



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement
« LAMAABE »

**Mémoire du master
Présenté par**

*Mme YAKOUBI Ghislaine
Melle SI MOHAMMED Amina*

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie et contrôle de qualité

Intitulé du thème

**La formation du biofilm mixte sur les dispositifs
médicaux**

Soutenue le 28 juin 2022, devant le jury composé de :

Présidente	M'HAMED Imane	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Examineur	BOUALI Waffa	Maître de conférences A	Université de Tlemcen
Promotrice	BELLIFA Samia	Maître de conférences A	Université de Tlemcen

Année Universitaire : 2021-2022

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions Dieu Tout puissant qui nous a donné la force pour réaliser notre mémoire.

Nous tenons à présenter notre gratitude à l'encadrante Mme Bellifa Samia pour sa patience, sa disponibilité, son accueil et sa générosité et de nous avoir donné la motivation pour élaborer ce modeste travail malgré sa charge académique et professionnelle.

Nous voulons aussi exprimer notre gratitude aux membres de jury d'avoir accepté d'en faire partie ;

La présidente Mme Mhamedi imane

L'examinatrice Mme Bouali waffa

Nos remerciements vont également au corps enseignant du département de biologie ainsi que tout le corps administratif.

Nous tenons également à remercier les monsieurs qui travaillent à l'imprimerie Oussama Kheiro et Farouk et tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin durant notre préparation de ce mémoire.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail...

A Mes chers parents

Qui m'ont toujours soutenu et donner la force de continuer et de ne jamais abandonner tous les mots du monde ne pourraient leur exprimer ma gratitude.

A ma défunte grand-mère paternelle tu aurais été si fière de moi aujourd'hui repose en paix.

A ma chère grand-mère maternelle pour toutes ses prières et ses conseils qui me donnent la force de faire face à la vie.

A ma deuxième maman ma tante paternelle Leila pour tout ce qu'elle a fait et continue à faire pour moi et sans qui je n'aurais jamais pu y arriver c'est à toi que je dois tout que le bon dieu te garde pour moi.

A ma chère tante Bida pour sa présence et son soutien moral tu es mon plus bel exemple de réussite.

A ma chère tante Sihem pour sa gentillesse sa tendresse et ses encouragements.

A mes chers oncles leurs femmes et leurs enfants pour leurs encouragements.

A mon mari de ne m'avoir jamais mit de barrières pour mes études.

A la lumière de mes jours ma raison de vivre la source de mes efforts et de mes espoirs mon rayon de soleil mon fils "Razy" .

A mes beaux-parents et mes belles sœurs pour leurs encouragements et leurs soutiens et surtout à Nihel d'avoir toujours été présente et de m'avoir toujours tendu la main quand j'en avais besoin tu es la meilleure belle-sœur qui puisse exister.

A mes cousines d'amour mes sœurs de coeur Ilhem Lynda et Manel je suis vraiment chanceuse de vous avoir merci pour tout ce que vous faites pour moi.

A mes copines Aicha , Lamia, Chahinez, Wissem , Mounia merci pour votre soutien moral.

A mes collègues Amina , Chaimaa , Mourad , Mohammed ... merci pour tout les bons moments passés ensemble au final on a pu y arriver.

Et à tout ceux qui ont contribué de près ou de loin à mon parcours .

Ghizlaine

Dédicaces

A ma très chère mère Bouzidi Fatima Zahra ,ma source de force, d'amour, le symbole du sacrifice de la confiance en soi et qui m'a toujours motivé dans mes études. ce travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation qu'Allah t'accorde une bonne santé.

À mon père Simohammed Mohamed, grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité , ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi.

J'implore le Tout puissant pour qu'il vous accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A mes très chers grands parents merci pour vos encouragements

À mes sœurs Asma et Douâa et khawela ,Ainsi que Mon petit frère Kheireddine Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement. Que dieu le tout puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

À mon confident Y ,Merci de m'avoir donné un soutien inconditionnel,ta présence illumine ma vie .

À mes amies Nesrine,Imane ,Hanane,chaimaa et je ne peux trouver les mots justes pour vous exprimer mon affection . En témoignage de l'amitié qui nous unit je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de bonheur.

Sans oublier l'âme avec laquelle j'ai partagé ce travail Ghizlene. Merci d'être toujours à mes côtés je t'aime ma chérie.

Amina

Listes des figures

Figure 01	Principales étapes de la formation des biofilms	06
Figure 02	Principaux mécanismes impliqués Dans la tolérance des biofilms aux antibiotiques	08
Figure 03	Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte	09
Figure 04	les composants d'un biofilm	17
Figure 05	Structures chimiques des composés 1 et 2	20
Figure 06	Images CLSM (en haut) et reconstruction 3D de la pile Z sur 10 m (en bas) de la formation des biofilms mixtes	26
Figure 07	les Cellules Vero et l'effet des deux antimicrobiens (1+2).	27
Figure 08	Activité anti-biofilm du traitement combiné sur les biofilms mono-spécifiques	28
Figure 09	Pourcentage d'inhibition du biofilm obtenu en utilisant différentes combinaisons de composés contre le biofilm polymicrobien	29
Figure 10	Comptage des UFC de chaque espèce microbienne après le traitement combiné du biofilm polymicrobien	31
Figure 11	Images CLSM de biofilms polymicrobiens avec le blanc de Calcofluor et le SYTO9	32
Figure 12	Images CLSM en Z de biofilms polymicrobiens colorés avec du Calcofluor blanc et du SYTO9	33

Liste des abréviations

AHL : N-acylhomosérine lactone
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine triphosphate
BHIB : Le bouillon Brain Heart Infusion
C. albicans : *Candida albicans*
CCK-8 : CellCounting Kit-8, CW
CLSM : La microscopie confocale à balayage laser
cryo-SEM : La cryomicroscopie électronique à balayage
CV : coloration de crystal violet
CVC : cathéters veineux centraux
CVP : cathéters veineux périphériques
DMSO : diméthylsulfoxyde
DM : symbole du décimètre
DO : Densité optique
DTT : Dithiothreitol
E. coli : *Echerichia. Coli*
EPS : substances polymériques extracellulaires
ESEM : microscopie électronique à balayage environnemental
ETOH : L'éthanol
FBS : Le sérum de veau fœtal
FESEM : Microscope électronique à balayage à émission de champ
FISH : colorants fluorescents
HDMS : séchage à l'hexaméthylsilazane
IC50 : La concentration inhibitrice médiane
LDH : La lactate déshydrogénase
LM : microscopie optique
LUT : Look-up-table)
MEB : microscopie électronique à balayage
P. aeruginosa : *Pseudomonas. Aeruginosa*
PBS : Tampon phosphate salin
pH : potentiel hydrogène
KOH : L'hydroxyde de potassium

Qs: Quorum-sensing

S.aureus : *Staphylococcus aureus*

SEM : Microscopie électronique à balayage conventionnel

TEM :microscopie électronique à transmission

UFC :Unité formant colonie

VP-SEM :Variable Pressure Scanning Electron Microscope

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Listes des abréviations

Listes des figures

Introduction 1

Synthèse bibliographique

I.Généralités sur les biofilms..... 4

1.Historique 4

2.Définition d'un biofilm 4

3.La formation de biofilm 5

4. Les étapes de la formation du biofilm 5

4.1 L'adhésion réversible 5

4.2 L'adhésion irréversible 5

4.3 Formation de micro-colonies 6

4.4 Maturation du biofilm 6

4.4 Dispersion du biofilm..... 6

5. composants du biofilm 7

6. Résistance aux antibiotiques 8

7.Système immunitaire..... 9

8.Biofilms mixtes 10

9.Infections de dispositifs médicaux liées au biofilm 11

9.1 Biofilm et Cathéters urinaires 11

9.2 Biofilm et cathéters veineux 12

9.3 Biofilm et prothèses articulaires 12

10.Les Techniques Utilisées Pour Etudier Les Biofilms Mixtes..... 12

10.1 La Quatification Par Le Cristal Violet 12

10.2 La Syto9 13

10.3 Technique de Microscopie appliqué à l'imagerie des biofilm 13

10.3.1 Microscopie optique 15

10.3.2 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM) 14

10.3.3 Microscopie électronique à balayage MEB conventionnel et à balayage à émission de champ (FESEM)	16
11.Traitement curatif contre les biofilm déjà formé.....	15
11.1 Elimination mécanique du biofilm	15
11.2 Antibiothérapie	15
11.3 L'ablation du dispositif	15
11.4 L'inhibition du Quorum sensing	16
11.5 Les huiles essentielles.	17
11.6 Les enzymes comme agents anti-biofilms	17

Matériel et méthodes

1.Souches utilisé.....	19
2.Agents antimicrobiens.....	19
3.Tests de viabilité cellulaire et de cytotoxicité	20
4.Activité antibiofilm	20
5.Technique de dénombrement	20
6.Analyse par microscopie confocale à balayage laser (CLSM).	23
7.Analyse statistique.....	24

Résultats et discussion

1.Biofilms polymicrobiens	26
2.Activité et sélectivité des composés	27
3.Viabilité cellulaire et cytotoxicité.	28
4.Traitement combiné du biofilm mono-espèce.....	29
5.Traitement combiné du biofilm de <i>C.albicans-S.aureus</i>	29
6. Résultats du dénombrement.	30
7.Microscopie confocale à balayage laser	31
8.Conclusion.....	34

Conclusion générale

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Résumé

Les biofilms mixtes sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Ils peuvent se former sur des tissus vivants comme ils se forment sur des dispositifs médicaux. Ils sont extrêmement difficiles à éradiquer dont la capacité potentielle de certains microorganismes. Des approches nouvelles et innovantes sont donc nécessaires pour assurer la réussite de la gestion des infections liées aux biofilms. Dans cette étude, un dérivé à base de chalcone et un dérivé à base d'anthracène polycyclique-maléimide, qui ont été précédemment déterminés comme inhibiteurs de la croissance de *C. albicans* et de *S. aureus*, respectivement, ont été reconsidérés dans une nouvelle perspective en évaluant l'efficacité d'un traitement combiné contre *C. albicans* et *S. aureus*, l'efficacité d'un traitement combiné contre un biofilm polymicrobien. Des analyses quantitatives et qualitatives ont été effectuées afin de déterminer leur potentiel inhibiteur sur la population polymicrobienne. Les résultats indiquent que ces antimicrobiens nouvellement identifiés sont efficaces pour réduire la biomasse du biofilm mixte de *C. albicans*-*S. aureus* et la viabilité des cellules fongiques-bactériennes au sein de la communauté polymicrobienne, de plus, la microscopie confocale à balayage laser démontre que le traitement des composés 1 et 2 modifie en profondeur l'architecture du biofilm à deux espèces.

Mots clé : Biofilm mixte , dispositifs médicaux , *Candida albicans* , *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Mixed biofilms are the cause of many nosocomial infections. They can form on living tissue as well as on medical devices. They are extremely difficult to eradicate due to the potential capacity of certain microorganisms.

Thus, new and innovative approaches are needed for successful management of biofilm-related infections. In this study, a chalcone-based derivative and a polycyclic anthracene-maleimide-based derivative, which were previously determined to inhibit the growth of *C. albicans* and *S. aureus*, respectively, were reconsidered from a new perspective by evaluating the efficacy of a combination treatment against *C. albicans* and *S. aureus*, the efficacy of a combination treatment against polymicrobial biofilm. Quantitative and qualitative analyses were performed to determine their inhibitory potential on the polymicrobial population. Results indicate that these newly identified antimicrobials are effective in reducing the biomass of the mixed *C. albicans*-*S. aureus* biofilm and the viability of fungal-bacterial cells within the polymicrobial community, furthermore, confocal laser scanning microscopy demonstrates that the treatment of compounds 1 and 2 profoundly alters the architecture of the two-species biofilm.

Keywords: mixed Biofilm , Medical devices , *candida albicans* , *staphylococcus aureus*.

المخلص

الأغشية الحيوية المختلطة هي سبب العديد من التهابات المستشفيات. يمكن أن تتشكل على الأنسجة الحية وكذلك على الأجهزة الطبية. من الصعب للغاية القضاء عليها بسبب القدرة المحتملة لبعض الكائنات الحية الدقيقة.

وبالتالي ، هناك حاجة إلى نهج جديدة ومبتكرة للإدارة الناجحة للإلتهابات ذات الصلة بيوفيلم. في هذه الدراسة ، تم إعادة النظر في مشتق أساسه chalcone ومشتق قائم على anthracene-malimide متعدد الحلقات ، والذي تم تحديده مسبقاً لمنع نمو *S. aureus* ، على التوالي ، من منظور جديد من خلال تقييم فعالية الجمع بين العلاج ضد بكتيريا المطثية البيضاء والمكورات العنقودية الذهبية ، فعالية العلاج المركب ضد الغشاء الحيوي متعدد الميكروبات. تم إجراء التحليلات الكمية والنوعية لتحديد إمكاناتها المثبطة على السكان متعددي الميكروبات. تشير النتائج إلى أن مضادات الميكروبات التي تم تحديدها حديثاً فعالة في تقليل الكتلة الحيوية لمختلط *C. albicans-S. aureus biofilm* وصلاحية الخلايا البكتيرية الفطرية داخل المجتمع متعدد الميكروبات ، علاوة على ذلك ، يوضح الفحص المجهرى للمسح بالليزر متحد البؤر أن معالجة المركبين 1 و 2 يغيران بشكل كبير بنية الأغشية الحيوية من النوعين.

كلمات مفتاحية: الاغشية الحيوية المختلطة، أجهزة طبية، داء المبيضات، المكورات العنقودية الذهبية.

Introduction

Les biofilms sont des populations bien structurées de cellules microbiennes qui sont enfermées dans une matrice polymère extracellulaire autoproduite adhérant à pratiquement toutes les surfaces biotiques ou abiotiques. Aujourd'hui il n'y a aucun doute que les cellules microbiennes au sein du biofilm ont une résistance accrue aux antibiotiques (**Vestby et al., 2020**).

Bien que certaines infections soient causées par un agent pathogène d'une seule espèce, des biofilms polymicrobiens (biofilm mixte) de cellules fongiques et bactériennes ont été souvent identifiés sur différents dispositifs médicaux. Ce phénomène rend difficile l'identification des agents étiologiques et le traitement de l'infection. Les interactions inter-espèces entre les micro-organismes phylogénétiquement diversifiés ont un impact variable sur les compositions poly microbiennes allant de relations synergiques à une croissance compétitrice pendant le processus de développement du biofilm. Dans ce contexte, les microorganismes pourraient présenter une sensibilité altérée aux agents antimicrobiens, entraînant une aggravation de la maladie (**Batoni et al., 2021**). Parmi les espèces fongiques, *Candida albicans* est l'agent pathogène humain le plus commun, responsable des maladies allant des infections superficielles des muqueuses aux infections systémiques éventuellement mortelles. Le traitement avec des agents chimiques ou semi-synthétique des biofilms polymicrobiens (bactéries et champignons) nécessite une combinaison d'agents d'antibiotiques et antifongiques respectivement, mais il a été démontré qu'une telle stratégie de combinaison montre une faible efficacité conduisant aussi à des effets indésirables. Dans ce contexte, le développement de nouvelles options thérapeutiques représente un défi (**Rodrigues et al., 2019**).

Récemment, des dérivés nouvellement conçus dotés d'une activité particulière et sélective contre *Candida spp* et *S. aureus* ont été apportés.

Suite aux situations difficiles de cette année 2022 et de la pandémie du Covid 19, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en raison de la fermeture des laboratoires de recherche. En conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des articles portant sur notre thème de départ intitulé : La formation du biofilm mixte sur les dispositifs médicaux.

La présente analyse avait pour but d'examiner les propriétés anti-biofilm des deux agents nouvellement identifiés sur un biofilm mixte *C. albicans-S. aureus*.

Synthèse bibliographique

Généralités sur les biofilms

1. Historique

En 1933, Arthur Henrici mets des lames de microscopie en verre dans son aquarium et observe un dépôt de microorganismes qui prend de l'épaisseur progressivement .Ses observations des microorganismes dans l'eau lui permettent d'établir une évidence acceptée seulement depuis quelques décennies : les bactéries sont majoritairement adhérees sur une surface pour croître et non libres dans leur environnement. Henrici avança cette idée uniquement pour l'environnement aquatique en opposant les bactéries benthiques aux bactéries planctoniques [(Roux et Ghigo, 2006) ; (Oubekka, 2012) ; (Pantaléon, 2015)].

