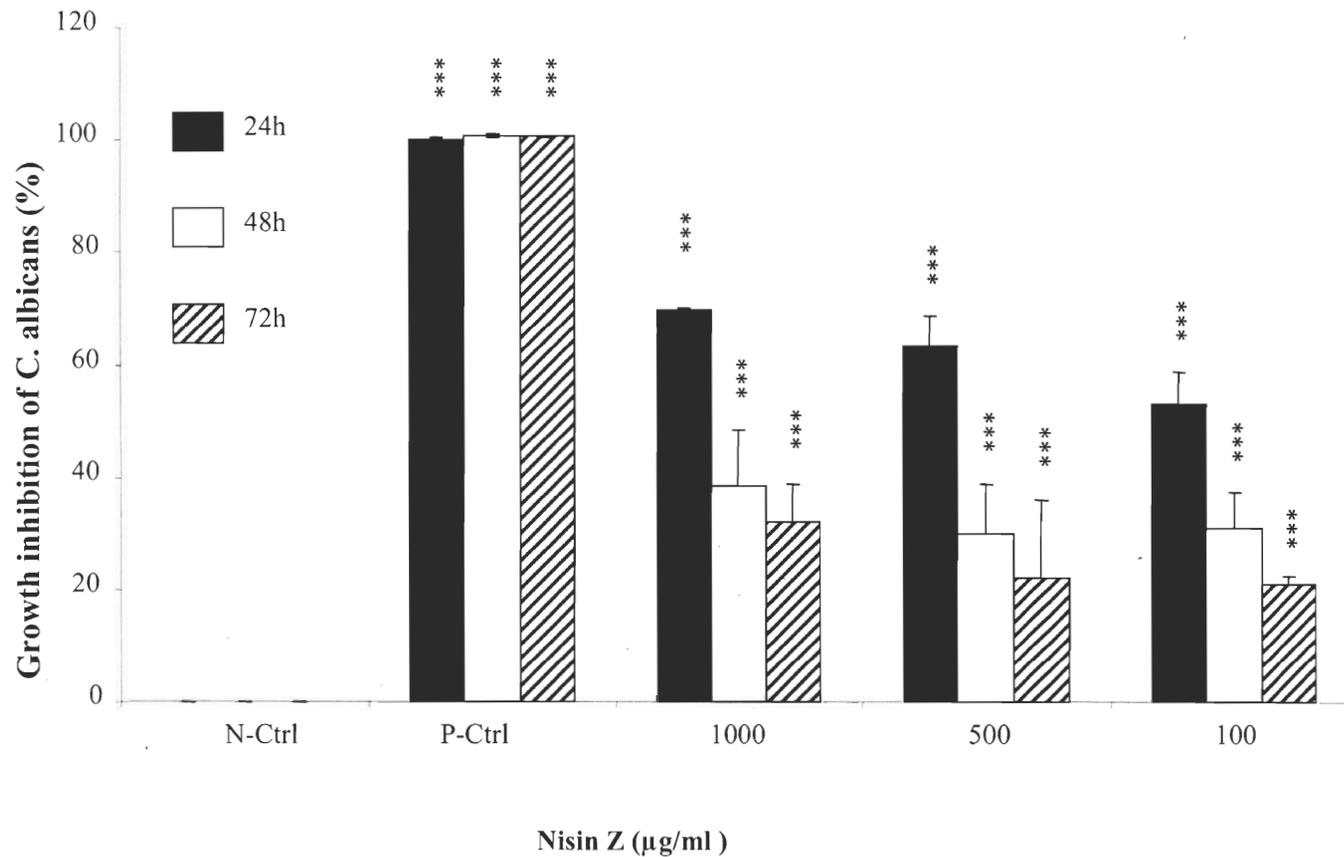


Figure 2.1. Later effect of nisin Z on *C. albicans* growth. The yeast was seeded in 96 well plates and cultured in Sabouraud supplemented with or without nisin Z at various concentrations. The cultures were maintained for 24, 48 and 72 h at 37°C. Following each culture period, the Alamar Blue test was performed on each well and the results were plotted as the means \pm SD for 3 separate experiments. The levels of significance for *C. albicans* growth in the presence of nisin Z compared to growth in the absence of nisin Z were $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**). N-Ctrl refers to *C. albicans* growth without nisin Z; P-Ctrl refers to *C. albicans* growth in the presence of amphotericin B (5µg/ml).

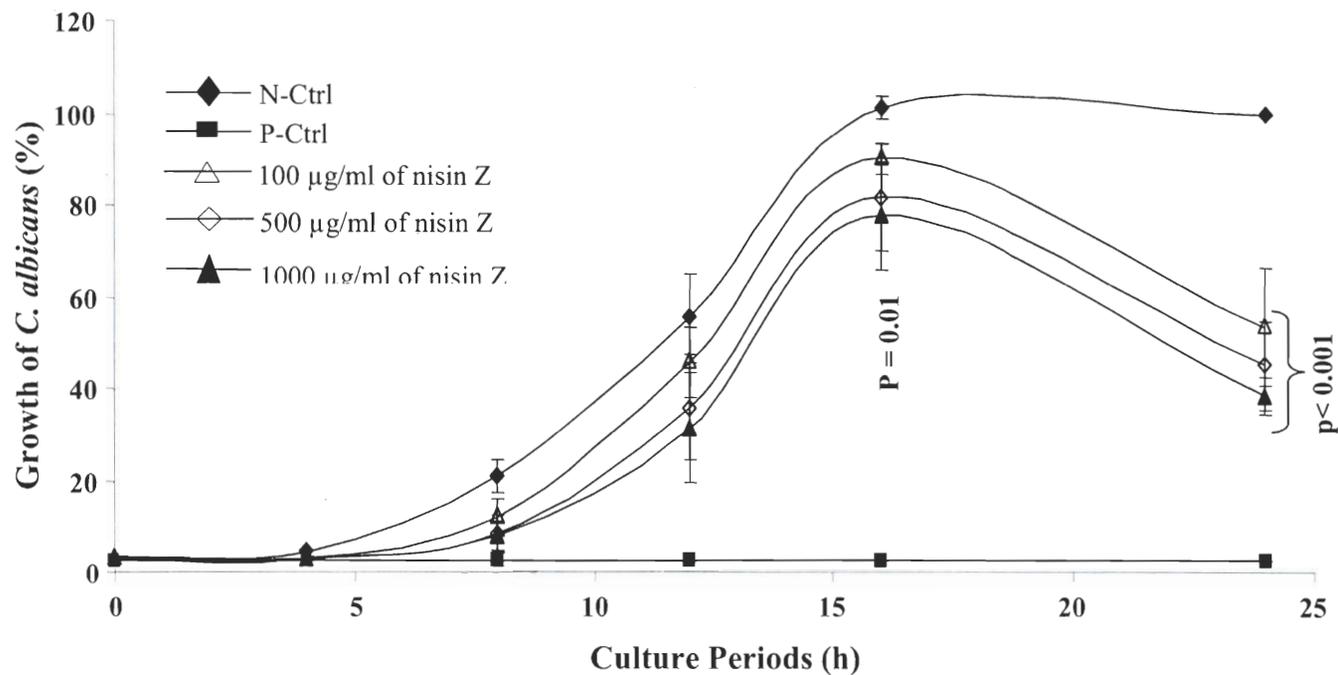


Figure 2.2. Early effect of nisin Z on *C. albicans* growth. The yeast was seeded in 96 well plates and cultured in Sabouraud supplemented with or without nisin Z at various concentrations. The cultures were maintained for 4, 8, 12, 16 and 24 h at 37°C. Following each culture period, the Alamar Blue test was performed on each well and the results were plotted as the means \pm SD for 3 separate experiments. The levels of significance for *C. albicans* growth in the presence or absence of nisin Z are compared. N-Ctrl refers to *C. albicans* growth without nisin Z; P-Ctrl refers to *C. albicans* growth in the presence of amphotericin B (5µg/ml).