Les micro-organismes se fixent sur des surfaces (vivantes ou non vivantes), formant des « tapis » qui conduisent à la colonisation totale de la surface. Ces tapis bactériens constituent des « biofilms ». Cette notion a été proposée en 1978 par William Costerton, directeur du « Center for Biofilm Engineering » de l'Université d'État du Montana.

Le développement du biofilm passe par cinq étapes, l'adhésion à la surface, la croissance, la formation de micro colonies, la maturation du biofilm et le détachement qui entraine la colonisation d'une nouvelle surface (Monroe, 2007).

L'étude de ces structures biologiques complexes est devenue un champ multidisciplinaire qui attire de nombreux chercheurs [(Sauer *et al.*, 2007) ; (Kone, 2012)].

2. Définition d'un biofilm

Le biofilm se définit comme un micro-écosystème (de l'ordre de quelques micromètres à plusieurs millimètres d'épaisseur) où une population organisée d'une ou plusieurs espèces bactériennes, ou d'autres types de microorganismes (champignons, algues, levures), sont adhéres irréversiblement entre eux et sur une surface liquide ou solide (eau, tissus biologiques, substrats solides situés dans des environnements aquatiques), souvent englobée dans une matrice hautement hydratée de substances polymériques extracellulaires (EPS). Cette dernière est formée majoritairement de sucres, de lipides, de protéines, d'acides nucléiques extracellulaires et de matières minérales comme des sels, produite par les membres de cette communauté [(Roux et Ghigo, 2006); (Alnasouri, 2010) ; (Remy, 2015) ; (Bezoui, 2016)].

Leur phénotype est différent de celui des bactéries planctoniques, au niveau du taux de croissance et de la transcription de gènes, il assure la croissance et la survie à l'état sessile et

les protège des agressions extérieures il exprime aussi des propriétés biologiques spécifiques [(Roux et Ghigo, 2006); (Bezoui, 2016)].

3. La formation du biofilm

La formation d'un biofilm débute lorsque des micro-organismes flottants se fixent à une surface et ou liées les uns aux autres. Ce processus démarre avec la première bactérie, qui se fixe à la surface initialement par faible adhésion réversible. Au cours de la colonisation de surface, les cellules bactériennes ont la capacité de communiquer en utilisant signaux de détection de quorum-sensing (QS) tels que la N-acylhomosérine lactone (AHL) (Srivastava *et al.*, 2019).

4. Les étapes de la formation du biofilm

Le cycle de vie du biofilm peut être subdivisé en cinq étapes majeures : l'adhésion réversible, l'adhésion irréversible, la formation des micro-colonies, la maturation et la dispersion, (Figure1).

4.1. L'adhésion réversible

L'adhésion réversible est un processus au cours duquel les cellules adhèrent à une surface avec une intervention des mécanismes comme le chimiotactisme et la mise en place d'appendices générateurs de mouvement tels que les flagelles et elle est facilitée par les andésines qui sont des récepteurs membranaires (Rambelomamonjy, 2017). Divers facteurs influencent le processus d'attachement microbien aux surfaces telles que, les espèces bactériennes, la composition de la surface des cellules, la nature des surfaces, la disponibilité des éléments nutritifs, les conditions hydrodynamiques et la communication du quorum sensing (Donlan, 2002).

4.2. L'adhésion irréversible

L'ancrage à la surface solide devient irréversible en vue de la production d'exopolysaccharides (EPS) par les bactéries et surtout grâce à des structures d'attachement variables selon les espèces bactériennes. Par exemple pour les bactéries à Gram négatif (-), il s'agit des pilis, des capsules et du glycocalix et pour les bactéries à Gram positif (+), il y a les acides teichoïques, l'acide mycolique, la capsule et le glycocalix. Ces molécules d'attachement permettent d'établir des contacts cellule- surface et des contacts cellule-cellule (Mebarki, 2016).

4.3. Formation de micro-colonies

Les bactéries se multiplient et continuent de produire des exo-polysaccharidiques (EPS). Elles sont associées entre elles et forment des micro-colonies, qui sont protégées par l'EPS (**Chibi, 2015**). Ces micro-colonies seront suivies par la conception d'un biofilm plus ou moins complexe selon la composition en microorganismes du milieu, les conditions hydrodynamiques et chimiques (**Rambelomamonjy, 2017**).

4.4. Maturation du biofilm

Une fois que les bactéries s'attachent fermement au support, elles vont activer leur division cellulaire pour accroître le biofilm et lui donner son architecture. Cette augmentation de la masse va être accompagnée d'une production plus intense d'EPS qui vont interagir avec des molécules organiques et inorganiques du milieu environnant pour former la matrice extracellulaire. Divers facteurs contrôlent la maturation, notamment, la disponibilité et la bonne diffusion des nutriments à travers cette matrice extracellulaire, le pH interne, la disponibilité en oxygène, la disponibilité en source carbonée et l'osmolarité (**Brauge, 2015**).

4.4. Dispersion du biofilm

La dernière étape de formation du biofilm est le détachement. Lorsque les conditions du milieu deviennent hostiles (diminution de la concentration ou modification de la nature des nutriments disponibles...), les cellules du biofilm commencent à s'écarter et vont migrer pour coloniser des nouvelles régions favorables à leur développement afin de pouvoir recommencer un nouveau cycle de vie (**Rambelomamonjy, 2017**). Pendant cette phase les cellules peuvent sécréter des facteurs de destruction pour favoriser le détachement du biofilm et la colonisation des sites environnants. (**Xin Li et al., 2021**).

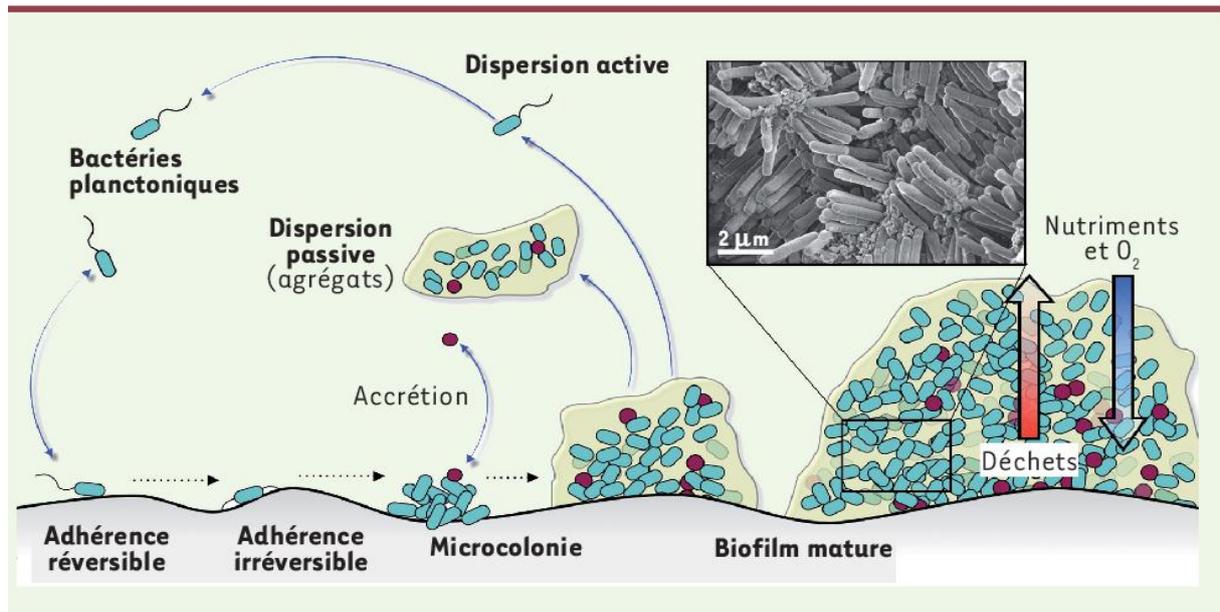


Figure 01 : Principales étapes de la formation des biofilms (Lebeaux et Ghigo, 2016).

5. Composants du biofilm

Un biofilm se compose principalement de microorganismes et d'une matrice extracellulaire (Baudin, 2017). Les bactéries du biofilm sont reliées par une matrice extracellulaire, qui protège les bactéries de l'environnement extérieur et adhère le biofilm à la surface (Rambelomamonjy, 2017). La composition de la matrice varie selon l'espèce bactérienne et les conditions de croissance (Tableau 1 et Figure 2) (Yannick *et al.*, 2016).

Tableau 1: Compositions de la matrice du biofilms [(Jamal *et al.*, 2015) (Banerjee *et al.*, 2019)].

Composants	Pourcentage de composition dans la matrice
Cellules microbiennes	2-5%
ADN et ARN	<1-2%.
Polysaccharides	1-2%.
Protéines (y compris les enzymes)	<1-2%.
L'eau	Jusqu'à 97%.

6. Résistance du biofilm aux antibiotiques

Dans une perspective thérapeutique, la caractéristique spécifique la plus problématique des biofilms matures est leur tolérance aux anti-infectieux, définie par une capacité accrue à survivre en présence de fortes concentrations d'antibiotiques bactéricides. Il est désormais bien documenté que ce phénotype est multifactoriel et implique :

- ✚ Un ralentissement de la diffusion des antibiotiques au travers de la matrice extracellulaire.
- ✚ L'existence de microenvironnements dans les couches profondes du biofilm, peu propices à l'action de certains antibiotiques, du fait des conditions physicochimiques qui y règnent (anoxie, pH acide, carence nutritionnelle) ;
- ✚ De manière plus anecdotique, il a été décrit l'existence de mécanismes génétiques spécifiques induits uniquement en biofilm, comme l'expression de pompes d'efflux ou la production de glucanes péri plasmiques chez *Pseudomonas. aeruginosa*, lesquels réduisent la pénétration intra cytoplasmique de certains antibiotiques.

Néanmoins, le mécanisme le plus important est lié à la présence d'une sous-population bactérienne minoritaire appelée bactéries persistantes (persisters). Ces bactéries ne sont pas des mutants mais présentent une modification phénotypique qui leur permet de survivre en présence de fortes concentrations d'antibiotiques (pour une revue exhaustive des mécanismes impliqués dans leur apparition et leur régulation. Ainsi, en cas d'infection associée au biofilm, l'antibiothérapie et le système immunitaire du patient permettront de contrôler le sepsis en éradiquant les bactéries planctoniques mais le risque de récurrence provient principalement des bactéries persistantes qui survivent (Figure3) **(Lebeaux, 2016)**).

La résistance aux antifongiques repose sur différents mécanismes, à savoir la réduction de l'accumulation intracellulaire du médicament diminution de l'affinité/processivité de la cible pour le médicament et la réduction de l'effet du médicament. En particulier, le mécanisme de résistance sera différent selon le mode d'action des composés antifongiques **[(Kanafani et Perfect, 2008) ; (Peman et al., 2009) ; (Vandeputte et al., 2012)]**.

D'autres mécanismes de résistance sont les pompes d'efflux, mutations dans les gènes codants, modification des activités enzymatiques. Contrairement à la grande diversité des antibiotiques, qui comptent de nombreuses classes connues et plusieurs modes d'action contre différentes cibles bactériennes. les antifongiques actuels sont extrêmement limités **(Gulati et Nobile, 2016)**.

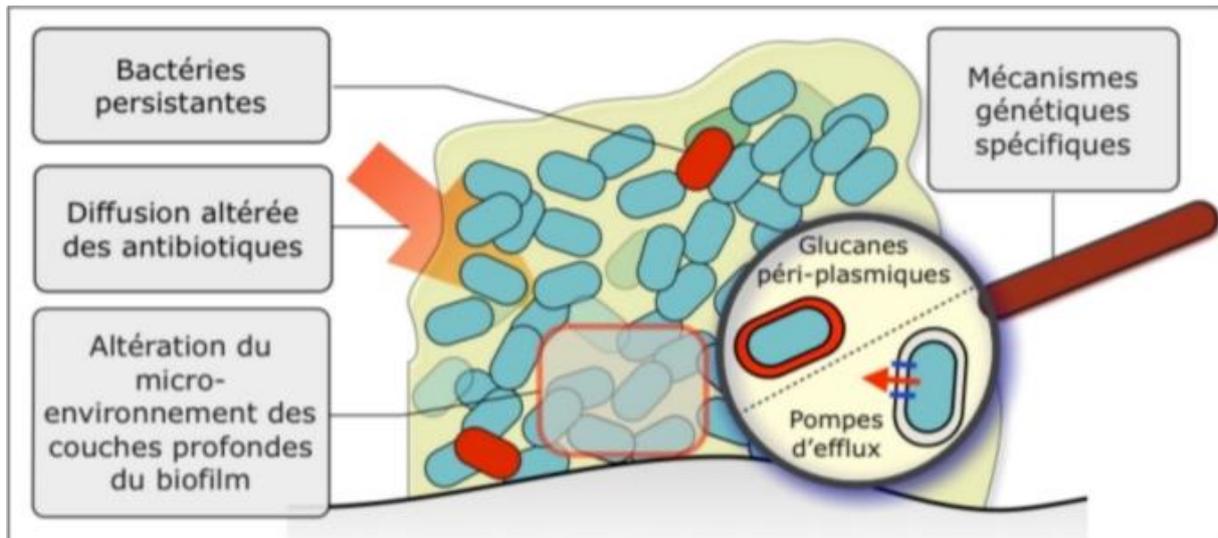


Figure 02 :Principaux mécanisme impliquée dans la tolérance des biofilm aux antibiotiques.
(Lebeaux *et al.*, 2016)

7. Système immunitaire

La présence d'un biofilm bactérien stimule la réponse immunitaire et la tenue des macrophages sur le site via un mécanisme de relargage d'antigènes. La phagocytose n'a pas d'influence sur des bactéries sessiles, mais la libération d'enzymes par les phagocytes endommage les tissus environnants, ce qui peut provoquer un descellement de la prothèse et une dissémination de l'infection (Tasse, 2017).

Lors de maladies liées aux biofilms, les défenses de l'hôte sont souvent inefficaces pour les éliminer. Les biofilms sont protégés contre le système immunitaire des hôtes infectés par leurs tailles qui empêchent le processus de phagocytose et par la matrice extracellulaire qui interdit la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps qui détruisent alors uniquement les bactéries détachées du biofilm et qui ne peuvent pas accéder aux bactéries à l'intérieur du biofilm (Figure 3)[(Percival et Bowler, 2004) ; (Roux et Ghigo, 2006)].

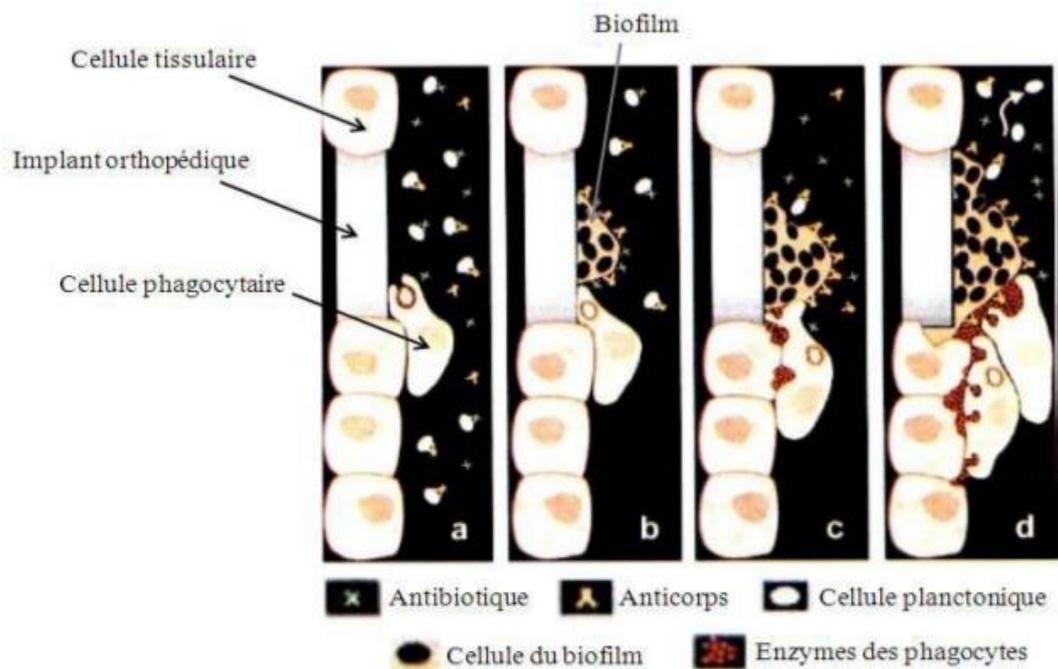


Figure 03 : Mécanismes de résistance des biofilms aux défenses de l'hôte (Tasse, 2017)

8. Les biofilms mixtes

Les biofilms mixtes sont des micro-organismes qui vivent en communautés multi-espèces (interactions bactérie-bactérie ou champignon-bactérie.....) .Ce phénomène a été décrit pour la cavité buccale, le système digestif, les dispositifs dans les voies respiratoires, les systèmes circulatoires,l'appareil urinaire et plusieurs autres compartiments corporels. Les biofilms multi-espèces, en général, ont une meilleure aptitude et une plus grande capacité à résister à différents antibiotiques et ils peuvent aussi résister à différents types de facteurs de stress en raison d'interactions synergiques et de spécialisation.

La compétence d'une espèce de différents genres au sein d'une communauté multi-espèces peut être radicalement différente de celle d'une situation mono-espèce du même organisme (Ramstedt et Burmølle, 2022).

Les levures du genre *Candida* cohabitent avec les bactéries dans une variété d'environnements Ces pathogènes causent des infections poly-microbiennes et interagissent d'une manière synergique ou inhibitrice, cela a une influence sur la pathogénèse et la santé des patients [(Wargo et Hogan, 2006) ; (Lynch et Robertson, 2008)].

Bien que ces germes ont la capacité de vivre libres dans un environnement liquide (vie planctonique), l'agglomération dans une structure pluri-microbiennes dite «biofilm» représente leur mode de croissance le plus fréquent dans la nature [(**Kuhn et al., 2002**) ; (**Ramage et al., 2005**)]. En effet, 80% des infections microbiennes chez l'homme sont causées par la formation de biofilms (**Harriott et Noverr, 2011**).

Parmi les espèces fongiques, *Candida albicans* est l'agent pathogène humain le plus courant, responsables des maladies allant des infections superficielles des muqueuses aux infections systémiques potentiellement mortelles, principalement associées à sa capacité à former des biofilms. Dans certaines niches de l'hôte, *C. albicans* coexiste avec différentes espèces bactériennes, pouvant former des biofilms polymicrobiens avec de nombreux partenaires, dont *Staphylococcus aureus* (**Bonvicini et al., 2021**).

Bien que *S. aureus* soit un mauvais formateur de biofilms par rapport aux autres staphylocoques, il augmente considérablement sa capacité à former des biofilms en présence de *C. albicans*, puisque le champignon crée un échafaudage pour la bactérie. Les infections mixtes à *Candida spp.* et *S. aureus* peuvent se produire dans plusieurs zones de l'organisme, notamment la peau, les poumons, la cavité buccale, ainsi que la circulation sanguine, à cause de la colonisation des dispositifs médicaux. Le traitement chimiothérapeutique des biofilms polymicrobiens nécessite une combinaison d'agents antifongiques et d'antibiotiques mais il a été rapporté qu'une telle stratégie de combinaison montre une faible efficacité et dont la plupart souffrent de plusieurs effets indésirables (**Bonvicini et al., 2021**).

9. Infections de dispositifs médicaux liées au biofilm

Il a été démontré que l'utilisation universelle de divers types de DM implantés à demeure chez l'homme peut conduire à l'attachement de micro-organismes et provoquer une colonisation et des infections. Ce sujet aide à éclaircir le mécanisme responsable de la capacité des biofilms bactériens à survivre et à se développer en infections liés à ces derniers (**Singh et al., 2019**). Les microorganismes sont transférés vers le dispositif via la peau des patients ou des agents de santé, de l'eau contaminée ou d'autres facteurs environnementaux externes (**Banerjee et al., 2019**).

9.1 Biofilm et Cathéters urinaires

Les cathéters urinaires sont des gadgets cylindriques en latex ou en silicone qui sont utilisés afin d'évaluer le rendement urinaire et donc pour recueillir l'urine pendant les

procédures médicales, neutralisant le maintien de l'urine et contrôlant l'incontinence urinaire (Srivastava *et al.*, 2019).

Les infections urinaires associées aux cathéters sont parmi les infections associées aux soins les plus fréquentes dans le monde, elles représentent environ 80% de toutes les infections urinaires nosocomiales. Les conditions environnementales créées sur la surface du cathéter en font un site important pour l'adhésion des bactéries et la formation de structures de biofilm (Delcaru *et al.*, 2016).

Pour les patients, les risques associés augmentent d'environ 10% chaque jour après le cathétérisme. Les biofilms peuvent apparaître rapidement sur les surfaces internes et externes des cathéters urinaires (Srivastava *et al.*, 2019).

Les bactéries qui contaminent ces dispositifs sont *S. epidermis*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* (Gupta *et al.*, 2015).

Dans les infections urinaires aiguës, la présence de *Proteus mirabilis* et d'autres bactéries productrices d'uréase, modifie distinctement le microenvironnement qui entoure le patient. (Ramstedt et Burmølle, 2022)

9.2 Biofilm et cathéters veineux

Les biofilms peuvent se former à la surface ou à l'intérieur des dispositifs médicaux implantés dans l'organisme comme les cathéters veineux. Ce qui pose un réel problème de santé publique pour les personnes nécessitant ces implants. Les patients qui nécessitent l'utilisation de tels gadgets pour un accès intraveineux pendant de longues périodes (les patients transplantés de moelle osseuse), risquent de subir un véritable danger de contamination du système circulatoire. Il a également été remarqué que la colonisation des cathéters et le développement du biofilm dans les cathéters veineux focaux se produisent rapidement (Srivastava *et al.*, 2019).

9.3 Biofilm et prothèses articulaires

Les surfaces des implants orthopédiques sont toutes sensibles à la colonisation des micro-organismes qui forment des biofilm, dont la présence joue un rôle majeur dans la pathogenèse des infections associées aux implants, telles que l'infection de l'articulation péri-prothétique (Goswami et Parvizi, 2019).

En termes de pathogenèse, l'infection de l'articulation péri-prothétique est initiée par propagation hématogène ou par ensemencement direct via une infection sus-jacente, un traumatisme pénétrant ou une contamination lors de l'implantation chirurgicale de la prothèse.

Indépendamment de la source d'ensemencement ou de l'espèce microbienne, le développement progressif de l'infection dépend de la formation et de la maturation du biofilm (Goswami et Parvizi, 2019).

10. Les techniques utilisées pour étudier les biofilms mixtes

10.1. La quantification par le cristal violet

Le test au cristal violet est très utilisé pour la quantification des biofilms malgré le fait qu'il soit toxique et variable (Amador *et al.*, 2021).

La coloration au cristal violet (CV) des biofilms dans les puits de microplaques est l'une des plates-formes les plus largement utilisées pour la quantification à haut débit de la biomasse des biofilms [(Djordjevic *et al.*, 2002) ; (Extremina *et al.*, 2011) ; (Merritt *et al.*, 2011) ; (Røder *et al.*, 2015) ; (Doll *et al.*, 2016)].

Le cristal violet se lie aux molécules chargées négativement, colore à la fois les bactéries et la matrice du biofilm environnant. Cependant, l'utilisation du CV comme méthode quantitative présente de nombreuses limites, notamment la toxicité. La combinaison des caractéristiques quantitatives et d'imagerie dans une seule méthode facilite le dépistage à haut débit des biofilms, par exemple pour la détection de l'ADN. C'est une méthode unique pour faciliter le criblage à haut débit des biofilms par ex les mutants génétiques, des conditions de croissance ou des combinaisons d'espèces dans les communautés microbiennes (Amador *et al.*, 2021).

10.2. La SYTO9

La SYTO9 est une coloration fluorescente des acides nucléiques qui est beaucoup utilisée en microbiologie, en particulier pour les analyses par microscopie à fluorescence et cytométrie de flux. Analyse basée sur la fluorimétrie, c'est-à-dire l'analyse de l'intensité de la fluorescence à partir de la mesure d'un échantillon global, est plus rentable, rapide et accessible que la microscopie ou la cytométrie en flux, mais elle requiert un étalonnage spécifique à l'application. D'autres études ont mis en évidence les inconvénients de la coloration SYTO 9 liés à une affinité de liaison avec les cellules vivantes et mortes ou à la perméabilité des cellules à Gram positif et à Gram négatif. (Robertson *et al.*, 2020).

10.3. Techniques de microscopie appliquées à l'imagerie des biofilms

10.3.1 Microscopie optique

La microscopie optique est une technique d'imagerie de base qui permet d'identifier visuellement la présence d'un biofilm et qui a également une valeur pronostique significative (**Hong *et al.*, 2014**). Elle peut être utilisée pour l'évaluation quantitative de la biomasse du biofilm, car elle est facile et peu coûteuse à réaliser (**Bulut *et al.*, 2014**). Cependant, la microscopie optique a un grossissement et une résolution limités, elle ne peut donc pas être appliquée pour décrire les détails les plus fins de la morphologie des cellules du biofilm ou de l'architecture d'EPS, mais elle peut être couplée à la microscopie électronique à balayage (SEM) et à la microscopie électronique à transmission (TEM) dans des études corrélatives comme dans une étude sur la microflore dentaire où l'observation au microscope optique de sections semi-fines de dents déminéralisées a fourni la meilleure perspective globale du canal radiculaire, permettant d'observer de plus grandes zones à faible grossissement. Les échantillons observés au MEB n'ont pas montré de bactéries dans les tubules dentinaires, en revanche, lorsque les mêmes échantillons ont été déminéralisés et inclus dans de la résine, leurs images de sections semi-minces ont révélé la présence de bactéries (**Relucanti *et al.*, 2021**).

10.3.2 Microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

La microscopie confocale à balayage laser (CLSM) permet l'évaluation quantitative de paramètres structurels tels que le biovolume (volume global des cellules dans le champ d'observation), l'épaisseur et la rugosité. Il est possible aussi de représenter l'architecture tridimensionnelle de l'échantillon et sa variation en fonction du temps (4-D en temps réel). Le CLSM a été utilisé en combinaison avec un colorant fluorescent et a été appliqué avec succès sur différentes espèces de biofilms. Le niveau de résolution du CLSM est unidimensionnel et l'utilisation de sondes spécifiques aux pathogènes marquées avec différents colorants fluorescents (FISH suivi du CLSM), permet l'identification d'une seule espèce dans des échantillons multi-espèces. Avec la même approche, l'évaluation de la compétition inter-espèces ainsi que l'interférence entre les espèces ont été analysées. Dans les études évaluant les effets antimicrobiens des médicaments, la CLSM a été utilisée, avec des fluorophores spécifiques, pour distinguer les cellules bactériennes vivantes ou mortes, en localisant également leur distribution spatiale. Le CLSM est une méthode de choix pour la visualisation et la quantification des biofilms. Malheureusement, l'analyse du biofilm par CLSM présente

des limites dues à l'utilisation de fluorophores, à l'existence d'un nombre limité de molécules rapporteuses et au fait que le signal d'intérêt peut être masqué par l'interférence de la fluorescence intrinsèque du biofilm avec celle de la sonde (Relucenti *et al.*, 2021).

10.3.3 Microscope électronique à balayage conventionnel (MEB) et à balayage à émission de champ (FESEM)

Le MEB conventionnel et l'émission de champ FESEM sont les meilleures méthodes de visualisation des biofilms avec un fort grossissement et une haute résolution permettant de décrire avec précision la morphologie du biofilm. Dans les analyses comparatives, comme l'évaluation des effets anti-biofilm d'un médicament ou d'un traitement, le MEB apparaît comme un outil extrêmement utile, car les résultats de l'imagerie MEB sont fortement corrélés avec ceux d'autres méthodes analytiques. L'utilisation de logiciels d'imagerie MEB dédiés à l'analyse d'images de biofilms a permis l'analyse morphologique quantitative des biofilms par plusieurs auteurs. Les avantages incontestés du MEB et du FESEM consistent en la capacité combinée d'imager avec une large gamme de grossissements (20 à 30 000×) couplée à une haute résolution (de 50 à 100 nm) et une profondeur de champ. De plus, les logiciels d'analyse d'images 3D permettent l'extraction de données et la quantification de résultats morphologiques détaillés. Dans l'étude des biofilms, certains inconvénients peuvent toutefois survenir. La déshydratation et le revêtement avec un matériau conducteur peuvent provoquer l'effondrement des EPS et le rétrécissement général du biofilm. Au cours d'une procédure de séchage au point critique, l'écoulement d'éthanol peut entraîner une extraction possible de l'échantillon. Le séchage à l'hexaméthylsilazane (HDMS) peut donc être utilisé comme une option précieuse, peu coûteuse et permettant de gagner du temps. Les limites du SEM et du FESEM conventionnels peuvent être surmontées en utilisant des protocoles hautement adaptés au biofilm ou en utilisant des modalités SEM alternatives telles que le VP-SEM, le cryo-SEM et le SEM environnemental (ESEM) (Relucenti *et al.*, 2021).

11. Traitements curatifs contre les biofilms déjà formés

11.1. Élimination mécanique du biofilm

Le nettoyage mécanique est considéré comme une méthode très efficace pour combattre les biofilms. En raison de l'énorme force de cisaillement qu'il génère, il élimine les microorganismes en les détachant de leur support. Cela s'applique aux biofilms qui existent

sur une variété de supports : peau, plaque dentaire, implants médicaux, bâtiments et coques de navires (**Bezoui, 2016**).

11.2. Antibiothérapie

Des études *in vitro*, et cliniques ont tenté d'identifier des associations d'antibiotiques plus compétents contre les biofilms. L'emploi d'une bithérapie pour cibler des bactéries dans des états métaboliques différents a également été suggéré chez *P. aeruginosa*. En plus de l'intérêt prouvé ou potentiel des multi-thérapies, La prolongation de la durée d'antibiothérapie à dose élevée est souvent nécessaire comme illustré dans le cas de l'endocardite infectieuse (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

11.3. L'ablation du dispositif

Dans le cadre d'une infection à un matériel implanté, l'ablation de ce dernier est souvent recommandée, car son entretien entraînera un risque élevé d'échec thérapeutique. Cette décision peut poser un problème lorsqu'elle est utilisée dans certains appareils (stimulateurs cardiaques, prothèses Orthopédique) car elle a un impact sur les patients et les coûts lié à la fixation à long terme et à l'installation d'un deuxième équipement après un traitement antibiotique (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

11.4. L'inhibition du Quorum sensing

L'utilisation de molécules interférant avec le mécanisme de QS est une stratégie thérapeutique encourageante pour contrer l'adaptation microbienne dans l'organisme et le développement sous-jacent d'épisodes infectieux (**Bjarnsholt et Givskov, 2008**). Dans cette approche, il s'agit d'interférer dans la communication inter-bactérienne pour empêcher la mise en place et la maturation du biofilm. Il a déjà été démontré que l'utilisation d'analogues structuraux des homosérines lactones, dont les furanones, brouillait les communications régies par le QS et réduisait la formation de biofilm par *P. aeruginosa* (**MortenHentzer et Givskov, 2003**). Certains antibiotiques, comme l'azithromycine, sont capables d'altérer les signaux de communication de la bactérie, bien qu'il n'a initialement qu'une faible activité bactéricide contre le bacille pyocyanique. La conséquence directe de cette perturbation de mécanisme de QS par l'antibiotique est une amélioration du tableau clinique chez les patients mucoviscidosiques [(**Saiman et al., 2003 ; Hoffmann et al., 2007**)].

11.5. Les huiles essentielles

Les cellules des biofilms prennent une apparence qui les rend 1 000 fois plus résistantes aux agents antimicrobiens que lorsqu'elles sont isolées dans la nature. Les huiles essentielles semblent jouer un rôle important dans l'éradication et le contrôle de la formation de biofilms, et peuvent également compléter les désinfectants et les antibiotiques utilisés à faible concentration. L'hydrophobicité des huiles essentielles a un effet sur leur activité, elles augmentent donc la perméabilité des cellules, altérant ainsi les parois membranaires. Cela conduit à des changements dans l'équilibre interne et externe de l'ATP, affectant les fluctuations du pH et la synthèse des protéines; provoquant des changements cytoplasmiques internes tels que la coagulation du matériel cytoplasmique, des dommages à l'ADN et l'inhibition du QS. Les huiles essentielles affectent également la régulation de la croissance bactérienne et la nutrition (El-Tarabily *et al.*, 2021).