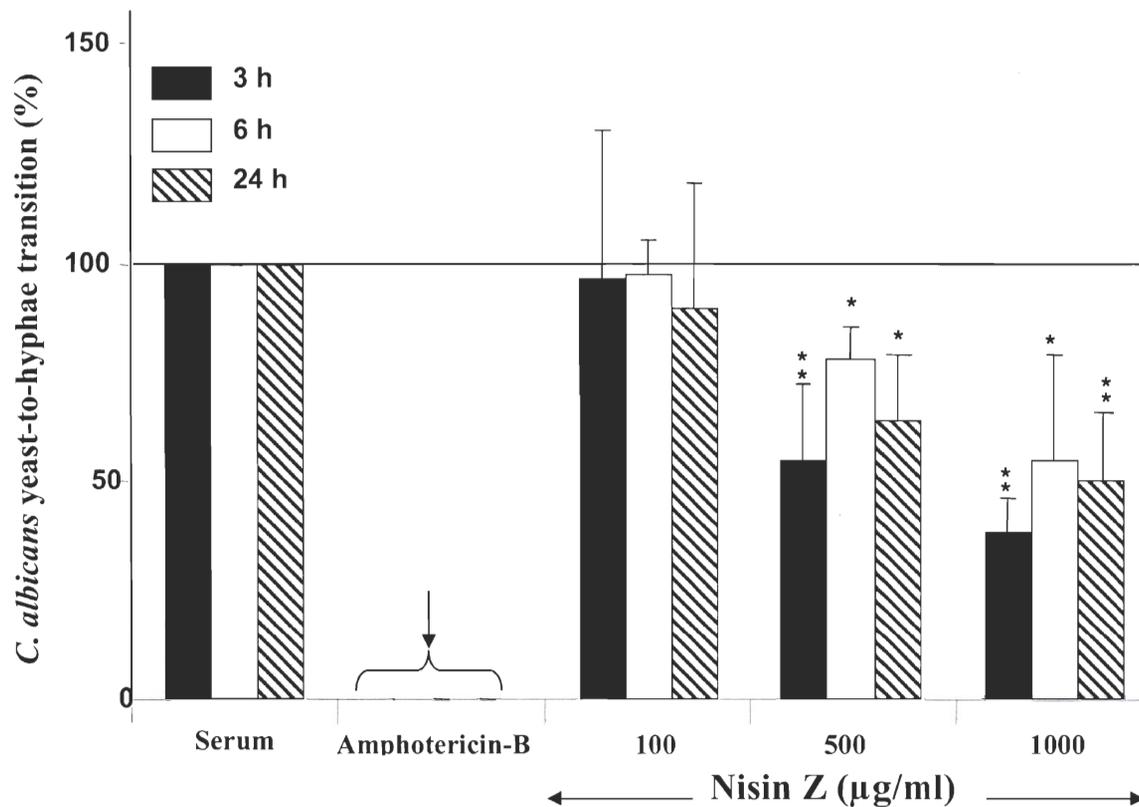


Figure 2.3. Effect of nisin Z on *C. albicans* yeast-to-hyphae transition. *C. albicans* was cultured in Sabouraud dextrose broth containing 20 % FBS with or without nisin Z at various concentrations (100, 500 and 1000 µg/ml) and maintained for 3, 6 and 24 h at 37°C. Following each culture period, the numbers of yeast and hyphal forms were counted. The percentage of hyphae was obtained by dividing the number of hyphae by the total number of cells (blastospores and hyphae) in each culture. The mean relative values for 3 separate experiments are shown. The levels of significance for the percentage of yeast-to-hyphae transition in the presence or absence of nisin Z are compared.

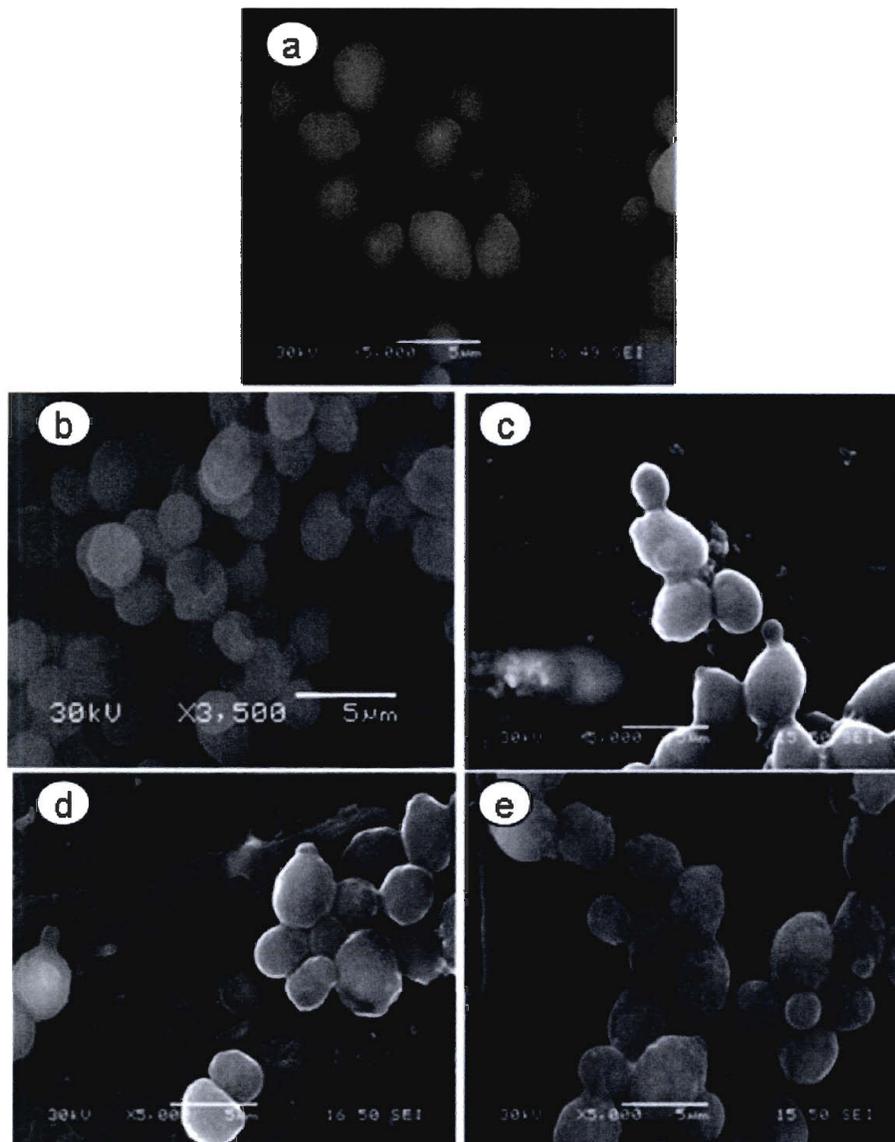


Figure 2.4. Scanning electron micrographs of *C. albicans* with or without nisin Z. *C. albicans* (10^3) cultured in Sabouraud medium was treated with nisin Z at various concentrations for 24 h. Non-treated *C. albicans* cultures (a) and amphotericin-B (5 µg/ml)-treated *C. albicans* cultures (b) were used as controls. Following incubation, *C. albicans* was prepared as described in the Materials and Methods and observed under a scanning electron microscope. *C. albicans* was incubated with various concentrations of nisin Z at 100 µg/ml (c), 500 µg/ml (d), and 1000 µg/ml (e) overnight at 37°C. Bar = 5 µm.