11.6. Les enzymes comme agents anti-biofilms

Les enzymes qui aident à éliminer les biofilms existants peuvent être classées en six groupes principaux : les transférases, les oxydoréductases, les hydrolases, les lyases et les ligases ou synthétases. L'activité antisalissure associée aux enzymes entraîne la lyse des cellules en dégradant les composants de la membrane cellulaire et en déstabilisant son ancrage à la surface solide. Les enzymes saccharolytiques produites par certaines cellules bactériennes désintègrent le biofilm, ce qui mène à la libération des cellules. Ces enzymes empêchent la production d'adhésifs et la formation d'EPS, empêchant ainsi la formation du biofilm. L'amidon est un composant chimique prédominant dans la formation des biofilms ; ainsi la dégradation enzymatique du polysaccharide entraîne l'élimination du biofilm (figure 04) (Gupta *et al.*, 2016).

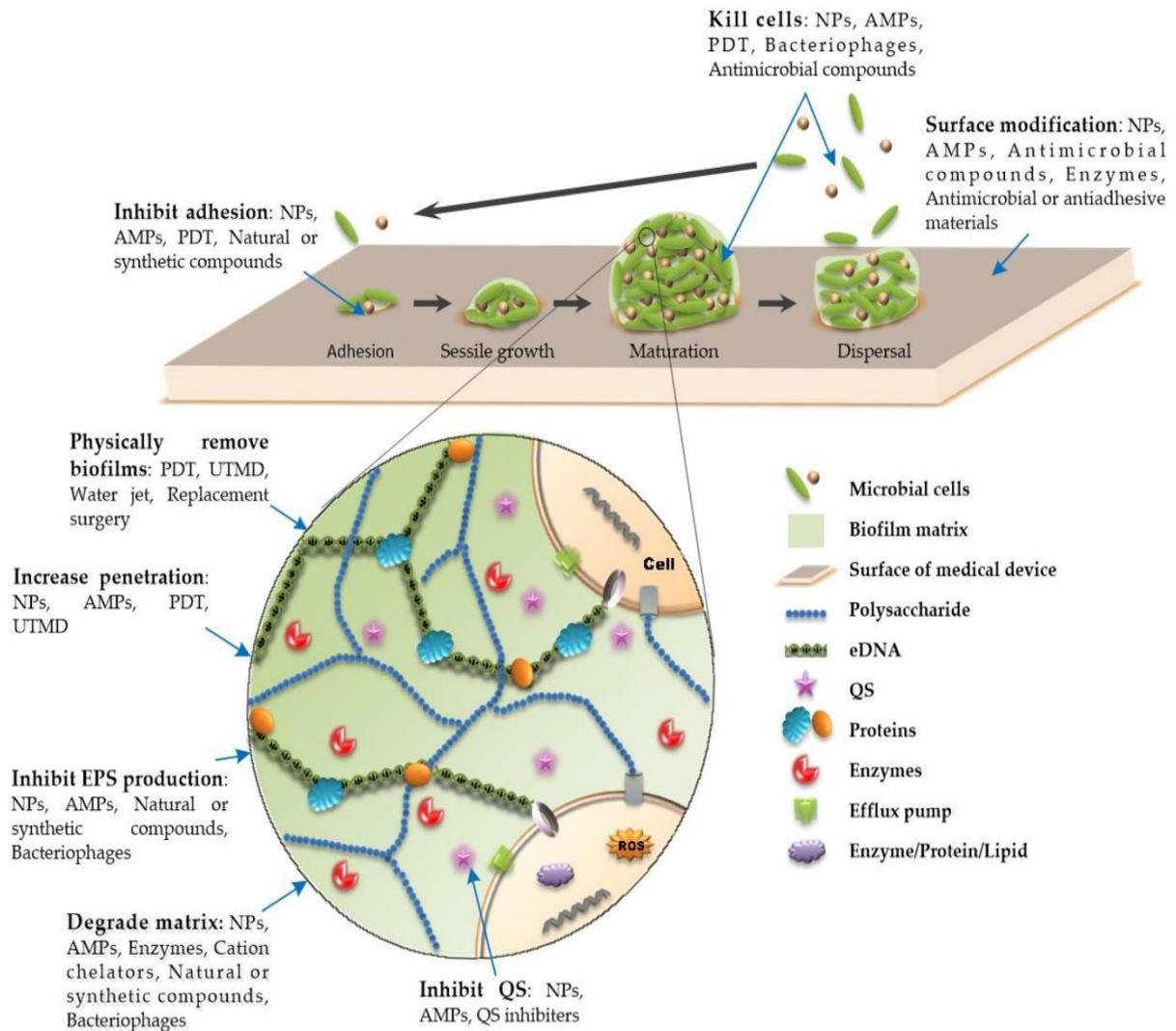
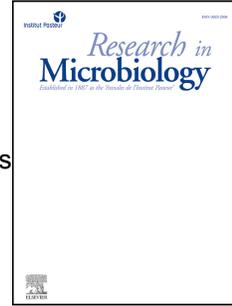


Figure 04 : Les composants d'un biofilm associé à un dispositif médical et approches contre les biofilms (XinLi *et al.*, 2021).

Journal Pre-proof



Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm

Francesca Bonvicini, Federica Belluti, Alessandra Bisi, Silvia Gobbi, Ilse Manet, Giovanna Angela Gentilomi

PII: S0923-2508(21)00087-5

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103873>

Reference: RESMIC 103873

To appear in: *Research in Microbiology*

Received Date: 10 March 2021

Revised Date: 29 June 2021

Accepted Date: 27 July 2021

Please cite this article as: F. Bonvicini, F. Belluti, A. Bisi, S. Gobbi, I. Manet, G.A. Gentilomi, Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm, *Research in Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103873>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2021 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Souches testées

Des expériences *in vitro* ont été réalisées avec la souche de référence ATCC 10231 (American Type Culture Collection) de *C. albicans* et avec l'isolat clinique MSSA 1 de *S. aureus*, précédemment démontré comme producteur de slime. *C. albicans* et MSSA 1 ont été cultivés dans du Sabouraud dextrose et dans une gélose au sang à 5%, respectivement à 37°C ; le bouillon Brain Heart Infusion BHI (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour les croissances liquides pendant la nuit, supplémenté du sérum fœtal à 10%. (FBS, Sigma-Aldrich). pour la culture des biofilms ; des plaques de gélose au sel de mannitol (BiolifeItalia) et des plaques de gélose candidogène chromogène ont été utilisées pour la croissance sélective des espèces microbiennes après le traitement des biofilms polymicrobiens.

2. Agents antimicrobiens

Les composés sélectionnés (Figure 05) ont été préparés comme indiqué dans des articles précédents (**Bonvicini et al., 2019**). Brièvement, le dérivé 1 à base de chalcone a été obtenu en faisant réagir la 5'-fluoro-2'-hydroxyacétophénone et le 3-fluorobenzaldéhyde dans l'éthanol en présence d'une solution aqueuse de KOH. D'autre part, le composé 2 a été préparé en appliquant la cycloaddition de Diels-Alder à anthracène-méthanol et maléimide, suivie d'une alkylation de l'azote de l'amide avec du bromo octane en présence de tert-butoxyde de potassium. Ces deux voies de synthèse facilement accessibles permettent d'effectuer des modifications structurelles supplémentaires afin d'améliorer le profil pharmacologique/toxicologique des molécules. Pour les expériences *in vitro*, la poudre sèche des composés a été remise en suspension dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solution de base (**Bonvicini et al., 2019**).

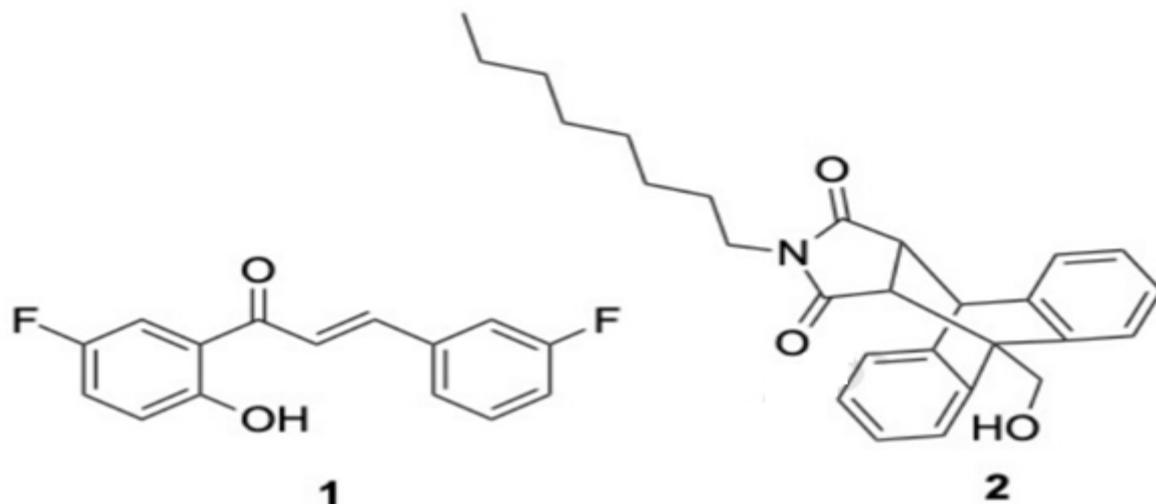


Figure 05 : Structures chimiques du dérivé à base de chalcone (composé 1) et du produit d'addition anthracène-maléimide polycyclique (composé 2), précédemment découverts par (Bonvicini *et al.*, 2019).

3. Tests de viabilité cellulaire et de cytotoxicité

Les composés ont été testés pour leurs effets cytotoxiques sur des cellules de rein de singe vert africain (Vero ATCC CCL-81) ; la viabilité cellulaire et la libération de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH) ont été évaluées sur des cellules de mammifères à la suite de l'exposition à ces substances chimiques. Ces composés ont été évalués sur des cellules de mammifères après 48 heures de traitement. En bref, 24 heures avant les expériences, les cellules ont étéensemencées dans des plaques à 96 puits à raison de 10^4 cellules/puits, et cultivées dans un milieu de culture ordinaire [Eagle's Minimal d'Eagle, 10 % de FBS (sérum fœtal de bovin), 100 μg /mL de pénicilline et 100 μg /mL de streptomycine], à 37°C. Après des lavages avec de la solution saline tamponnée au phosphate (PBS), la monocouche cellulaire a été incubée avec un milieu complet de renouvellement complété soit par le dérivé 1 à 53 μM ou le composé 2 à 4 μM , ou les deux. Après 48 h d'incubation, le milieu de culture a été collecté de chaque puits, la monocouche a été lavée avec du PBS et 100 μl de milieu frais contenant 10 μL de solution CCK-8 ont été ajoutés (CCK-8, CellCounting Kit-8, DojindoMolecular Technologies). Les valeurs de DO à 450/630 nm ont été mesurées après 2

h d'incubation et les données ont été exprimées en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport aux témoins non traités.

4 .Activité antibiofilm

Le dérivé à base de chalcone 1 et le composé anthracène-maléimide polycyclique 2 ont été testés sur des cellules planctoniques de *C. albicans* et de *S. aureus* par une méthode normalisée sur plaque à 96 puits (**Bonvicini et al., 2019**) avec de légères modifications. En bref, chaque suspension microbienne, préparée dans du PBS à 10^6 UFC/mL, a été incubé avec des dilutions sérielles doubles du composé 1 ou du composé 2 (3,125-200M), dans un volume final de 200 μ L/puits. Les deux souches ont été testées dans un milieu BHI. Après 24 h à 37°C, les valeurs de DO à 630 nm ont été mesurées.

Les biofilms ont été développés sur des plaques de 24 puits en polystyrène. Un volume de 300 μ L d'une culture de *S. aureus* et *C. albicans* à une densité de 10^5 UFC/mL a été déposé dans chaque puit . La même quantité de milieu BHI pour le biofilm mono-espèce a été ajouté, tandis que le biofilm bi-espèce a été développé par inoculation de 300 μ L de chaque culture dans le puits, pour atteindre un volume total de 600 μ L. La plaque a été incubée à 37°C pendant 90 minutes afin de promouvoir l'adhésion bactérienne et fongique, puis les puits ont été lentement rincés avec du PBS pour éliminer les cellules non attachées. Ensuite, 600 μ L de milieu BHI supplémenté avec du PBS contenant la combinaison des deux agents antimicrobiens (1 à 53 μ M et 2 à 4 μ M). a été ajouté à chaque puits et la plaque a été incubée pendant 24 heures à 37°C en condition statique pour induire la formation de biofilms. La biomasse des biofilms a été évaluée par une coloration standardisée au cristal violet (CV). En bref, les puits ont été lavés abondamment dans du PBS pour éliminer les cellules planctoniques, et la plaque a été incubée pendant 1 h à 60°C. Une solution de CV (0,1% dans l'eau) a été ajoutée à chaque puits et incubée pendant 15 minutes à température ambiante. Le CV non lié a été éliminé par des lavages répétés avec de l'eau ; enfin, le CV liée a été resolubilisé dans de l'éthanol à 95 % ; après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions de CV ont été récupérées dans les différents puits et la DO a été mesurée à 55nm. L'efficacité des composés a inhibé la formation des biofilms et a été exprimée en pourcentage de valeurs par rapport aux contrôles des biofilms non traités.

L'activité anti-biofilm du traitement combiné a également été évaluée par l'ajout des agents antimicrobiens suivants (1 à 53 μ M et 2 à 4 μ M) aux biofilms après 24h de développement. Des biofilms mono et bi-espèces ont été développés sur des plaques de 24 puits en polystyrène comme décrit ci-dessus ; Après la phase d'adhésion et la croissance du

biofilm pendant 24 h, les agents ont été ajoutés dans les puits et la plaque a été incubée à 37°C pendant 24 h supplémentaires. La masse des biofilms mono- et bi-espèces a été estimée quantitativement par coloration CV comme décrit précédemment, et les résultats ont été rapportés sous forme de valeurs en pourcentage par rapport à l'activité de l'agent.

5. Technique de dénombrement

Des biofilms polymicrobiens ont été développés sur une plaque de 24 puits en polystyrène comme décrit précédemment, en présence des agents à leurs valeurs IC50, et sans agent comme contrôle non traité. Après 24 h d'incubation, les biofilms ont été lavés abondamment avec du PBS et traités avec 1 mL de 0,1 % de dithiothréitol à (DTT) (Sputasol, Oxoid) pendant 10 minutes à 37°C pour déloger les cellules microbiennes de la matrice. Les cellules détachées ont ensuite été récupérées et placées pour le comptage des UFC. En particulier, des dilutions sérielles des suspensions ont été effectuées dans du PBS et placées sur de la gélose Chapman (pour le dénombrement de *S. aureus*) et sur de la gélose Candida Agar Chromogenic (pour le dénombrement de *C. albicans*). Après 24-48 h à 37°C, les plaques ont été imagées et les colonies ont été comptées numériquement à l'aide du VersaDoc Image System 198 et le logiciel de comptage des colonies (BioRad). La même configuration expérimentale a été appliquée sur un biofilm polymicrobien préformé de 24 heures.

6. Analyse par microscopie confocale à balayage laser (CLSM)

Pour l'analyse par microscopie, des biofilms polymicrobiens ont été formés comme décrit précédemment sur une période de 24 heures dans des lames de chambre permanox (Thermo Scientific Nunc Chamber Slide System). Les biofilms ont été produits dans du BHIB/FBS 10% contenant les deux agents antimicrobiens à leurs valeurs IC50, et sans agent comme contrôle non traité. Après 24 heures de croissance, les biofilms ont été lavés abondamment dans du PBS, séchés et fixés sur le support plastique par le méthanol à 100% pendant 2 minutes. Ensuite, des marqueurs fluorescents ont été ajoutés directement sur les lames de chambre : SYTO9 (Molecular Probes) qui lie les acides nucléiques et marque les cellules bactériennes et fongiques (**Jin *et al.*, 2005**) et Calcofluor white (compte-gouttes pour réactif Calcofluor White, BD), un colorant bleu fluorescent qui se lie aux β -1,3 et β -1,4 polysaccharides dans les parois cellulaires des champignons. Les biofilms colorés ont été lavés deux fois avec du PBS avant que l'imagerie confocale par fluorescence a été réalisée sur un système Nikon A1 avec un microscope inversé (Nikon Company). Le microscope confocal

à fluorescence Nikon A1 est équipé d'un laser à diode Picoquant CW/pulsé et d'un laser CW à ions d'argon, pour une excitation à 405 et 488 nm, respectivement. Les images ont été collectées à l'aide d'un objectif Nikon Plan Apo VC 60× à immersion d'huile avec NA 1,40. Les filtres ont été réglés de manière à enregistrer la fluorescence du SYTO9 ou du Calcofluor blanc dans les plages de longueurs d'onde 228 450/50 nm et 525/50 nm. Des images DIC ont complété la partie imagerie. Lorsque cela était utile, la LUT (Look-up-table) est visualisée dans les images confocales de fluorescence.

7. Analyse statistique

Pour l'étude des biofilms, 3 puits pour chaque régime de traitement ont été analysés et au moins deux expériences indépendantes ont été réalisées. Pour les essais de viabilité cellulaire et de cytotoxicité, 3 puits pour chaque condition ont été testés et trois expériences indépendantes ont été réalisées. Les pourcentages par rapport aux témoins non traités. Les différences entre les échantillons ont été déterminées par test de student, ou ANOVA suivi du test de comparaison multiple de Dunnett à l'aide du logiciel GraphPadPrism, version 6.0 (GraphPad Software). La signification statistique a été fixée à des valeurs $p < 0,05$.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1 . Biofilms polymicrobiens

Dans la présente étude, toutes les expériences visant à évaluer quantitativement les biomasses de biofilm ont été réalisées sur des plaques de polystyrène à 24 puits au lieu des plaques conventionnelles à 96 puits, contenant des espèces microbiennes à 10^5 CFU/mL et en cultivant les cellules dans un bouillon BHI supplémenté de 10% FBS pendant 24-48 h. Ce modèle de biofilm a été choisi afin de permettre le développement du biofilm ce qui permet de mesurer correctement leur biomasse après les traitements. En outre, le FBS a été ajouté au milieu de culture pour imiter l'environnement physiologique humain. Une série d'expériences préliminaires a indiqué que la co-incubation de *C. albicans* et *S. aureus* permettait le développement d'une plus grande quantité de biomasse de biofilm. L'augmentation synergique de la biomasse est probablement liée au milieu de culture utilisé . En effet, le bouillon BHI complété par du FBS stimule la morphogénèse de la levure à l'hyphe de *C. albicans*, ce qui à son tour favorise la production de biofilms de *S. aureus*, car les tubes germinatifs et les formes hyphales servent d'échafaudage pour l'adhésion et l'agrégation bactériennes. Il a été rapporté que *S. aureus* adhère directement à la protéine Als3 de *C. albicans* afin de former un complexe structure avec une augmentation des interactions mutuellement bénéfiques, une tolérance antimicrobienne accrue et une protection contre les défenses de l'hôte [(Peter *et al.*, 2010) ;(Hariott *et al.*, 2011) ;(Zago *et al.*, 2015) ;(Rodrigues *et al.*, 2019)]; Dans la présente étude, l'interaction physique entre *C. albicans* et *S. aureus* dans le biofilm mixte a été démontrée par une analyse CLSM où les images ont montré l'adhérence et l'agglutination des staphylocoques autour des hyphes de *C. albicans*, formant des agrégats de biofilms épais (Figure 06).

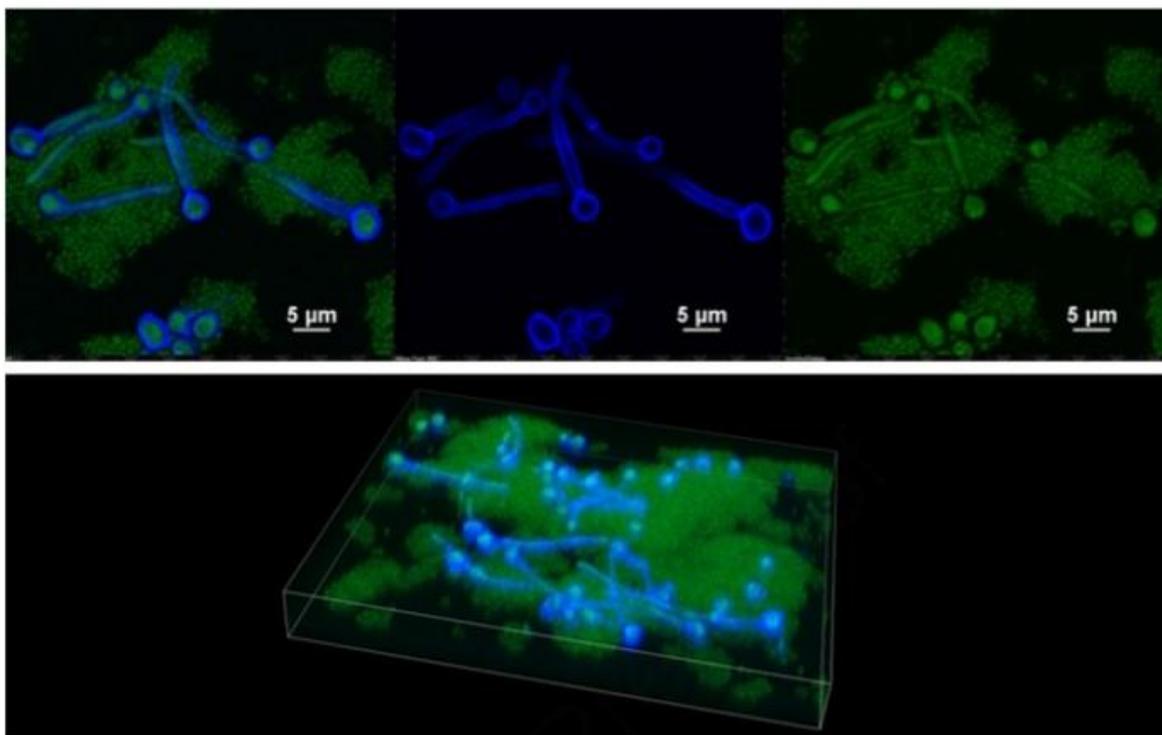


Figure 06 : Images CLSM (en haut) et reconstruction 3D de la pile Z sur 10 m (en bas) des biofilms mixtes. (Les biofilms ont été colorés avec du Calcofluor blanc et du SYTO9 collectant la fluorescence à 450 nm (images bleues) et 525 nm (vert) ainsi qu'une image fusionnée. Ces résultats démontrent que *S.aureus* adhère et forme des agrégats de biofilms autour des hyphes de *C. albicans*).

2 . Activité et sélectivité des composés

La sensibilité antimicrobienne des agents antimicrobiens nouvellement identifiés a été évaluée à la fois sur des cellules planctoniques et des biofilms de *C. albicans* et de *S. aureus* afin de valider leurs propriétés inhibitrices, et de vérifier leur sélectivité dans le cadre expérimental actuel. Les valeurs IC₅₀ ont donné 53 µM pour le composé 1 contre *C. albicans* et 4 µM pour le composé 2 contre *S. aureus* confirmant les résultats obtenus précédemment, ainsi l'activité de ces agents antimicrobiens dans le milieu utilisé (BHI) a été évaluée au lieu du milieu RPMI-1640 pour *C. albicans* et bouillon Mueller Hinton pour *S. aureus*. Ni le composé antifongique ni l'agent antibactérien n'ont interféré avec la croissance de *S. aureus* et de *C. albicans*, respectivement. En outre, aucune activité croisée n'a été mesurée sur les biofilms monomicrobiens lorsqu'ils ont été testés avec des composés à leur IC₅₀, ce qui prouve l'activité spécifique des deux antimicrobiens.

3. Viabilité cellulaire et cytotoxicité

Après avoir évalué l'activité et la sélectivité des composés à leurs valeurs IC₅₀, ils ont été utilisés dans l'étude sur des cellules de mammifères. Les agents antimicrobiens ont été utilisés comme agent unique à 53 µM pour le composé 1 et 4 µM pour le composé 2, et dans un traitement combiné pendant 48 heures. Les tests ont été réalisés pour mesurer à la fois la viabilité cellulaire et les dommages causés à la membrane cellulaire. En traitement unique, les composés n'ont montré aucune toxicité, tandis que le traitement combiné a exercé un certain degré de cytotoxicité. ; en particulier, aux concentrations testées, la viabilité cellulaire a été réduite de 39,4 % par rapport aux témoins positifs, mais le traitement combiné n'a pas permis d'atteindre ce niveau. par rapport aux contrôles positifs, par contre l'activité LDH, un marqueur de la mort cellulaire, a augmenté de 22,8 %. (Figure 7 A et B). Des pourcentages inférieurs à 25 % sont acceptables, ce qui indique un bon profil de sécurité.

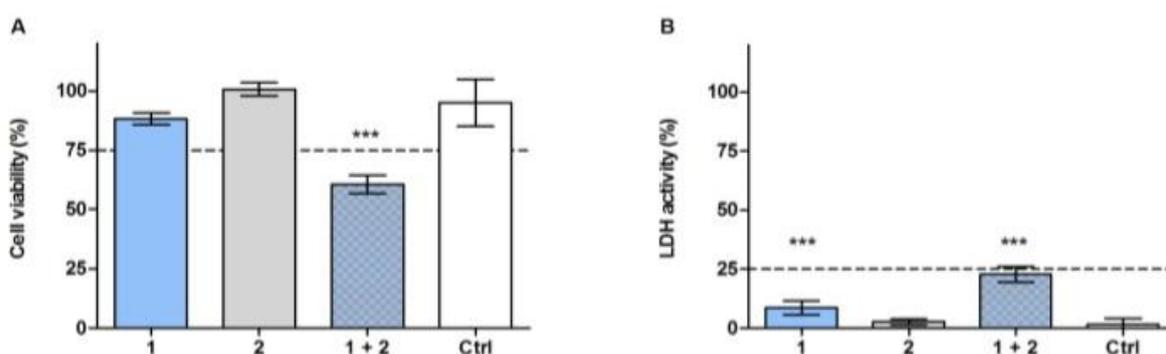


Figure 07 :Cellules Vero cultivées pendant 48 h en présence du dérivé à base de chalcone (1), de l'anthracène-maléimide polycyclique (2), et des deux antimicrobiens (1+2).

Le traitement combiné diminue significativement la viabilité cellulaire (A) alors que l'activité LDH (B), indice de la mort cellulaire, reste acceptable (moins de 25 %), suggérant un effet cytologique sur la prolifération cellulaire plutôt qu'une activité cytotoxique. Les valeurs en pourcentage sont relatives aux cellules non traitées.

4. Traitement combiné du biofilm mono-espèce

Dans les études précédentes, l'activité anti-biofilm de chaque composé a été établie contre un biofilm mono espèce et dans différents contextes expérimentaux, y compris les conditions de culture (milieu RPMI-1640 pour *C. albicans*, bouillon Mueller Hinton pour *S. aureus*, les méthodes de coloration CV et test de viabilité) (Bonvicini *et al.*, 2019). Dans le présent document, les nouvelles recherches ont été effectuées dans le bouillon BHI, un milieu riche en nutriments, et du FBS pour produire les biofilms. En outre, l'essai CV a été choisi comme méthode pour l'évaluation des biofilms, car il mesure la quantité de la matrice polymérique au lieu de l'activité métabolique des cellules. Il est connu que les cellules fongiques et bactériennes ne représentent que 5 à 35 % du volume du biofilm, et que le reste est constitué de la matrice extracellulaire, de sorte que les essais mesurant la viabilité des cellules du biofilm peuvent ne pas définir avec précision les propriétés des composés en termes d'inhibition et d'éradication du biofilm, et manquer de fiabilité pour un nombre inférieur de cellules. L'efficacité du traitement combiné a été déterminée sur des biofilms mono-spécifiques de *C. albicans* et de *S. aureus* en ajoutant les deux agents à leurs valeurs IC50 pendant le développement du biofilm. Les composés ont inhibé de manière significative la formation du biofilm par rapport aux contrôles non traités avec valeurs de pourcentage de $58,5 \pm 2,1$ % pour *C. albicans* et $60,2 \pm 9,1$ % pour *S. aureus* (Figure 8 A). En outre, ils ont montré une activité modérée envers les biofilms mono-espèces préformés en réduisant les biomasses de $34,5 \pm 1,8$ % et $26,7 \pm 0,9$ % pour *C. albicans* et *S. aureus*, respectivement (Figure 8 B).

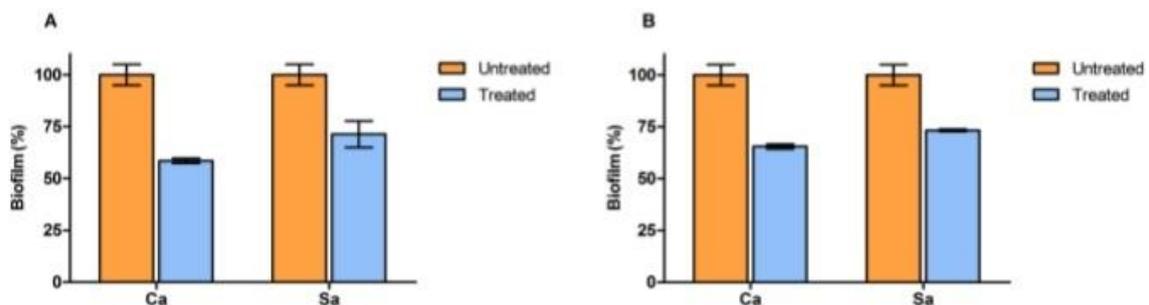


Figure 08 : Activité anti-biofilm du traitement combiné sur les biofilms mono-spécifiques. (Les composés ont été utilisés à leurs valeurs IC50 et leurs propriétés inhibitrices ont été évaluées sur la formation du biofilm (A) et sur un biofilm préformé de 24 heures (B)).

5. Traitement combiné du biofilm de *C.albicans-S.aureus*

Après avoir évalué l'activité sur les biofilms mono-spécifiques, l'efficacité des composés 1 et 2 a été évaluée sur le biofilm mixte *C. albicans-S.aureus*. Le dérivé 1 à 53 μM et le composé 2 à 4 μM ont été ajoutés à un bouillon BHI complété par 10% de FBS et les biomasses des biofilms ont été mesurés quantitativement après 24 heures d'incubation. L'utilisation combinée de ces composés a inhibé de manière significative le développement du biofilm mixte bactérien-fongique par rapport au contrôle non traité avec une valeur en pourcentage de $62,4 \pm 9,3 \%$. La nature de l'interaction entre les deux agents a été analysée en mesurant les biomasses des biofilms polymicrobiens traités avec les différentes concentrations antimicrobiennes. Une matrice de concentrations a été appliquée, et les valeurs de pourcentage d'inhibition du biofilm obtenues dans chaque condition expérimentale, par rapport au contrôle non traité, ont été rapportées dans la (Figure 9A). Dans cette série d'expériences, l'activité inhibitrice des agents à leurs valeurs IC50 s'est avérée être plus de 2 fois la somme de l'effet individuel des composés (11,1 % et 13,3 %). Ainsi, le dérivé à base de chalcone 1 et l'agent antibactérien 2 ont montré une activité antimicrobienne synergique, à une concentration non cytotoxique. La même approche expérimentale a été utilisée pour évaluer les activités du traitement combiné sur les biofilms polymicrobiens préformés (Figure 9B). La réduction globale de la biomasse de $64,4 \pm 6,2 \%$ était supérieure à la somme des activités individuelles (27,9 % et 28,5 %), (Figure 9B). mais la synergie entre les composés était moins marquée par rapport à leur activité sur le développement du biofilm.

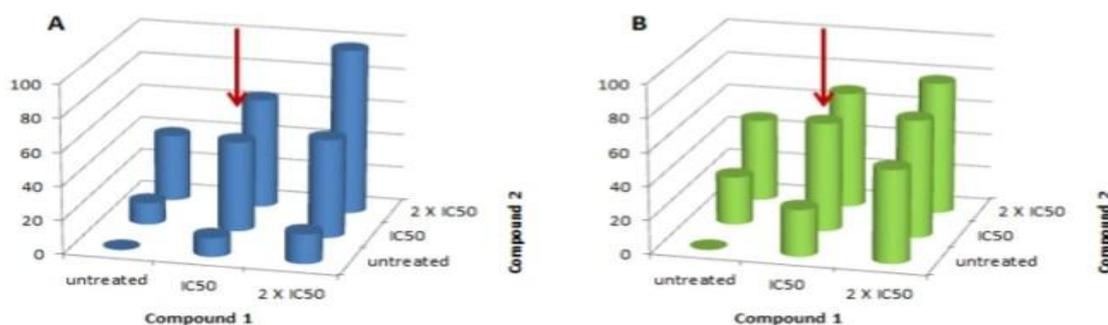


Figure 09 : Pourcentage d'inhibition du biofilm obtenu en utilisant différentes combinaisons de composés contre le biofilm polymicrobien.