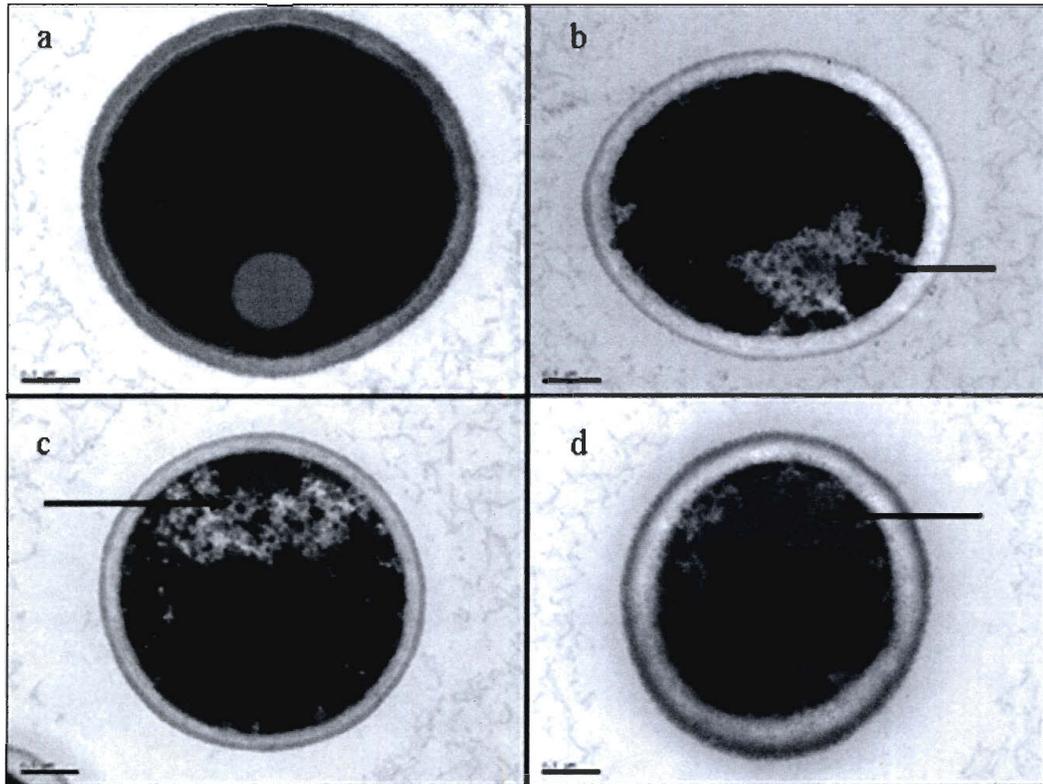


Figure 2.5. Transmission electron micrographs of *C. albicans* with or without nisin Z. *C. albicans* (10^3) cultured in Sabouraud medium was treated with nisin Z at various concentrations for 24 h. Non-treated *C. albicans* cultures (a) were used as controls. Following incubation, *C. albicans* was prepared as described in the Materials and Methods and observed under a transmission electron microscope. (a) untreated control; (b) 100 $\mu\text{g/ml}$; (c) 500 $\mu\text{g/ml}$; (d) 1000 $\mu\text{g/ml}$ of nisin Z. Note the increased granulation of cytosol and the appearance of peripheral vacuoles (arrows) in the presence of nisin Z. Bar = 0.5 μm .

CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE

Les pathologies fongiques ont une incidence qui a augmenté au cours des deux dernières décennies (Barnerjee *et al.*, 1991; Pfaller *et al.*, 2000). Cette augmentation est paradoxalement due au succès de la médecine moderne. En effet, certaines populations telles que les patients immunodéprimés (prématurés, personnes souffrant du syndrome d'immunodéficience acquise, grands brûlés) ont vu leur espérance de vie augmenter. De plus, le développement d'interventions médicales invasives et les traitements à l'aide d'antibiotiques sont des actes médicaux ayant créé des classes de patients susceptibles de développer une mycose.

Pour traiter ces infections fongiques comme celles causées par *C. albicans*, on a recours à des molécules antifongiques. Ces molécules chimiques ont un usage limité en santé humaine, car elles sont toxiques et engendrent des effets secondaires (Georgopapadakou *et al.*, 1994). Un fait inquiétant pour la communauté médicale est l'apparition de résistance à ces molécules antifongiques utilisées. Certaines souches de *C. albicans* ont démontré une résistance à certains antifongiques sans doute causée par leur usage excessif chez l'homme.

Le développement de nouvelles thérapies alternatives devient une priorité pour le secteur de la santé. Parmi les alternatives envisageables, l'usage de bactériocines qui par leurs cotés naturels, leurs aspects non toxiques et leurs larges spectres d'action pourraient représenter une solution prometteuse en remplacement des antifongiques traditionnels.

Le but de cette étude était d'évaluer l'efficacité de la nisine Z, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis* ssp *lactis* biovar *acetylactis* UL719, sur des souches de *C. albicans*.

Avant d'évaluer l'efficacité de la nisine Z sur *C. albicans*, il a fallu mettre au point une méthode de quantification de la croissance de *C. albicans*. Notre choix s'est arrêté sur la méthode utilisant l'« Alamar Blue ». Cette méthode permet de quantifier *in vitro* la viabilité de la cellule. Le produit est mis en présence des cellules. La forme oxydée de l'« Alamar Blue » pénètre dans le cytoplasme et est converti en forme réduite par l'activité

mitochondriale. La forme réduite permet la quantification, par émission de fluorescence, par comparaison avec un contrôle.

L'efficacité de la nisine Z sur les souches de *C. albicans* a été évaluée en les mettant en présence (absence pour le contrôle) de différentes concentrations de nisine Z pour différents temps d'incubation. Les résultats obtenus ont montré que les souches en présence de nisine Z semblaient avoir une croissance réduite. Cette réduction varie entre 55 et 70 % d'inhibition pour les concentrations allant de 100 à 1000 µg/ml. Cette inhibition s'observe aussi au cours du temps et est visible même après une longue incubation de 72 h. De plus, en effectuant une cinétique de croissance pendant 24 h en absence et en présence de nisine Z, on peut voir que la nisine Z a un léger effet sur la croissance au début du cycle ce qui correspond à la phase de latence, qu'elle n'a aucun effet pendant la phase exponentielle, mais que son effet est marqué pendant la phase stationnaire.

À partir de ces observations, on peut émettre certaines hypothèses. D'abord, la nisine Z a une activité inhibitrice sur les souches de *Candida albicans* utilisées. Ensuite, cette bactériocine est stable et reste active sur une période de 72 h. Finalement, elle affecte la croissance de *C. albicans* surtout en phase stationnaire.

L'activité inhibitrice de la nisine Z sur les souches de *Candida albicans* est un résultat encourageant, car pour l'instant aucune étude n'avait montré cette propriété. Ce constat peut avoir une raison simple. En effet, la caractérisation d'une nouvelle bactériocine passe par la vérification de son activité inhibitrice contre un éventail de souches bactériennes ainsi que contre des levures comme *C. albicans*. Généralement, aucune activité n'est détectée. Cependant, dans certains cas, il est possible d'en observer une très faible, ceci étant sûrement causé par la faible précision de la méthode utilisée, qui est le plus souvent le test d'activité sur gélose. Cette technique est qualitative et non quantitative, donc peu précise. Notre étude a permis de mettre en évidence l'activité inhibitrice de la nisine Z sur la souche de *C. albicans*, grâce au choix d'une bonne méthode permettant de quantifier l'inhibition de *C. albicans* de façon précise.

Les résultats obtenus sur l'inhibition de *C. albicans* par la nisine Z ne peuvent, par contre, pas être extrapolés pour les autres levures comme pour le genre *Saccharomyces*. En effet, il a été montré que la nisine A n'avait pas d'activité inhibitrice contre *Saccharomyces cerevisiae* (Dielbandhoesing *et al.*, 1998). Bien entendu, la nisine A et la nisine Z ne sont pas identiques, car différent d'un acide aminé (Mulders *et al.*, 1991). Cette différence étant, nous devons investiguer sur l'efficacité de la nisine Z sur d'autres levures comme *Saccharomyces* et ainsi savoir si la nisine Z a le même effet que sur *C. albicans*.

On peut remarquer que l'inhibition obtenue avec la nisine Z sur *C. albicans* est plus faible que celle observée avec l'amphotéricine B, un antifongique conventionnel utilisé pour le traitement de candidose. Malgré cette différence d'efficacité, l'usage de nisine Z peut être prometteur pour le traitement de candidoses. En effet, lorsque utilisée en combinaison avec l'amphotéricine B, la nisine Z permettrait, dans le cas d'une synergie entre eux, une réduction des doses d'antifongiques chimiques et donc une réduction des effets néfastes et secondaires de ces derniers. Plus particulièrement, l'utilisation combinée avec de la nisine Z pourrait réduire les phénomènes de résistance observés pour les antifongiques, car les microorganismes ciblés seront moins exposés à de grandes doses d'antifongiques.

L'observation en microscopie électronique à balayage des souches de *C. albicans* en présence ou en absence de nisine Z nous a permis de voir les différences d'ultrastructure. La présence de nisine Z affecte la paroi cellulaire. Elle n'est plus lisse, mais présente des défauts qui vont jusqu'à la présence de fissures, ce qui pourrait être dû à son effondrement. Ces observations sont les mêmes suivant la concentration de nisine Z utilisée et l'effet est plus accentué pour les plus fortes concentrations. Étant donné le manque de résultats dans la littérature des effets des bactériocines sur *Candida albicans*, nous avons comparé nos résultats obtenus avec des résultats similaires rapportés dans l'étude de l'effet d'extrait d'ail sur *C. albicans*. Cette étude a montré aussi une détérioration de la paroi cellulaire après un traitement avec des extraits d'ail (Lemar *et al.*, 2002). Les observations obtenues par microscopie électronique à transmission montrent aussi des changements au niveau des cellules ayant subies des traitements avec la nisine Z par rapport aux cellules sans traitements. On peut voir que la morphologie interne de la cellule est différente. Il y a

apparition de vacuoles qui sont larges et irrégulières. On peut aussi observer une augmentation de la granulation du cytoplasme quand la cellule a été incubée en présence de nisine Z. Ces observations sont visibles pour toutes les concentrations utilisées avec un effet plus marqué aussi lorsqu'on augmente les concentrations de nisine Z. Ces résultats sont aussi comparables à ceux obtenus dans l'étude sur l'extrait d'ail (Lemar *et al.*, 2002).