(Les flèches rouges indiquent l'effet des agents combinés à leurs valeurs d'IC50. Dans les deux conditions expérimentales A : formation du biofilm ; B : rupture du biofilm, l'inhibition

globale est plus élevée que la somme des inhibitions des agents combinés. L'inhibition globale est supérieure à la somme des effets individuels des composés).

6. Résultats du dénombrement

Afin d'approfondir les propriétés anti-biofilm des composés, des dénombrement CFU sur des plaques d'agar sélectif ont été effectués sur des cellules détachées de la communauté du biofilm de *C. albicans*-*S. aureus*. Les biofilms traités et non traités ont été perturbés par l'ajout de l'agent réducteur DTT, et les cellules viables ont été placées sur une gélose au mannitol salé et de la gélose *Candida* chromogène pour la croissance. L'utilisation combinée du composé antifongique 1 et de l'agent antibactérien 2 a réduit de manière significative la viabilité des espèces microbiennes par rapport aux témoins non traités (Figure 10). Le traitement a été plus efficace pour réduire *C. albicans* du biofilm polymicrobien par rapport à la réduction de *S. aureus*. En effet, les deux espèces à l'intérieur du biofilm mixte étaient susceptibles d'être inhiber par les agents, mais les mesures d'UFC a indiqué une réduction de 1,9 unité logarithmique pour *C. albicans* et de 1,1 unité logarithmique pour *S. aureus*. Le même cadre expérimental a été appliqué pour évaluer l'efficacité des composés après le développement du biofilm. Le dénombrement des UFC a permis de mesurer une activité de destruction plus élevée du traitement combiné sur *C. albicans* par rapport à *S.aureus* (réduction de 1,8 et 1,3 log-unité pour *C. albicans* et *S. aureus*,respectivement). Dans les conditions expérimentales actuelles, l'utilisation combinée du dérivé 1 à base de chalcone et d'un agent antibactérien a permis d'obtenir des résultats positifs à base de chalcone 1 et de l'agent antibactérien 2 a principalement affecté la viabilité fongique par rapport à la viabilité bactérienne, ce qui suggère que *S. aureus*, au sein du biofilm, était plus résistant à l'élimination. Une explication possible est que *S. aureus* étant encasté dans la matrice du biofilm, pendant la croissance polymicrobienne, la tolérance à la matrice du biofilm s'est accrue a amélioré la tolérance au composé polycyclique anthracène-maléimide 2. Cette constatation a été précédemment rapportée pour des médicaments antibiotiques couramment utilisés.

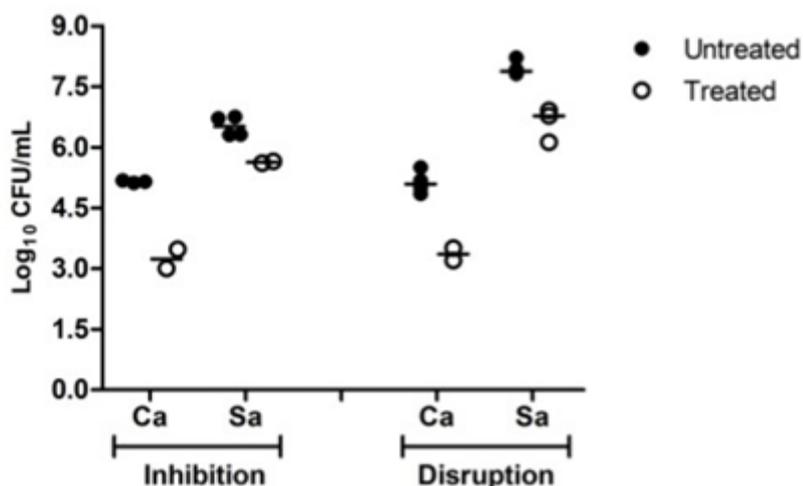


Figure 10 : Dénombrement des UFC de chaque espèce microbienne après le traitement combiné du biofilm polymicrobien.

Les cellules ont été récupérées à partir de la croissance du biofilm sur des plaques d'agar sélectives. Dans les deux conditions expérimentales, l'inhibition du biofilm et la perturbation d'un biofilm préformé, *C. albicans* affiche une plus grande sensibilité à la destruction des composés.

7 . Microscopie confocale à balayage laser

La microscopie confocale à balayage laser à fluorescence a été réalisée sur des biofilms à double espèce traités avec les antimicrobiens, et non traités comme contrôle. Deux marqueurs ont été utilisés pour colorer les biofilms SYTO9, permettant la détection des acides nucléiques, et Calcofluor blanc, ciblant les polysaccharides de la paroi cellulaire fongique. Comme prévu, le Calcofluor blanc colore les parois des cellules fongiques et les hyphes étendus de *C. albicans*. Le SYTO9 a coloré le matériel d'acide nucléique de ces deux espèces. Le traitement avec les agents 1 et 2 a provoqué une forte réduction de l'intensité de la fluorescence des deux fluorophores. Dans le cas de *C. albicans*, la réduction de l'intensité de fluorescence du Calcofluor blanc peut indiquer l'activité du dérivé 1 en termes de diminution de la synthèse des polysaccharides, ou de la dégradation de la chitine et du β -1,3 glucane.

En effet, le mécanisme d'action proposé des chalcones implique l'inhibition de la 1,3 β -glucane synthase et de la chitine synthase (Mahapatra *et al.*, 2015). Pour les deux espèces, la réduction de l'intensité de la fluorescence de SYTO9 indique vraisemblablement des quantités réduites d'acides nucléiques probablement dues à l'inhibition ou à la dégradation de l'ADN-ARN et des fuites dans les membranes cellulaires. En effet, il a été précédemment démontré que l'anthracène polycyclique . Le composé maléimide 2 a une activité de perturbation de la membrane des cellules de *S. aureus*, ce qui entraîne une perte d'acides nucléiques à travers la membrane cytoplasmique endommagée.

Il est important de noter que les images CLSM des (figures 11 et 12) révèlent clairement que le traitement combiné conduit à une réduction considérable de la biomasse et des agrégats cellulaires, ainsi qu'à une diminution significative de la quantité de formes d'hyphe de *C. albicans*. Le nombre de cellules de *C. albicans* n'a pas diminué de manière significative. mais la transition levure-hyphe a été remarquablement altérée, ce qui est conforme à l'activité proposée . Les images ont également révélé une réduction du nombre de bactéries *S. aureus*.

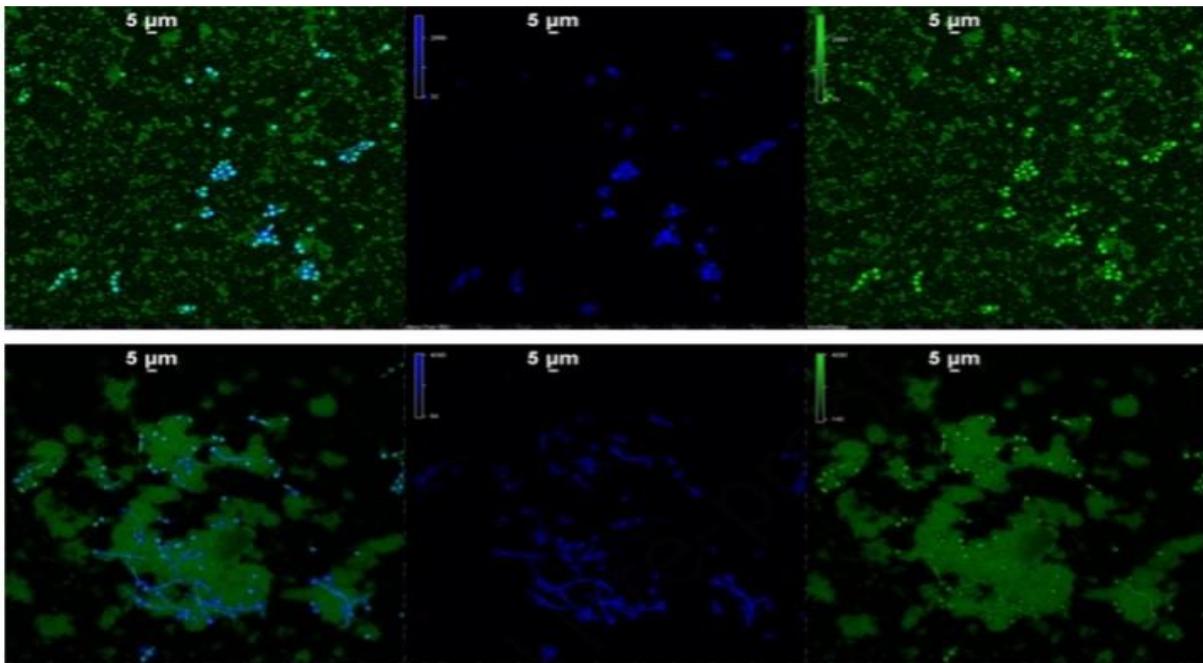


Figure 11 : Images CLSM de biofilms polymicrobiens avec le blanc de Calcofluor et le SYTO9 recueillant la fluorescence à 450 nm (images bleues) et 525 nm (vert) ainsi qu'une image fusionnée.

(En bas) biofilm non traité, (en haut) biofilm traité avec les antimicrobiens 1 et 2. L'échelle d'intensité de la LUT est affichée pour chaque image monochromatique.

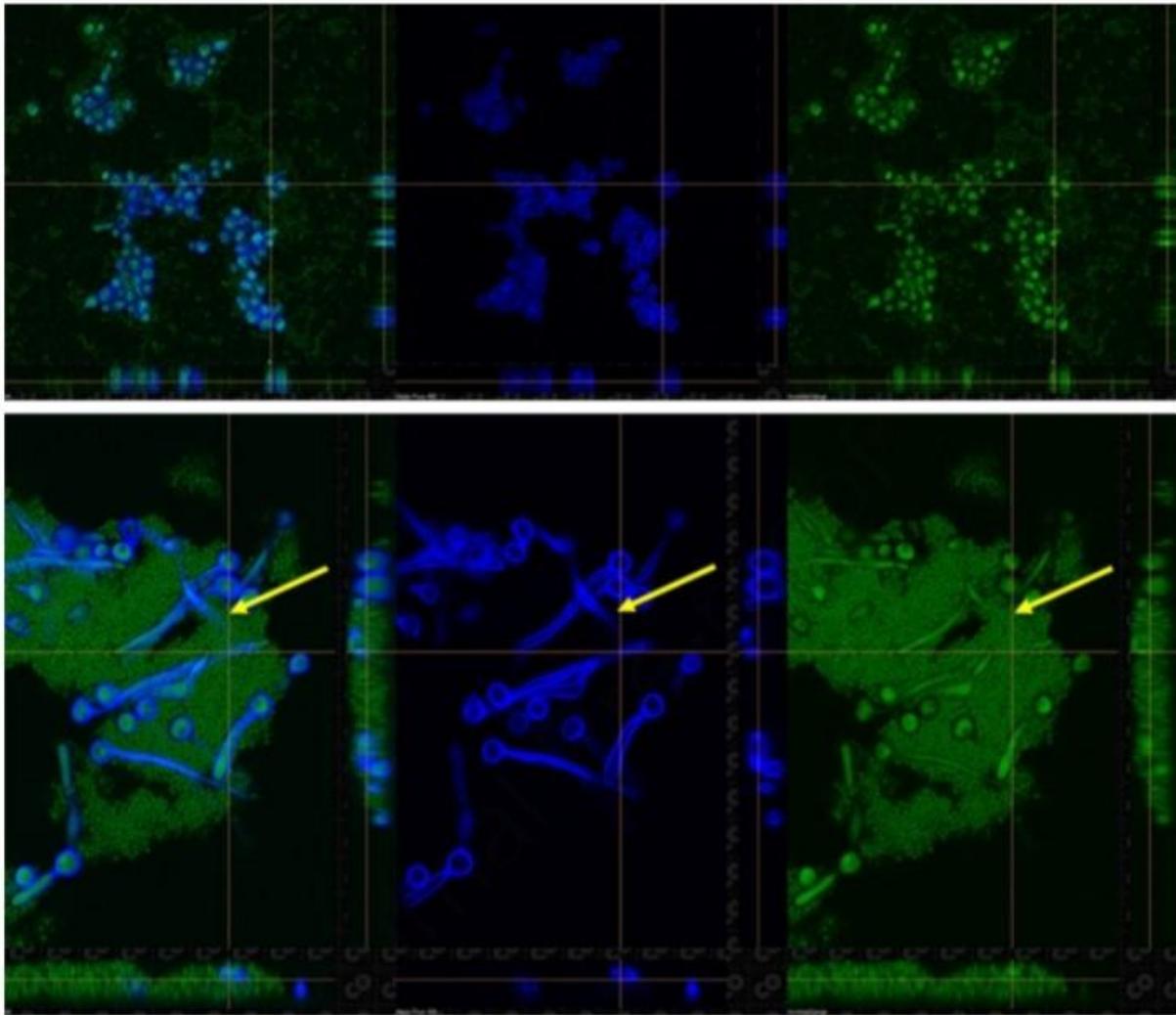


Figure 12 : Images CLSM en Z de biofilms polymicrobiens colorés avec du Calcofluor blanc et du SYTO9 collectant la fluorescence à 450 nm (images bleues) et 525 nm (vert). (La flèche jaune dans le panneau central montrant le plan XY pour l'échantillon non traité indique les attachements évidents des staphylocoques aux hyphes fongiques.

Conclusion

Conclusion

Les traitements des infections à biofilms sont complexes car ils sont responsables de la tolérance aux antibiotiques.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus ici indiquent que la thérapie de combinaison comprenant un agent antifongique et un agent antibactérien pourrait représenter une stratégie très utile pour parvenir à la prévention et au traitement d'une infection polymicrobienne.

Cette stratégie incarne un principe intéressant pour continuer à explorer de nouvelles combinaisons. Une campagne a été entreprise sur ce prototype de combinaison afin d'optimiser son profil antimicrobien avec une attention particulière à la sélection d'un agent antifongique plus efficace. Une autre approche pour atteindre cet objectif pourrait être la conception et la synthèse de molécules hybrides, l'hybridation étant considérée comme une stratégie précieuse pour obtenir des médicaments dotés d'un profil multipotent. Ainsi, l'incorporation des deux molécules étudiées ou leurs unités pharmacophores dans une seule entité chimique est prometteuse pour l'obtention de molécules antibactériennes et antifongiques puissantes dotées de propriétés anti-biofilm améliorées.

Références bibliographiques

A

Alnnasouri M. (2010). Etude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau Composition. Thèse de doctorat : Génie des Procédés et des Produits. Lorraine: Institut National Polytechnique de Lorraine, 160p.

Amador C. I., Stannius R. O., Røder H. L., & BurmølleM. (2021). High-throughput screening alternative to crystal violet biofilm assay combining fluorescence quantification and imaging. *Journal of Microbiological Methods*, 190, 106343.

B

Baudin M. (2017). Couplage de rapporteurs génétiques et d'une molécule active pour l'étude de la dispersion de biofilms. Thèse de doctorat: Biologie. France: Université Paris-Saclay, 158p.

Batoni G.; Maisetta G.; Esin S.; Int. J.; Mol Sci.(2021). Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides in Polymicrobial Biofilm-Associated Infections. *International journal of molecular sciences*, 22(2), 482.

Banerjee D., Shivapriya P. M., Gautam P. K., et al. (2019). A Review on Basic Biology of Bacterial Biofilm Infections and Their Treatments by Nanotechnology-Based Approaches [en ligne]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 243-25.

Bezoui M. (2016). Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine. Thèse de doctorat: Pharmacie. Rabat: Université Mohammed V- Rabat, 110 p.

Brauge T. (2015). Etude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat : Microbiologie. Université Lille 1- Sciences et technologies, 385P.

Bonvicini F., Belluti F., Bisi A., Gobbi, S., Manet I., & Gentilomi G. A. (2021). Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm. *Research in microbiology*, 172(6), 103873.