Un autre aspect de l'étude que nous avons effectuée était d'évaluer l'effet de la nisine Z sur la transformation de *C. albicans* de la forme blastospore à la forme hyphe. Ce changement de forme est une des caractéristiques de la virulence de *C. albicans*. Pour obtenir ce changement de forme, il suffit d'engendrer le stress cellulaire, comme dans notre cas, l'usage de sérum bovin dans le milieu de culture. Une fois que la souche de *C. albicans* est mise en présence de sérum, on observe de nombreuses cellules sous la forme hyphe. Les souches ont été mises en présence de sérum et de différentes concentrations de nisine Z. Les résultats nous montrent que la nisine Z réduit ce changement de forme que pour des concentrations élevées (1000 et 500 $\mu\text{g/ml}$), car pour la concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ de nisine Z, la réduction n'est pas significative par rapport au contrôle (souche en présence de sérum, mais en absence de nisine Z). On remarque aussi que l'effet de la nisine Z sur la transformation de *C. albicans* a une action qui est maintenue dans le temps. Ces résultats nous confortent pour dire que la nisine Z a un fort potentiel pour le traitement d'infections à *C. albicans*. En effet, la nisine est capable d'inhiber la croissance et la transformation de *C. albicans*.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Candida albicans est le principal responsable des candidoses (buccales, vaginales...). Ces candidoses affectent différents types de personnes comme celles infectées par le VIH ou les grands brûlés. Pour traiter ces infections, on dispose de molécules chimiques antifongiques, mais leurs utilisations sont limitées à cause de leur toxicité et des effets secondaires qu'elles engendrent. Un autre élément inquiétant avec ces antifongiques est l'apparition de résistance à ces molécules. En effet, les instances médicales rapportent l'émergence de souches devenues résistantes. Il est donc urgent de trouver de nouvelles alternatives pour le traitement de ces infections à *C. albicans*.

Le but de ce présent travail était donc d'évaluer le potentiel antifongique de bactériocines produites par des bactéries lactiques pour lutter contre ces infections à *C. albicans*. Le choix des bactériocines a été pris pour leurs cotés naturels, leurs aspects non toxiques et leurs larges spectres d'action.

Deux facteurs ont été évalués. Le premier était l'effet de la nisine Z sur la croissance de *C. albicans* et le second était l'effet de la nisine Z sur sa transformation en forme d'hyphe, qui est un des facteurs de virulence de *C. albicans*.

Nous avons montré que la nisine Z inhibait la croissance de *C. albicans* aux concentrations utilisées et que l'effet était maintenu pendant un temps prolongé de 72 h. On a pu aussi remarquer que l'action de la nisine Z se faisait surtout lors de la phase stationnaire. De plus, l'observation microscopique a confirmé l'effet de la nisine Z sur *C. albicans*. Nous avons aussi montré que la nisine Z inhibait la transformation de *C. albicans* de la forme de blastospore à la forme d'hyphe. Cette inhibition n'a pas été observée pour les concentrations inférieures à 100 µg/ml. Ces résultats nous montrent que la nisine Z a un fort potentiel pour le traitement des infections fongiques causées par *C. albicans*.

Dans de prochaines investigations, il serait intéressant de voir s'il peut y avoir un effet synergique entre la nisine Z et les antifongiques traditionnels comme l'amphotéricine B. En cas de synergie, on pourrait réduire les doses administrées, et ainsi, diminuer leurs effets néfastes et ralentir les phénomènes de résistances dus à la surexposition aux antifongiques. D'un point de vue fondamental, il serait intéressant d'élucider le mode d'action de la nisine Z sur *C. albicans*. Mais avant d'utiliser la nisine Z, dans le cas de candidose buccale, comme alternative aux antifongiques traditionnels, il va falloir faire l'étude de l'impact de celle-ci au niveau de la flore buccale et aussi au niveau de l'interaction avec les cellules de la muqueuse buccale. En effet, il serait désastreux que le but recherché, qui est d'inhiber *C. albicans*, induise également l'inhibition de la flore indigène et/ou une toxicité sur les cellules de la muqueuse.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AbiSaid, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski and S. Vartivarian (1997). "The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species." *Clinical Infectious Diseases* **24**(6): 1122-1128.
- Ahmed, S. A., R. M. Gogal and J. E. Walsh (1994). "A new rapid and simple nonradioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes - an alternative to [H-3] thymidine incorporation assay." *Journal of Immunological Methods* **170**(2): 211-224.
- Akpan, A. and R. Morgan (2002). "Oral candidiasis." *Postgraduate Medical Journal* **78**(922): 455-459.
- Amiali, M. N., C. Lacroix and R. E. Simard (1998). "High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration." *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**(6): 887-894.
- Banerjee, S. N., T. G. Emori, D. H. Culver, R. P. Gaynes, W. R. Jarvis, T. Horan, J. R. Edwards, J. Tolson, T. Henderson and W. J. Martone (1991). "Secular trends in nosocomial primary blood-stream infections in the United-States, 1980-1989." *American Journal of Medicine* **91**: S86-S89.
- Barchiesi, F., D. Calabrese, D. Sanglard, L. F. Di Francesco, F. Caselli, D. Giannini, A. Giacometti, S. Gavaudan and G. Scalise (2000). "Experimental induction of fluconazole resistance in *Candida tropicalis* ATCC 750." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(6): 1578-1584.
- Barker, K. S., S. Crisp, N. Wiederhold, R. E. Lewis, B. Bareither, J. Eckstein, R. Barbuch, M. Bard and P. D. Rogers (2004). "Genome-wide expression profiling reveals genes associated with amphotericin B and fluconazole resistance in experimentally induced antifungal resistant isolates of *Candida albicans*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **54**(2): 376-385.
- Barrettbee, K., Y. Hayes, R. G. Wilson and J. F. Ryley (1985). "A comparison of phospholipase-activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts." *Journal of General Microbiology* **131**(May): 1217-1221.
- Bennett, J. E. (1974). "Chemotherapy of systemic mycoses (First of 2 Parts)." *New England Journal of Medicine* **290**(1): 30-32.
- Bernard, M. and J. P. Latge (2001). "*Aspergillus fumigatus* cell wall: composition and biosynthesis." *Medical Mycology* **39**: 9-17.

- Bierbaum, G. and H. G. Sahl (1988). "Influence of Cationic Peptides on the Activity of the Autolytic Endo-Beta-N-Acetylglucosaminidase of *Staphylococcus Simulans* 22." *Fems Microbiology Letters* **58**(2-3): 223-227.
- Bolard, J. (1986). "How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties." *Biochimica Et Biophysica Acta* **864**(3-4): 257-304.
- Borg-von Zepelin, M., S. Beggah, K. Boggian, D. Sanglard and M. Monod (1998). "The expression of the secreted aspartyl proteinases Sap4 to Sap6 from *Candida albicans* in murine macrophages." *Molecular Microbiology* **28**(3): 543-554.
- Borgers, M. (1980). "Mechanism of action of antifungal drugs, with special reference to the imidazole derivatives." *Reviews of Infectious Diseases* **2**(4): 520-534.
- Bouksaim, M., I. Fliss, J. Meghrou, R. Simard and C. Lacroix (1998). "Immunodot detection of nisin Z in milk and whey using enhanced chemiluminescence." *Journal of Applied Microbiology* **84**(2): 176-184.
- Bowman, J. C., P. S. Hicks, M. B. Kurtz, H. Rosen, D. M. Schmatz, P. A. Liberator and C. M. Douglas (2002). "The antifungal echinocandin caspofungin acetate kills growing cells of *Aspergillus fumigatus* *in vitro*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**(9): 3001-3012.
- Brajtburg, J. and J. Bolard (1996). "Carrier effects on biological activity of amphotericin B." *Clinical Microbiology Reviews* **9**(4): 512-531.
- Breukink, E. and B. de Kruijff (1999). "The lantibiotic nisin, a special case or not?" *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1462**(1-2): 223-234.
- Breukink, E., I. Wiedemann, C. van Kraaij, O. P. Kuipers, H. G. Sahl and B. de Kruijff (1999). "Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic." *Science* **286**(5448): 2361-2364.
- Brotz, H., G. Bierbaum, K. Leopold, P. E. Reynolds and H. G. Sahl (1998). "The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**(1): 154-160.
- Bruno, M. E. C. and T. J. Montville (1993). "Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(9): 3003-3010.
- Buchman, G. W., S. Banerjee and J. N. Hansen (1988). "Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic." *Journal of Biological Chemistry* **263**(31): 16260-16266.
- Bustamante, C. I. (2005). "Treatment of *Candida* infection: a view from the trenches!" *Current Opinion in Infectious Diseases* **18**(6): 490-495.