Bezoui M. (2016). Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine .Thèse de Doctorat : Microbiologi. Rabat : université de Mohammed V- Rabat, 111P.

Bjarnsholt, T., & Givskov, M. (2008). Quorum sensing inhibitory drugs as next generation antimicrobials: worth the effort? *Current Infectious Disease Reports*, 10(1), 22–28.

C

Chibi A. (2015). Evaluation de formation de biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* isolées de CHU Tlemcen. Mémoire de Master : Biologie Moléculaire et Cellulaire. Tlemcen : Université Aboubekr Belkaid Tlemcen, 61 P.

D

Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), P881–890.

E

El-Tarabily K.A., El-Saadony M.T., Alagawany M., Arif M., Batiha G.E., Khafaga A.F., Elwan H.A.M., Elnesr S.S et El-Hack M.E. (2021). Using essential oils to overcome bacterial biofilm formation and their antimicrobial resistance. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol 28 (9), 5145-5156 .

G

Gulati M., Nobile C. J. (2016). *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*, 18(5), 310-321.

Gupta H., Barue M.K. (2016). Identifying enablers of technological innovation for Indian MSME using best -worst multi criteria decision making method . *Technological forecasting and social change* ,107,69-79.

H

Hoffmann N., Lee B., Hentzer M., Rasmussen T. B., Song Z., Johansen H. K., Høiby N. (2007). Azithromycin blocks quorum sensing and alginate polymer formation and increases the sensitivity to serum and stationary-growth-phase killing of *Pseudomonas aeruginosa* and attenuates chronic *P. aeruginosa* lung infection in Cftr(-/-) mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3677–3687.

Hentzer Morten., & Givskov M. (2003). Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300–1307.

K

Kanafani Z. A., et Perfect J. R. (2008). Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clinical infectious diseases*, 46(1), 120-128.

Kone T. (2012). Etude expérimentale du couplage entre croissance bactérienne et transport d'un polluant organique en milieu poreux. Thèse de doctorat: Génie Civil. Lorraine: Université de Lorraine, 138 p.

Keskin N. B., Aydın Z. U., Uslu, G., Özyürek, T., Erdönmez D., & Gündoğar M. (2021). Antibacterial efficacy of copper-added chitosan nanoparticles: A confocal laser scanning microscopy analysis. *Odontology*, 109(4), 868-873.

L

Lebeaux D., Ghigo JM. (2012). Infections associées aux biofilms Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? .Unité de Génétique des Biofilms [en ligne], 9(8), P727-39.

Lebeaux D., Lucet J C., & Barbier, F S. (2016). Nouvelles recommandations pour les infections associées au biofilm: implications en réanimation. *Réanimation*, 25(3), 308-317.

Li X., Sun L., Zhang P., & Wang Y. (2021). Novel approaches to combat medical device-associated biofilms. *Coatings*, 11(3), 294.

M

Mebarki M. (2016). Traitement de biofilm bactérien par les molécules bioactives. Mémoire de Master : Microbiologie Appliquée. Tlemcen : Université de Tlemcen, p44 .

Monroe M.C., Morzunov S.P., Johnson A.M., Bowen M.D., Artsob H., Yates T., Peters C.J., Rollin P.E., Ksiazek T.G. and Nichol S.T. (2007) Genetic diversity and distribution of peromyscus-borne Hantaviruses in North America. *Emerging Infectious Diseases*, 5(1):75-86.

McGoverin C., Robertson J., Jonmohamadi Y., Swift S., & Vanholsbeeck F. (2020). Species Dependence of SYTO 9 Staining of Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 2149.

P

Peman J., Canton E., Espinel-Ingroff A. (2009). Antifungal drug resistance mechanisms. *Expert review of anti-infective therapy*, 7(4), 453-460.

Percival S.L., et Bowler P.G. (2004). Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds*, 16, 234-240.

R

Rambelomamonjy H. (2017). Evaluation de la formation du biofilm sous différentes conditions de culture (milieu de croissance, acidité et température) chez : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Mémoire de Master : biotechnologie. Antananarivo : Université d'Antananarivo, 32 P.

Roux A., Ghigo JM., (2006). Les biofilms bactérien (Bacterial biofilms). Revue Groupe de Génétique des Biofilms, Institut Pasteur. Tome, P159 - N°3 .

Roux A. et Ghigo J.M. (2006). Les biofilms bactériens. Académie vétérinaire de France, 159(3), 261-268.

Rodrigues M E.; Gomes F.; Rodrigues C F.(2019) . *Candida* Spp./Bacteria Mixed Biofilms. *J. Fungi* p6-5.

Relucenti M., Familiari G., Donfrancesco O., Taurino M., Li, X., Chen R., ... Selan L. (2021). Microscopy methods for biofilm imaging: focus on SEM and VP-SEM pros and cons. *Biology*, 10(1), 51.

S

Saiman L., Marshall B. C., Mayer-Hamblett N., Burns, J. L., Quittner A. L., Cibene D. A., ...Campbell P. W. (2003). Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa* : a randomized controlled trial. *JAMA*, 290(13), 1749–176.

Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkharroubi L., &Boucherit K. (2017). Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (*Candida*–bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(1), 20-27.

Srivastava A., Chandra N., Kumar S. (2019). The Role of Biofilms in Medical Devices and Implants. In: Kumar S., Chandra N., Singh L., Hashmi M., Varma A. (eds) *Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control*. India, P 151-165.

T

Tasse J. (2017). Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires aux *staphylocoques*. Thèse de doctorat: Microbiologie. Lyon: Université Claude Bernard Lyon 1, 210 p.

V

Vandeputte P., Ferrari S., & Coste A. T. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012.

Vestby L.K., Grønseth T.,Simm R.,Nesse L.L. (2020) Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics* ,P 9- 59.

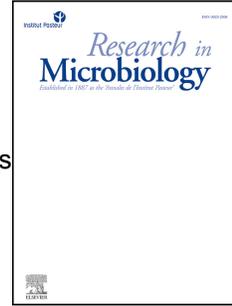
W

Wang Q., Goswami K., Kuo F. C., Xu C., Tan T. L., & Parvizi J. (2019). Two-stage exchange arthroplasty for periprosthetic joint infection: the rate and reason for the attrition after the first stage. *The Journal of Arthroplasty*, 34(11), 2749-2756.

Y

Yannick D.N et al. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. Article in *Canadian journal of veterinaryresearch*, 78, P110-116.

Journal Pre-proof



Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm

Francesca Bonvicini, Federica Belluti, Alessandra Bisi, Silvia Gobbi, Ilse Manet, Giovanna Angela Gentilomi

PII: S0923-2508(21)00087-5

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103873>

Reference: RESMIC 103873

To appear in: *Research in Microbiology*

Received Date: 10 March 2021

Revised Date: 29 June 2021

Accepted Date: 27 July 2021

Please cite this article as: F. Bonvicini, F. Belluti, A. Bisi, S. Gobbi, I. Manet, G.A. Gentilomi, Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm, *Research in Microbiology*, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103873>.

This is a PDF file of an article that has undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but it is not yet the definitive version of record. This version will undergo additional copyediting, typesetting and review before it is published in its final form, but we are providing this version to give early visibility of the article. Please note that, during the production process, errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

© 2021 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1 **Improved eradication efficacy of a combination of newly identified antimicrobial**
2 **agents in *C. albicans* and *S. aureus* mixed-species biofilm**

3
4
5 Francesca Bonvicini^{a*}, Federica Belluti^b, Alessandra Bisi^b, Silvia Gobbi^b, Ilse Manet^c,
6 Giovanna Angela Gentilomi^a

7
8 ^a*Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum, University of*
9 *Bologna, Via Massarenti 9, 40138 Bologna, Italy*

10 ^b*Department of Pharmacy and Biotechnology, Alma Mater Studiorum, University of*
11 *Bologna, Via Belmeloro 6, 40126 Bologna, Italy*

12 ^c*Institute for Organic and Photoreactivity (ISOF), National Research Council (CNR), Via*
13 *Gobetti 101, 40129 Bologna, Italy*

14
15
16
17
18 Francesca Bonvicini e-mail address:

19 *Correspondence: francesca.bonvicini4@unibo.it (Francesca Bonvicini)

20 E-mail addresses: federica.belluti@unibo.it (Federica Belluti), alessandra.bisi@unibo.it
21 (Alessandra Bisi), silvia.gobbi@unibo.it (Silvia Gobbi), ilse.manet@isof.cnr.it (Ilse Manet);
22 giovanna.gentilomi@unibo.it (Giovanna Angela Gentilomi).

23

24

Abstract

Candida albicans and *Staphylococcus aureus* are common human pathogens, frequently isolated independently or co-isolated from bloodstream infections, and able to form dense polymicrobial biofilms on various medical devices resulting in strong resistance to conventionally used antimicrobials. New and innovative approaches are therefore needed to ensure the successful management of biofilm related infections. In this study, a chalcone-based derivative and a polycyclic anthracene-maleimide adduct, previously ascertained by us as inhibitors of *C. albicans* and *S. aureus* growths, respectively, were reconsidered in a new perspective by evaluating the efficacy of a combined treatment against a polymicrobial biofilm. Both quantitative and qualitative analyses were carried out to delve into their inhibitory potential on the polymicrobial population. Our results indicate that these newly identified antimicrobials are effective in reducing the biomass of the mixed *C. albicans*-*S. aureus* biofilm and the viability of fungal-bacterial cells within the polymicrobial community; in addition, confocal laser scanning microscopy demonstrate that compounds **1** and **2** treatment thoroughly modifies the architecture of the dual-species biofilm.

Keywords: polymicrobial biofilms; chalcone-based derivative; polycyclic anthracene-maleimide adduct; antimicrobial combinations; synergy

43 1. Introduction

44 Biofilms are well-structured population of microbial cells that are enclosed in a self-
45 produced extracellular polymer matrix, adherent to virtually all biotic or abiotic surfaces. Today
46 there is absolutely no doubt that microbial cells within the biofilm have an increased antibiotic
47 tolerance and virulence. The clinical scenario suggests that biofilms occur *in vivo* with almost more
48 than 75% of human infections recognized to be biofilm-related [1–3]. Although some infections
49 are caused by a single species pathogen, polymicrobial biofilms of fungal and bacterial cells have
50 been identified frequently [4]. This event often renders both the identification of the etiological
51 agents and the treatment of the infection more difficult.

52 The interspecies interactions among phylogenetically diverse microbes have variable
53 impact on polymicrobial compositions, ranging from synergistic relationships to growth
54 competition during the biofilm development process [5–7]. In this context, microorganisms could
55 exhibit altered sensitivity to antimicrobial agents [8], leading to a worsen disease progression [9].

56 Among the fungal species, *Candida albicans* is the most common human pathogen causing
57 diseases ranging from superficial mucosal to life-threatening systemic infections mainly associated
58 with its ability to form biofilm. In some niches in the host, *C. albicans* coexists with different
59 bacterial species, and it is able to form polymicrobial biofilms with many partners including
60 *Staphylococcus aureus* [5,10]. Although *S. aureus* is a poor former of biofilms compared to other
61 staphylococci, it substantially increases its biofilm capability in the presence of *C. albicans*, as the
62 fungus creates a scaffold for the bacteria [11]. *Candida* spp. and *S. aureus* mixed infections may
63 occur in several body districts, including skin, lung, oral cavity, as well as blood stream as a
64 consequence of the colonization of medical devices [12–15].

65 The chemotherapeutic treatment of the polymicrobial biofilms requires a combination of antifungal
66 agents and antibiotics, but it has been reported that such a combination strategy shows poor efficacy

67 and most of which suffer from several unwanted effects [9,10]. In this scenario, the development
68 of novel therapeutic options represents a challenging issue. Valuable in this respect could be the
69 so-called "privileged structures", a number of versatile scaffolds able to interact with different
70 biological targets. Their appropriate functionalization or inclusion into more complex structures
71 provides a viable way to improve the biological potential and develop new bioactive compounds
72 [16]. Recently, we reported newly designed derivatives endowed with peculiar and selective
73 activity against *Candida* spp. and *S. aureus* [17,18]. In particular, the new compounds are
74 characterized by privileged structures-related scaffolds namely a chalcone core and a polycycle
75 adduct between anthracene and maleimide. The biological impact of naturally occurring chalcones,
76 largely widespread in the plant kingdom, is universally known, as they proved to be endowed with
77 a wide spectrum of biological effects, including antioxidant, antibacterial, antiprotozoal,
78 antimutagenic, antimitotic, antimetastatic, and anti-inflammatory [19]. This relevant therapeutic
79 potential is connected to the modulation of a wide range of biomolecular functions. Extensive
80 studies have been performed to elucidate the mechanism of action of this class of compounds,
81 which is principally connected to the *trans*- α,β -unsaturated carbonyl structural motif. This
82 Michael acceptor system can likely act as a nucleophile scavenger establishing covalent linkages
83 with the cysteine residues of several target proteins. This scaffold has been extensively exploited
84 in medicinal chemistry to design and synthesize libraries of compounds characterized by an
85 improved biological profile.

86 Besides, our research group has recently reconsidered the versatile and easily affordable
87 abovementioned polycycle adduct obtained by applying the one-step Diels-Alder cycloaddition.
88 Indeed, this structure can easily be modified by a suitable decoration of the anthracene derivative
89 and/or by the alkylation of the amide nitrogen with properly selected side chains. This ability has

90 been exploited in order to improve the activity and evaluate the structure-activity relationships,
91 starting from a prototype selected from an in-house library of compounds and showing a promising
92 antibacterial activity. The suggested mechanism could be related to the ability to affect the integrity
93 of the bacterial membrane, probably by means of the inhibition of enzymes involved in membrane
94 redox homeostasis. Notably, several studies demonstrate the versatility of this promising scaffold
95 in various therapeutic areas [20].

96 Given these observations, one of the previously discovered chalcone-based derivatives (compound
97 **1**, Figure 1) and a polycyclic anthracene-maleimide adduct (compound **2**, Figure 1) were
98 reconsidered in a new perspective by evaluating *in vitro* the efficacy of a combined treatment
99 against a mixed biofilm of *C. albicans* and *S. aureus*, and new experiments were herein designed.
100 Compound **1** is an antifungal agent with remarkable anti-virulence activity, able to hamper hyphae
101 and biofilm production, strongly related to *C. albicans* pathogenesis [17]. The presence of the small
102 and highly electronegative fluorine atom in the structure provide a peculiar chemical behaviour to
103 the molecule, by granting some favourable properties, among which enhanced metabolic stability,
104 selectivity, and efficacy in target binding. Compound **2** is a potent inhibitor of *S. aureus*, acting as
105 a membrane-disrupting agent, probably through the inhibition of enzymes involved in preserving
106 membrane redox homeostasis and energy production [18].

107 The present study was aimed to delve into the anti-biofilm properties of the two newly
108 identified agents in a mixed *C. albicans-S. aureus* biofilm; both quantitative and qualitative
109 analyses was carried out to measure the inhibitory potential of compounds **1** and **2** combined
110 treatment on the polymicrobial population, to define the individual activity of each agent on the
111 overall reduction of the biofilm matrix, and to investigate the impact of the treatment on biofilm
112 architecture.

113 **2. Materials and methods**

114 **2.1 Strains and growth conditions**

115 *In vitro* experiments were carried out with the *C. albicans* strain ATCC 10231 (American
116 Type Culture Collection) and with the clinical isolate MSSA 1 of *S. aureus*, previously
117 demonstrated as a slime producer [18]. *C. albicans* and MSSA 1 were routinely cultured in
118 Sabouraud dextrose agar and in 5% blood agar, respectively, at 37°C; Brain Heart Infusion broth
119 (BHI, Sigma-Aldrich) was used for liquid overnight growths while supplemented with 10% Fetal
120 Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich) for culturing biofilms; Mannitol Salt Agar plates (Biolife
121 Italia) and Chromogenic Candida Agar plates (Biolife Italia) were used for selective regrowth of
122 microbial species following the treatment of the polymicrobial biofilms.

123 **2.2 Antimicrobial agents**

124 The selected compounds (Fig. 1) were prepared as reported in previous papers [17,18].
125 Briefly, the chalcone-based derivative **1** was obtained by reacting the 5'-fluoro-2'-
126 hydroxyacetophenone and 3-fluorobenzaldehyde in EtOH and in the presence of aqueous solution
127 of KOH. On the other hand, compound **2** was prepared applying the Diels-Alder cycloaddition to
128 anthracen methanol and maleimide, followed by alkylation of the amide nitrogen with bromo-
129 octane in the presence of potassium *ter*-butoxide. Both these easily affordable synthetic routes
130 enable performing further structural modifications in order to improve the
131 pharmacological/toxicological profile of the molecules.