- Calderone, R. A. (2002). Taxonomy and biology of *Candida*. *Candida and Candidiasis*. R. A. Calderone. Washington, D.C., ASM press: 15-27.
- Cannon, R. D. and W. L. Chaffin (1999). "Oral colonization by *Candida albicans*." *Crit Rev Oral Biol Med* **10**: 359-383.
- Carr, F. J., D. Chill and N. Maida (2002). "The lactic acid bacteria: A literature survey." *Critical Reviews in Microbiology* **28**(4): 281-370.
- Chan, W. C., B. W. Bycroft, L. Y. Lian and G. C. K. Roberts (1989). "Isolation and characterization of 2 degradation products derived from the peptide antibiotic nisin." *Febs Letters* **252**(1-2): 29-36.
- Chan, W. C., H. M. Dodd, N. Horn, K. Maclean, L. Y. Lian, B. W. Bycroft, M. J. Gasson and G. C. K. Roberts (1996). "Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: Role of dehydroalanine 5." *Applied and Environmental Microbiology* **62**(8): 2966-2969.
- Chau, A. S., C. A. Mendrick, F. J. Sabatelli, D. Loebenberg and P. M. McNicholas (2004). "Application of real-time quantitative PCR to molecular analysis of *Candida albicans* strains exhibiting reduced susceptibility to Azoles." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(6): 2124-2131.
- Cheigh, C. I. and Y. R. Pyun (2005). "Nisin biosynthesis and its properties." *Biotechnology Letters* **27**(21): 1641-1648.
- Chiang, L. Y., D. C. Sheppard, V. M. Bruno, A. P. Mitchell, J. E. Edwards and S. G. Filler (2007). "*Candida albicans* protein kinase CK2 governs virulence during oropharyngeal candidiasis." *Cellular Microbiology* **9**(1): 233-245.
- Cintas, L. M., P. Casaus, L. Havarstein, P. E. Hernandez and I. F. Nes (1997). "Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum." *Applied and Environmental Microbiology* **63**(11): 4321-4330.
- Claypool, L., Heineman, B. L. Voris and C. R. Stumbo (1966). "Residence time of nisin in oral cavity following consumption of chocolate milk containing nisin." *Journal of Dairy Science* **49**(3): 314-316.
- Cleveland, J., T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas (2001). "Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation." *International Journal of Food Microbiology* **71**(1): 1-20.
- Daeschel, M. A. (1989). "Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives." *Food Technology* **43**(1): 164-166.

- Daoudi, L., C. Turcotte, C. Lacroix and I. Fliss (2001). "Production and characterization of anti-nisin Z monoclonal antibodies: suitability for distinguishing active from inactive forms through a competitive enzyme immunoassay." *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**(1-2): 114-119.
- De Bernardis, F., S. Arancia, L. Morelli, B. Hube, D. Sanglard, W. Schafer and A. Cassone (1999). "Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*." *Journal of Infectious Diseases* **179**(1): 201-208.
- de Lucca, A. J. and T. J. Walsh (1999). "Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(1): 1-11.
- De Man, J. C., M. Ragosa and M. E. Sharpe (1960). "A medium for the cultivation of lactobacilli." *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.
- De Vos, W. M., J. W. M. Mulders, R. J. Siezen, J. Hugenholtz and O. P. Kuipers (1993). "Properties of nisin Z and distribution of its gene, *Nisz*, in *Lactococcus lactis*." *Applied and Environmental Microbiology* **59**(1): 213-218.
- De Vuyst, L. and E. J. Vandamme (1994). Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* : properties, biosynthesis, fermentation and applications. *Bacteriocins of Lactic acid Bacteria : Microbiology, genetics and applications*. D. V. L. a. V. E.J. London, England, blackie Academic and professional: 151-221.
- Dekruif, B., W. Gerritse, A. Oerleman, R. A. Demel and L. I. Vandeene (1974). "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes .1. Specificity of membrane permeability changes induced by polyene antibiotics." *Biochimica Et Biophysica Acta* **339**(1): 30-43.
- Delves-Broughton, J., P. Blackburn, R. J. Evans and J. Hugenholtz (1996). "Applications of the bacteriocin, nisin." *Antonie van Leeuwenhoek* **69**: 193-202.
- Denning, D. W. (2003). "Echinocandin antifungal drugs." *Lancet* **362**(9390): 1142-1151.
- Diasio, R. B., J. E. Bennett and C. E. Myers (1978). "Mode of action of 5-fluorocytosine." *Biochemical Pharmacology* **27**(5): 703-707.
- Dielbandhoesing, S. K., H. Zhang, L. H. P. Caro, J. M. Van Der Vaart, F. M. Klis, C. T. Verrips and S. Brul (1998). "Specific cell wall proteins confer resistance to nisin upon yeast cells." *Applied and Environmental Microbiology* **64**(10): 4047-4052.
- Djae, A., C. Lacroix, D. Thuault, C. M. Bourgeois and R. E. Simard (1995). "Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* UL720." *Can. J. Microbiol.* **41**: 832-841.

- Drago, L., B. Mombelli, E. De Vecchi, C. Bonaccorso, M. C. Fassina and M. R. Gismondo (2000). "*Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor?" International Journal of Antimicrobial Agents **16**(4): 545-547.
- Edmond, M. B., S. E. Wallace, D. K. McClish, M. A. Pfaller, R. N. Jones and R. P. Wenzel (1999). "Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: A three-year analysis." Clinical Infectious Diseases **29**(2): 239-244.
- EFSA (2001). "Report from the commission on dietary food additive intake in the European Union." p 26.
- Elewski, B. E. (1998). "Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis, and management." Clinical Microbiology Reviews **11**(3): 415-429.
- Ellis, D. (2002). "Amphotericin B: spectrum and resistance." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **49**: 7-10.
- Eversole, L. R., P. A. Reichart, G. Ficarra, A. SchmidtWesthausen, P. Romagnoli and N. Pimpinelli (1997). "Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis." Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics **84**(4): 372-380.
- Farah, C. S., R. B. Ashman and S. J. Challacombe (2000). "Oral candidosis." Clinics in Dermatology **18**(5): 553-562.
- FDA (1988). F. Register, Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. 21 CFR Part 184, Fed. Reg.53: 11247-11251.
- Felk, A., M. Kretschmar, A. Albrecht, M. Schaller, S. Beinhauer, T. Nichterlein, D. Sanglard, H. C. Korting, W. Schafer and B. Hube (2002). "*Candida albicans* hyphal formation and the expression of the Efg1-regulated proteinases SAP4 to SAP6 are required for the invasion of parenchymal organs." Infection and Immunity **70**(7): 3689-3700.
- Fields, R. D. and M. V. Lancaster (1993). "Dual attribute continuous monitoring of cell proliferation cytotoxicity." American Biotechnology Laboratory **11**(4): 48-50.
- Filler, S. G., J. N. Swerdloff, C. Hobbs and P. M. Lockett (1995). "Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*." Infection and Immunity **63**(3): 976-983.
- Francois, I. E. J. A., A. M. Aerts, B. P. A. Cammue and K. Thevissen (2005). "Currently used antimycotics: Spectrum, mode of action and resistance occurrence." Current Drug Targets **6**(8): 895-907.
- Frazer, A. C., J. R. Hickman and M. Sharratt (1962). "Biological effects of food additives .1. Nisin." Journal of the Science of Food and Agriculture **13**(1): 32-42.

- Fu, Y., A. S. Ibrahim, D. C. Sheppard, Y. C. Chen, S. W. French, J. E. Cutler, S. G. Filler and J. E. Edwards (2002). "*Candida albicans* Als1p: an adhesin that is a downstream effector of the EFG1 filamentation pathway." *Molecular Microbiology* **44**(1): 61-72.
- Fukao, M., T. Obita, F. Yoneyama, D. Kohda, T. Zendo, J. Nakayama and K. Sonomoto (2008). "Complete covalent structure of nisin Q, new natural nisin variant, containing post-translationally modified amino acids." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **72**(7): 1750-1755.
- Garcera, M. J. G., M. G. L. Elferink, A. J. M. Driessen and W. N. Konings (1993). "*In vitro* pore forming activity of the lantibiotic nisin - Role of protonmotive force and lipid composition." *European Journal of Biochemistry* **212**(2): 417-422.
- Georgopapadakou, N. H. and T. J. Walsh (1994). "Human mycoses - Drugs and targets for emerging pathogens." *Science* **264**(5157): 371-373.
- Ghuysen, J. M. (1968). "Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism." *Bacteriological Reviews* **32**(4p2): 425-464.
- Gross, E. and J. L. Morell (1971). "Structure of Nisin." *Journal of the American Chemical Society* **93**(18): 4634-4635.
- Hamilton, J. (1973). "Chemistry and biology of polyene macrolide antibiotics." *Bacteriological Reviews* **37**(3): 166-196.
- Hansen, J. N. (1993). "Antibiotics synthesized by posttranslational modification." *Annual Review of Microbiology* **47**: 535-564.
- Hara, S., K. Yakazu, K. Nakakawaji, T. Takeuchi, T. Kobayashi, M. Sata, Z. Imai and T. Shibuya (1962). "An investigation of toxicity of nisin." *Tokyo Med Univ J* **20**: 176.
- Harris, L. J., M. A. Daeschel, M. E. Stiles and T. R. Klaenhammer (1989). "Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*." *Journal of Food Protection* **52**(6): 384-387.
- Harris, L. J., H. P. Fleming and T. R. Klaenhammer (1992). "Developments in nisin research." *Food Research International* **25**(1): 57-66.
- Hector, R. F. (1993). "Compounds active against cell walls of medically important fungi." *Clinical Microbiology Reviews* **6**(1): 1-21.
- Heineman, B. and R. Williams (1966). "Inactivation of Nisin by Pancreatin." *Journal of Dairy Science* **49**(3): 312-314.
- Hirsch, A. and A. T. R. Mattick (1949). "Some recent applications of nisin." *Lancet* **257**(Jul30): 190-193.

- Hope, W. W., L. Taberner, D. W. Denning and M. J. Anderson (2004). "Molecular mechanisms of primary resistance to flucytosine in *Candida albicans*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(11): 4377-4386.
- Hosoda, K., M. Ohya, T. Kohno, T. Maeda, S. Endo and K. Wakamatsu (1996). "Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by H-1-NMR." *Journal of Biochemistry* **119**(2): 226-230.
- Hube, B., D. Sanglard, F. C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schafer, A. J. P. Brown and N. A. R. Gow (1997). "Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes SAP1, SAP2, and SAP3 of *Candida albicans* attenuates virulence." *Infection and Immunity* **65**(9): 3529-3538.
- Hurst, A. (1981). "Nisin." *Adv. Appl. Microbiol* **27**: 85-123.
- Ibrahim, A. S., F. Mirbod, S. G. Filler, Y. Banno, G. T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Y. Nozawa and M. A. Ghannoum (1995). "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*." *Infection and Immunity* **63**(5): 1993-1998.
- Iwata, K. (1992). "Drug resistance in human pathogenic fungi." *European Journal of Epidemiology* **8**(3): 407-421.
- Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray (1995). "Bacteriocins of Gram positive bacteria." *Microbiological Reviews* **59**(2): 171-200.
- Jarvis, B. and J. Farr (1971). "Partial purification, specificity and mechanism of action of nisin inactivating enzyme from *Bacillus cereus*." *Biochimica Et Biophysica Acta* **227**(2): 232-240.
- Jarvis, B. and R. R. Mahoney (1969). "Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin." *Journal of Dairy Science* **52**(9): 1448-1450.
- Jarvis, W. R. (1995). "Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species." *Clinical Infectious Diseases* **20**(6): 1526-1530.
- Jaynes, J. M., K. G. Xanthopoulos, L. Destefanobeltran and J. H. Dodds (1987). "Increasing bacterial disease resistance in plants utilizing antibacterial genes from insects." *Bioessays* **6**(6): 263-270.
- Jimenez-Diaz, R., J. L. Ruizbarba, D. P. Cathcart, H. Holo, I. F. Nes, K. H. Sletten and P. J. Warner (1995). "Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* lpc010, the activity of which depends on the complementary action of 2 peptides." *Applied and Environmental Microbiology* **61**(12): 4459-4463.

- Jung, G. (1991). Lantibiotics: A survey. Nisin and novel lantibiotics. G. J. a. H.-G. Sahl. Leiden, The Netherlands, ESCOM: 1-34.
- Kaewsrichan, J., K. Peeyananjarassri and J. Kongprasertkit (2006). "Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens." *Fems Immunology and Medical Microbiology* **48**(1): 75-83.
- Katiyar, S., M. Pfaller and T. Edlind (2006). "*Candida albicans* and *Candida glabrata* clinical isolates exhibiting reduced echinocandin susceptibility." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**(8): 2892-2894.
- Kelly, M. T., D. M. MacCallum, S. D. Clancy, F. C. Odds, A. J. P. Brown and G. Butler (2004). "The *Candida albicans* CaACE2 gene affects morphogenesis, adherence and virulence." *Molecular Microbiology* **53**(3): 969-983.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb, B. C. Baldwin, A. J. Corran and D. E. Kelly (1997). "Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol Delta(22)-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents." *Journal of Biological Chemistry* **272**(15): 9986-9988.
- Kelly, S. L., D. C. Lamb and D. E. Kelly (1999). "Y132H substitution in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase confers fluconazole resistance by preventing binding to haem." *Fems Microbiology Letters* **180**(2): 171-175.
- Klaenhammer, T. R. (1993). "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." *Fems Microbiology Reviews* **12**(1-3): 39-86.
- Klis, F. M., P. De Groot and K. Hellingwerf (2001). "Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*." *Medical Mycology* **39**: 1-8.
- Korting, H. C., B. Hube, S. Oberbauer, E. Januschke, G. Hamm, A. Albrecht, C. Borelli and M. Schaller (2003). "Reduced expression of the hyphal-independent *Candida albicans* proteinase genes SAP1 and SAP3 in the *efg1* mutant is associated with attenuated virulence during infection of oral epithelium." *Journal of Medical Microbiology* **52**(8): 623-632.
- Kretschmar, M., B. Hube, T. Bertsch, D. Sanglard, R. Merker, M. Schroder, H. Hof and T. Nichterlein (1999). "Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis." *Infection and Immunity* **67**(12): 6637-6642.
- Kuipers, O. P., W. M. G. J. Yap, H. S. Rollema, M. M. Beethuyzen, R. J. Siezen and W. M. De Vos (1991). Expression of wild-type and mutant nisin genes in *Lactococcus lactis*. . In nisin and novel lantibiotics. e. G. J. H.-G. Sahl. Lieden, The Netherlands, ESCOM Science Publishers B.V.: 250-259.

- Kuriyama, T., D. W. Williams, J. Bagg, W. A. Coulter, D. Ready and M. A. O. Lewis (2005). "In vitro susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents." *Oral Microbiology and Immunology* **20**(6): 349-353.
- Kurtz, M. B. and C. M. Douglas (1997). "Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase." *Journal of Medical and Veterinary Mycology* **35**(2): 79-86.
- Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, S. Dreikorn, J. Onishi and C. Douglas (1994). "Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* correlate with activities against (1,3)-Beta-D-glucan synthase." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38**(7): 1480-1489.
- Lamb, D. C., D. E. Kelly, T. C. White and S. L. Kelly (2000). "The R467K amino acid substitution in *Candida albicans* sterol 14 alpha-demethylase causes drug resistance through reduced affinity." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(1): 63-67.
- Lampen, J. O. (1966). *Symposia of Society of General Microbiology* **16**: 111-130.
- Laverdiere, M., R. G. Lalonde, J. G. Baril, D. C. Sheppard, S. Park and D. S. Perlin (2006). "Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57**(4): 705-708.
- Lemar, K. M., M. P. Turner and D. Lloyd (2002). "Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts." *Journal of Applied Microbiology* **93**(3): 398-405.
- Lian, L. Y., W. C. Chan, S. D. Morley, G. C. K. Roberts, B. W. Bycroft and D. Jackson (1992). "Solution structures of nisin A and its 2 major degradation products determined by nmr." *Biochemical Journal* **283**: 413-420.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti and G. R. Fink (1997). "Nonfilamentous *Candida albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-949.
- Loeffler, J. and D. A. Stevens (2003). "Antifungal drug resistance." *Clinical Infectious Diseases* **36**: S31-S41.
- Lopez-Garcia, B., L. Gonzalez-Candelas, E. Perez-Paya and J. F. Marcos (2000). "Identification and characterization of a hexapeptide with activity against phytopathogenic fungi that cause postharvest decay in fruits." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(8): 837-846.
- Lyon, W. J. and B. A. Glatz (1991). "Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*." *Applied and Environmental Microbiology* **57**(3): 701-706.

- Maertens, J., M. Vrebos and M. Boogaerts (2001). "Assessing risk factors for systemic fungal infections." *European Journal of Cancer Care* **10**(1): 56-62.
- Marichal, P., J. Gorrens and H. Vandebossche (1985). "The action of itraconazole and ketoconazole on growth and sterol synthesis in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus niger*." *Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology* **23**(1): 13-21.
- Mathews, H. and L. Witek-Janusek (2002). Host defense against oral, oesophageal, and gastrointestinal candidiasis. In *Candida and Candidiasis*. R. A. Calderone: 179-192.
- Mattick, A. T. R. and A. Hirsch (1947). "Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic *Streptococci*." *Lancet* **253**(Jul5): 5-8.
- Mc Intyre, G. T. (2001). "Oral candidosis." *Dent Update* **28**: 132-139.
- Meghrou, J., C. Lacroix, M. Bouksaim, G. LaPointe and R. E. Simard (1997). "Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* UL 719." *Journal of Applied Microbiology* **83**(2): 133-138.
- Miller, C. D., B. W. Lomaestro, S. Park and D. S. Perlin (2006). "Progressive esophagitis caused by *Candida albicans* with reduced susceptibility to caspofungin." *Pharmacotherapy* **26**(6): 877-880.
- Monod, M., G. Togni, B. Hube and D. Sanglard (1994). "Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species." *Molecular Microbiology* **13**(2): 357-368.
- Montesinos, E. (2007). "Antimicrobial peptides and plant disease control." *Fems Microbiology Letters* **270**(1): 1-11.
- Mooney, M. A., I. Thomas and D. Sirois (1995). "Oral candidosis." *International Journal of Dermatology* **34**(11): 759-765.
- Mulders, J. W. M., I. J. Boerrigter, H. S. Rollema, R. J. Siezen and W. M. Devos (1991). "Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant." *European Journal of Biochemistry* **201**(3): 581-584.
- Murinda, S. E., K. A. Rashid and R. F. Roberts (2003). "*In vitro* assessment of the cytotoxicity of nisin, pediocin, and selected colicins on simian virus 40-transfected human colon and Vero monkey kidney cells with trypan blue staining viability assays." *Journal of Food Protection* **66**(5): 847-853.
- Nes, I. F., D. B. Diep, L. S. Havarstein, M. B. Brurberg, V. Eijsink and H. Holo (1996). "Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria." *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **70**(2-4): 113-128.

- Niewerth, M., D. Kunze, M. Seibold, M. Schaller, H. C. Korting and B. Hube (2003). "Ciclopirox olamine treatment affects the expression pattern of *Candida albicans* genes encoding virulence factors, iron metabolism proteins, and drug resistance factors." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(6): 1805-1817.
- Niimi, K., D. R. K. Harding, R. Parshot, A. King, D. J. Lun, A. Decottignies, M. Niimi, S. Lin, R. D. Cannon, C. Goffeau and B. C. Monk (2004). "Chemosensitization of fluconazole resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and pathogenic fungi by a D-octapeptide derivative." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(4): 1256-1271.
- Nozawa, Y. and T. Morita (1986). Molecular mechanisms of antifungal agents associated with membrane ergosterol. Dysfunction of membrane ergosterol and inhibition of ergosterol biosynthesis. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antifungal agents. K. Iwata and V. D. Bossche. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science: 111.
- Odds, F. C. (1987). "Candida and Candidosis - Proceedings of a Symposium Held during the 14th International-Congress of Microbiology, Manchester, England, September 1986 - Candida Infections - Overview." *Crc Critical Reviews in Microbiology* **15**(1): 1-5.
- Odds, F. C. (1988). Ecology of *Candida* and epidemiology of candidosis. In *Candida and Candidosis, A review and Bibliography*. B. Tindall. London, United Kingdom: 68-92.
- Odds, F. C. (1994). "*Candida* species and virulence : The study of virulence attributes in *Candida albicans* has come of age, and the host-fungus interplay may be more complex than previously realized." *ASM News* **60**(6): 313-318.
- Okkers, D. J., L. M. T. Dicks, M. Silvester, J. J. Joubert and H. J. Odendaal (1999). "Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*." *Journal of Applied Microbiology* **87**(5): 726-734.
- Oscàriz, J. C. and A. G. Pisabarro (2001). "Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria." *Int. Microbiol* **4**: 13-9.
- Park, H., C. L. Myers, D. C. Sheppard, Q. T. Phan, A. A. Sanchez, J. E. Edwards and S. G. Filler (2005). "Role of the fungal Ras-protein kinase A pathway in governing epithelial cell interactions during oropharyngeal candidiasis." *Cellular Microbiology* **7**(4): 499-510.
- Park, S., R. Kelly, J. N. Kahn, J. Robles, M. J. Hsu, E. Register, W. Li, V. Vyas, H. Fan, G. Abruzzo, A. Flattery, C. Gill, G. Chrebet, S. A. Parent, A. Kurtz, H. Teppler, C. A. Douglas and D. S. Perlin (2005). "Specific substitutions in the echinocandin target Fks1p account for reduced susceptibility of rare laboratory and clinical *Candida* sp isolates." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(8): 3264-3273.

- Pascual, L. M., M. B. Daniele, G. Walter, M. C. Pajaro and I. L. Barberis (2008). "Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23." *Curr. Microbiol.* **56**: 397-402.
- Pesquera, T. I. (1966). "NISIN - Its use, estimation and toxicology in sterilized milk." *Revista Espanola de lecheria* **59**: 25.
- Pfaller, M. A. (1996). "Nosocomial candidiasis: Emerging species, reservoirs, and modes of transmission." *Clinical Infectious Diseases* **22**: S89-S94.
- Pfaller, M. A., L. Boyken, R. J. Hollis, S. A. Messer, S. Tendolkar and D. J. Diekema (2005). "*In vitro* activities of anidulafungin against more than 2,500 clinical isolates of *Candida* spp., including 315 isolates resistant to fluconazole." *Journal of Clinical Microbiology* **43**(11): 5425-5427.
- Pfaller, M. A., D. J. Diekema, R. N. Jones, S. A. Messer, R. J. Hollis and G. SENTRY Participant (2002). "Trends in antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000." *Journal of Clinical Microbiology* **40**(3): 852-856.
- Pfaller, M. A., R. N. Jones, G. V. Doern, H. S. Sader, S. A. Messer, A. Houston, S. Coffman, R. J. Hollis and G. SENTRY Participant (2000). "Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America, 1997-1998." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(3): 747-751.
- Phan, Q. T., P. H. Belanger and S. G. Filler (2000). "Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells." *Infection and Immunity* **68**(6): 3485-3490.
- Pinjon, E., G. P. Moran, C. J. Jackson, S. L. Kelly, D. Sanglard, D. C. Coleman and D. J. Sullivan (2003). "Molecular mechanisms of itraconazole resistance in *Candida dubliniensis*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**(8): 2424-2437.
- Plate, C. A. and S. E. Luria (1972). "Stages in colicin-K action, as revealed by action of trypsin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**(8): 2030-2034.
- Polak, A. and H. J. Scholer (1975). "Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance." *Chemotherapy* **21**(3-4): 113-130.
- Prescott, H. and Klein (1995). *Microbiologie*. De Boeck université. Bruxelles, Belgique.
- Rao, A. G. (1995). "Antimicrobial peptides." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**(1): 6-13.

- Reddy, K. V. R., C. Aranha, S. M. Gupta and R. D. Yedery (2004). "Evaluation of antimicrobial peptide nisin as a safe vaginal contraceptive agent in rabbits: *in vitro* and *in vivo* studies." *Reproduction* **128**(1): 117-126.
- Rouabhia, M., G. Ross, N. Page and J. Chakir (2002). "Interleukin-18 and gamma interferon production by oral epithelial cells in response to exposure to *Candida albicans* or lipopolysaccharide stimulation." *Infection and Immunity* **70**(12): 7073-7080.
- Ruhnke, M. (2002). Skin and mucous membrane infections. *Candida and Candidiasis*. R. A. Calderone: 307-326.
- Ryley, J. F., R. G. Wilson, M. B. Gravestock and J. P. Poyser (1981). "Experimental approaches to antifungal chemotherapy." *Advances in Pharmacology and Chemotherapy* **18**: 49-176.
- Sahl, H.-G. (1991.). Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics. nisin and novel lantibiotics. G. J. a. H.-G. S. (ed.). Leiden, The Netherlands, ESCOM Publishers: 347-358.
- Sahl, H. G. and G. Bierbaum (1998). "Lantibiotics: Biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria." *Annual Review of Microbiology* **52**: 41-79.
- Sahl, H. G., M. Kordel and R. Benz (1987). "Voltage dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin." *Archives of Microbiology* **149**(2): 120-124.
- Samaranayake, L. P. and T. W. MacFarlane (1990). *Oral candidosis*, Butterworth & Co.
- Sanchez-Martinez, C. and J. Perez-Martin (2001). "Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis* - similar inputs, different outputs." *Current Opinion in Microbiology* **4**(2): 214-221.
- Sanchez, A. A., D. A. Johnston, C. Myers, J. E. Edwards, A. P. Mitchell and S. G. Filler (2004). "Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage *in vitro*." *Infection and Immunity* **72**(1): 598-601.
- Sanglard, D., B. Hube, M. Monod, F. C. Odds and N. A. R. Gow (1997). "A triple deletion of the secreted aspartyl proteinase genes SAP4, SAP5, and SAP6 of *Candida albicans* causes attenuated virulence." *Infection and Immunity* **65**(9): 3539-3546.
- Sanglard, D., F. Ischer, D. Calabrese, P. A. Majcherczyk and J. Bille (1999). "The ATP binding cassette transporter gene CgCDR1 from *Candida glabrata* is involved in

- the resistance of clinical isolates to azole antifungal agents." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(11): 2753-2765.
- Sanglard, D., K. Kuchler, F. Ischer, J. L. Pagani, M. Monod and J. Bille (1995). "Mechanisms of resistance to azole antifungal agents in *Candida albicans* isolates from aids patients involve specific multidrug transporters." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**(11): 2378-2386.
- Sanguinetti, M., B. Posteraro, B. Fiori, S. Ranno, R. Torelli and G. Fadda (2005). "Mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Candida glabrata* collected during a hospital survey of antifungal resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(2): 668-679.
- Schaller, M., H. C. Korting, W. Schafer, J. Bastert, W. C. Chen and B. Hube (1999). "Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis." *Molecular Microbiology* **34**(1): 169-180.
- Schaller, M., C. Schackert, H. C. Korting, E. Januschke and B. Hube (2000). "Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis." *Journal of Investigative Dermatology* **114**(4): 712-717.
- Schaller, M., W. Schafer, H. C. Korting and B. Hube (1998). "Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity." *Molecular Microbiology* **29**(2): 605-615.
- Sharkey, L. L., W. L. Liao, A. K. Ghosh and W. A. Fonzi (2005). "Flanking direct repeats of hisG alter URA3 marker expression at the HWP1 locus of *Candida albicans*." *Microbiology-Sgm* **151**: 1061-1071.
- Sobel, J. D., S. Faro, R. W. Force, B. Foxman, W. J. Ledger, P. R. Nyirjesy, B. D. Reed and P. R. Summers (1998). "Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **178**(2): 203-211.
- Sookhee, S., M. Chulasiri and W. Prachyabrued (2001). "Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens." *Journal of Applied Microbiology* **90**(2): 172-179.
- Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhauser (2000). "Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(11): 6102-6107.
- Stamos, J. K. and A. H. Rowley (1995). "Candidemia in a pediatric population." *Clinical Infectious Diseases* **20**(3): 571-575.

- Stevens, D. A., M. Espiritu and R. Parmar (2004). "Paradoxical effect of caspofungin: Reduced activity against *Candida albicans* at high drug concentrations." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(9): 3407-3411.
- Sudbery, P., N. Gow and J. Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." *Trends in Microbiology* **12**(7): 317-324.
- Sundstrom, P., J. E. Cutler and J. F. Staab (2002). "Reevaluation of the role of HWP1 in systemic candidiasis by use of *Candida albicans* strains with selectable marker URA3 targeted to the ENO1 locus." *Infection and Immunity* **70**(6): 3281-3283.
- Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker (1976). "Bacteriocins of Gram positive bacteria." *Bacteriological Reviews* **40**(3): 722-756.
- Toba, T., E. Yoshioka and T. Itoh (1991). "Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis*." *Letters in Applied Microbiology* **12**(2): 43-45.
- Topisirovic, L., M. Kojic, D. Fira, N. Golic, I. Strahinic and J. Low (2006). "Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation." *International Journal of Food Microbiology* **112**(3): 230-235.
- Trick, W. E., S. K. Fridkin, J. R. Edwards, R. A. Hajjeh, R. P. Gaynes and S. Natl Nosocomial Infections (2002). "Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999." *Clinical Infectious Diseases* **35**(5): 627-630.
- Turner, W. W. and W. Current (1997). *Biotechnology of Antibiotics*. New-York.
- Van De Ven, F. J. M., H. W. Vandenhooven, R. N. H. Konings and C. W. Hilbers (1991). "Nmr studies of lantibiotics - the structure of nisin in aqueous solution." *European Journal of Biochemistry* **202**(3): 1181-1188.
- Van Der Meer, J. R., J. Polman, M. M. Beerthuyzen, R. J. Siezen, O. P. Kuipers and W. M. Devos (1993). "Characterization of the *Lactococcus lactis* nisin A operon genes Nisp, encoding a subtilisin-like serine protease involved in precursor processing, and Nisr, encoding a regulatory protein involved in nisin biosynthesis." *Journal of Bacteriology* **175**(9): 2578-2588.
- van Heusden, H. E., B. de Kruijff and E. Breukink (2002). "Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin." *Biochemistry* **41**(40): 12171-12178.
- Vazquez, J. A. (1999). "Options for the management of mucosal candidiasis in patients with AIDS and HIV infection." *Pharmacotherapy* **19**(1): 76-87.

- Walsh, T. J., M. A. Viviani, E. Arathoon, C. Chiou, M. Ghannoum, A. H. Groll and F. C. Odds (2000). "New targets and delivery systems for antifungal therapy." *Medical Mycology* **38**: 335-347.
- Watts, H. J., F. S. H. Cheah, B. Hube, D. Sanglard and N. A. R. Gow (1998). "Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes." *Fems Microbiology Letters* **159**(1): 129-135.
- Weesemayer, D. E., D. W. Fondriest, R. T. Brouillette and S. T. Shulman (1987). "Risk factors associated with Candidemia in the neonatal intensive care unit - a case control study." *Pediatric Infectious Disease Journal* **6**(2): 190-196.
- Whelan, W. L. (1987). "The Genetic-Basis of Resistance to 5-Fluorocytosine in *Candida* Species and *Cryptococcus neoformans*." *Crc Critical Reviews in Microbiology* **15**(1): 45-56.
- Whiteway, M. and U. Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." *Current Opinion in Microbiology* **7**(4): 350-357.
- Wolf, C. E. and W. R. Gibbons (1996). "Improved method for quantification of the bacteriocin nisin." *Journal of Applied Bacteriology* **80**(4): 453-457.
- Zendo, T., M. Fukao, K. Ueda, T. Higuchi, J. Nakayama and K. Sonomoto (2003). "Identification of the lantibiotic Nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **67**(7): 1616-1619.
- Zheng, X. D., Y. M. Wang and Y. Wang (2004). "Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis." *Embo Journal* **23**(8): 1845-1856.
- Zhi-Jun, Y., N. Sriranganathan, T. Vaught, S. K. Arastu and S. A. Ahmed (1997). "A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies." *Journal of Immunological Methods* **210**(1): 25-39.