132 For *in vitro* experiments, the dry powder of the compounds were resuspended in
133 dimethylsulfoxide (DMSO) at 20 mM and used as stock solutions. Compounds were used in the
134 range 3.125-200 μ M in a preliminary set of experiments while the working concentrations of 53
135 μ M for compound **1** and 4 μ M for compound **2** were used in the combined treatment. These
136 concentrations correspond to the IC₅₀ values previously measured for *C. albicans* and *S. aureus*

137 [17,18]. A final concentration of 0.25% DMSO was used in all analyses and it did not interfere
138 neither with microbiological investigations nor with cellular assays.

139 **2.3 Cell viability and cytotoxicity assays**

140 Compounds were assayed for their cytotoxic effects on african green monkey kidney cells
141 (Vero ATCC CCL-81); both cell viability and lactate dehydrogenase enzyme (LDH) release were
142 evaluated on mammalian cells upon 48 h of treatment. Briefly, 24 h before experiments, cells were
143 seeded into 96-well plates at 10^4 cells/well, and grown in regular culture medium (Eagle's Minimal
144 Essential Medium, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL
145 streptomycin), at 37°C and 5% CO₂. Following washes with phosphate-buffered saline (PBS), cell
146 monolayer was incubated with a renewal complete medium supplemented with either derivative **1**
147 at 53 μ M or compound **2** at 4 μ M, or both. After 48 h of incubation, culture medium was collected
148 from each well, the monolayer was washed with PBS, and 100 μ L of fresh medium containing 10
149 μ L of CCK-8 solution were added (CCK-8, Cell Counting Kit-8, Dojindo Molecular
150 Technologies). The OD values at 450/630 nm were measured after 2 h of incubation and data were
151 expressed as percentage values of cell viability relative to the untreated controls. In parallel, the
152 collected cell-free supernatants were assayed for LDH released through damaged plasma
153 membranes by adding a volume of the reconstituted working solution (Cytotoxicity LDH Assay
154 kit-WST, Dojindo Molecular Technologies). After 30 min of incubation at room temperature in the
155 dark, the stop solution was added and OD at 490 nm measured. Data were expressed as percentage
156 values relative to both the 100% lysis controls, included in the test, and untreated controls.

157 **2.4 Planktonic antimicrobial assay**

158 The chalcone-based derivative **1** and the polycyclic anthracene-maleimide compound **2**
159 were assayed on *C. albicans* and *S. aureus* planktonic cells by a standardized 96-well plate method
160 [17,18], with slight modifications. Briefly, each microbial suspension, prepared in PBS at 10^6

161 CFU/mL, was incubated with serial 2-fold dilutions of the compound **1** or compound **2** (3.125-200
162 μM), in a final volume of 200 μL /well. Both strains were assayed in BHI medium. Following 24 h
163 at 37°C, OD values at 630 nm were measured, and IC_{50} values were interpolated on the generated
164 dose-response curves.

165 **2.5 Biofilm antimicrobial assay**

166 The biofilms were developed on polystyrene 24-well plate by layering 300 μL of an
167 overnight culture of *S. aureus* or *C. albicans* at a density of 10^5 CFU/mL and adding the same of
168 BHI medium for mono-species biofilm, while the dual-species biofilm was developed by
169 inoculating 300 μL of each culture to the well, reaching a total volume of 600 μL . Plate was
170 incubated at 37°C for 90 min to promote bacterial and fungal adhesion, thereafter wells were slowly
171 rinsed with PBS to remove non-attached cells. Then, 600 μL of BHI medium supplemented with
172 FBS containing the combination of both antimicrobial agents (**1** at 53 μM and **2** at 4 μM) were
173 added to each well and plate was incubated for 24 h at 37°C in static condition to induce biofilm
174 formation. The biomass of the biofilms was assessed by a standardized crystal violet (CV) staining.
175 Briefly, wells were extensively washed in PBS to remove planktonic cells, and the plate was
176 incubated for 1 h at 60°C. CV solution (0.1% in water) was added to each well and incubated for
177 15 min at room temperature. The unbound CV was removed by repeated washes with water; finally,
178 the bound CV was resolubilized in 95% ethanol; following 30 min of incubation at room
179 temperature, CV solutions were recovered from the different wells and the OD was read at 550 nm.
180 The efficacy of the compounds to inhibit biofilm formation was expressed as percentage values
181 relative to the untreated growth controls.

182 The anti-biofilm activity of the combined treatment was also evaluated by adding the
183 antimicrobial agents (**1** at 53 μM and **2** at 4 μM) to biofilms after 24h of development. Briefly,

184 mono- and dual-species biofilms were developed on polystyrene 24-well plate as described above;
185 after the adhesion phase and biofilm growth for 24 h, compounds were added to the wells and the
186 plate was incubated at 37°C for an additional 24 h. The activity of the agents on the mono- and
187 dual-species biofilms was quantitatively estimated by CV staining as previously described, and
188 results reported as percentage values compared to controls.

189 **2.6 CFU assay**

190 Polymicrobial biofilms were developed on a polystyrene 24-well plate as previously
191 described, in presence of the agents at their IC₅₀ values, and without as untreated control. Following
192 24 h of incubation, biofilms were extensively washed with PBS and treated with 1 mL of 0.1%
193 dithiothreitol (DTT) (Sputasol, Oxoid) for 10 min at 37°C to dislodge microbial cells from the
194 matrix [21]. Detached cells were then recovered and plated for CFU count. In particular, serial
195 dilutions of the suspensions were made in PBS and plated on Mannitol Salt Agar (for *S. aureus*
196 enumeration) and Chromogenic Candida Agar (for *C. albicans* enumeration). After 24-48 h at
197 37°C, plates were imaged and colonies were digitally counted using the VersaDoc Image System
198 and the colony counting software (BioRad). The same experimental setting was applied on a
199 preformed 24-h polymicrobial biofilm.

200 **2.7 Analysis of the interaction**

201 The nature of the interaction between the chalcone-based derivative **1** and the antibacterial
202 agent **2** in a polymicrobial environment was analyzed by a simplified checkerboard synergy testing
203 assay. Briefly, microbial cells were allowed to attach to the polystyrene 24-well plate as previously
204 described, thereafter different concentrations of the compounds were added and after 24 h of
205 incubation, biomasses were evaluated by CV staining. In particular, a 3×3 matrix of concentrations
206 (IC₅₀ × 2, IC₅₀, no compound) was applied to polymicrobial biofilms. The same methodology was

207 used to treat a preformed 24-h biofilm For each experimental condition, the OD at 550 nm was
208 measured and results were reported as percentage values compared to untreated controls. The
209 interaction of the compounds was defined as synergy when the percentage values obtained on
210 biofilms treated with both compounds resulted higher than the sum of the individual effects of each
211 compound on the mixed biofilm.

212 **2.8 Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) Analysis**

213 For microscopy analysis, polymicrobial biofilms were formed as previously described over
214 a period of 24 h in permanox chamber slides (Thermo Scientific Nunc Chamber Slide System).
215 Biofilms were produced in BHI/FBS 10% containing both antimicrobial agents at their IC₅₀ values,
216 and without as untreated control. After 24 h of growth, biofilms were extensively washed in PBS,
217 dried, and fixed on the plastic support by incubation with 100% methanol for 2 min. Then,
218 fluorescent markers were added directly to the chamber slides: SYTO9 (Molecular Probes) a
219 nucleic acid-binding stain labeling both bacterial and fungal cells [22], and Calcofluor white
220 (Calcofluor White Reagent Dropper, BD), a fluorescent blue dye that binds β -1,3 and β -1,4
221 polysaccharides in the fungal cell walls. The stained biofilms were washed twice with PBS before
222 imaging.

223 Confocal fluorescence imaging was performed on a Nikon A1 system with an inverted Ti-
224 E microscope (Nikon Company). The confocal fluorescence microscope Nikon A1 is equipped
225 with a Picoquant CW/pulsed diode laser and an argon ion CW laser, for excitation at 405 and 488
226 nm, respectively. Images were collected using a Nikon Plan Apo VC 60 \times oil immersion objective
227 with NA 1.40. Filters were set to register the fluorescence of SYTO9 or Calcofluor white in the
228 450/50 nm and 525/50 nm, ranges. DIC images completed the imaging part. Where useful the LUT
229 (Look-up-table) intensity scale is visualized in the confocal fluorescence images.

230 **2.9 Statistical analysis**

231 For biofilm investigations, 3 wells for each treatment regimen were assayed and at least
232 two independent experiments were performed. For cell viability and cytotoxicity assays, 3 wells
233 for each condition were tested and three independent experiments were carried out. Percentage
234 values were relative to the untreated controls. Differences between samples were determined by
235 unpaired student's t test, or one-way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison Test
236 using the GraphPad Prism Software, version 6.0 (GraphPad Software). Statistical significance was
237 set at p values < 0.05 , indicated by asterisks in figures.

238 **3. Results and discussion**

239 **3.1 Polymicrobial biofilms**

240 In the present study, all experiments aimed to quantitatively evaluate biofilm biomasses
241 were carried out on polystyrene 24-well plates instead of the conventional 96-well plates,
242 harboring microbial species at 10^5 CFU/mL and culturing cells in BHI broth supplemented with
243 10% FBS for 24-48 h. This biofilm model was selected in order to allow cross-kingdom biofilm
244 development without removal of cells during the culture medium exchange, thus to correctly
245 measure their biomass after treatments. In addition, FBS was added to the culture medium to mimic
246 the human physiological environment.

247 A preliminary set of experiments indicated that co-incubation of *C. albicans* and *S. aureus*
248 allowed for the development of a higher amount of biofilm biomass than the sum of each mono-
249 species biofilm (Supplementary Fig. 1). The synergistic increase of the biomass is possibly related
250 to the culturing medium used herein; indeed, BHI broth supplemented with FBS stimulates yeast-
251 to-hyphae morphogenesis of *C. albicans*, this in turn promotes *S. aureus* biofilm production, as
252 germ tubes and hyphal forms act as scaffold for bacterial adhesion and aggregation. It has been
253 reported that *S. aureus* directly adheres to the Als3 protein of *C. albicans* to form a complex

254 structure with increased mutually beneficial interactions, enhanced antimicrobial tolerance and
255 protection against host defences [4,10,23,24].

256 In the present study, the physical interaction between *C. albicans* and *S. aureus* in the mixed
257 biofilm was demonstrated by CLSM analysis, where images showed adherence to and clumping of
258 staphylococci around *C. albicans* hyphae, forming thick biofilm aggregates (Fig. 2).

259 **3.2 Activity and selectivity of the compounds**

260 The antimicrobial susceptibility of the newly identified antimicrobial agents was assessed
261 both on planktonic cells and biofilms of *C. albicans* and *S. aureus* in order to validate their
262 inhibitory properties, and to ascertain their selectivity in the present experimental setting. The IC₅₀
263 values resulted 53 µM for compound **1** against *C. albicans* and 4 µM for compound **2** against *S.*
264 *aureus* confirming the previously obtained results, thus the activity of the antimicrobials in the
265 herein used medium (BHI instead of RPMI-1640 medium for *C. albicans* and Mueller Hinton broth
266 for *S. aureus*). Neither the antifungal compound nor the antibacterial agent interfered with the
267 growth of *S. aureus* and *C. albicans*, respectively (Supplementary Fig. 2). In addition, no cross-
268 activity was measured on the monomicrobial biofilms when tested with compounds at their IC₅₀
269 values (Supplementary Fig. 3), thus proving the specific activity of both antimicrobials.

270 **3.3 Cell viability and cytotoxicity**

271 Having assessed the activity and selectivity of the compounds at their IC₅₀ values, they
272 were used in mammalian cell study. The antimicrobial agents were used as single agent at 53 µM
273 for compound **1** and 4 µM for compound **2**, and in a combined treatment for 48 h. Two different
274 assays were carried out to measure both cell viability and cell membrane damage. As single
275 treatment, compounds did not display any toxicity, while the combined treatment exerted a certain
276 degree of cytotoxicity; in particular, at tested concentrations, cell viability was reduced of 39.4%
277 compared to the positive controls but LDH activity, a marker of cell death, increased to the 22.8%

278 (Fig. 3A and B). Percentage values lower than 25% are acceptable, thus indicating a good safety
279 profile [25].

280 **3.4 Combined treatment of mono-species biofilm**

281 In previous studies, the anti-biofilm activity of each compound was established against a single
282 species biofilm and in different experimental settings, including culturing conditions (RPMI-1640
283 medium for *C. albicans* and Mueller Hinton broth for *S. aureus*), and methodologies (CV staining
284 and viability assay) [17,18]. Herein, newly investigations were therefore performed as BHI broth,
285 a nutrient-rich media, and FBS were used to produce the biofilms, possibly modifying the efficacy
286 of the antimicrobial agents. In addition, CV assay was selected as method of choice for biofilm
287 assessment, as it measures the amount of the polymeric matrix instead of the metabolic activity of
288 cells. It is known that fungal and bacterial cells account only for 5-35% of biofilm volume, and the
289 remaining is extracellular matrix, thus assays measuring the viability of biofilm cells may not
290 accurately define the properties of compounds in terms of biofilm inhibition and eradication, and
291 lack in reliability at lower numbers of cells [26].

292 The efficacy of the combined treatment was determined on mono-species biofilms of *C. albicans*
293 and *S. aureus* by adding both agents at their IC₅₀ values during biofilm development. Compounds
294 significantly inhibited the biofilm formation compared to the untreated controls with percentage
295 values of $58.5 \pm 2.1\%$ for *C. albicans* and $60.2 \pm 9.1\%$ for *S. aureus* (Fig 4A). In addition, they
296 displayed a moderate activity towards the pre-form mono-species biofilms reducing the biomasses
297 by the $34.5 \pm 1.8\%$ and $26.7 \pm 0.9\%$ for *C. albicans* and *S. aureus*, respectively (Fig. 4B).

298 **3.5 Combined treatment of *C.albicans-S.aureus* biofilm**

299 Having assessed the activity on the mono-species biofilms, the efficacy of compounds **1** and **2** was
300 evaluated on the mixed *C. albicans-S. aureus* biofilm. Derivative **1** at 53 μM and compound **2** at 4
301 μM were added to BHI broth supplemented with 10% of FBS and the biomasses of the biofilms

302 were quantitatively measured following 24 h of incubation. The combined use of these compounds
303 significantly inhibited the development of the mixed bacterial-fungal biofilm compared to the
304 untreated control with a percentage value of 62.4 ± 9.3 %. The nature of the interaction between
305 the two agents was analyzed by measuring the biomasses of the polymicrobial biofilms treated with
306 different antimicrobial concentrations. A 3×3 matrix of concentrations was applied, and the
307 percentage values of biofilm inhibition obtained in each experimental condition, compared to the
308 untreated control, were reported in Fig. 5A. In this set of experiments, the inhibitory activity of the
309 agents at their IC_{50} values proved to be more than 2-fold the sum of the individual effect of the
310 compounds (11.1% and 13.3%). Thus, the chalcone-based derivative **1** and the antibacterial agent
311 **2** displayed a synergistic antimicrobial activity, at a non cytotoxic concentration. The same
312 experimental approach was used to evaluate the activities of the combined treatment on pre-form
313 polymicrobial biofilms (Fig. 5B). The overall biomass reduction of 64.4 ± 6.2 % was higher than
314 the sum of the single activity (27.9% and 28.5%), however, the synergy between the compounds
315 was less marked compared to their activity on the biofilm development.

316 **3.6 CFU assay**

317 To delve into the anti-biofilm properties of the compounds, CFU counts on selective agar plates
318 were carried out on cells detached from the *C. albicans*-*S. aureus* biofilm community. Treated and
319 untreated biofilms were disrupted by adding the DTT reducing agent, and viable cells were plated
320 on Mannitol Salt Agar and Chromogenic Candida Agar for regrowth. The combined use of the
321 antifungal compound **1** and antibacterial agent **2** significantly reduced the viability of microbial
322 species compared to untreated controls (Fig. 6). The treatment was more effective in reducing *C.*
323 *albicans* from the polymicrobial biofilm compared to *S. aureus* reduction. Indeed, both species
324 within the polybiofilm were susceptible to the killing by the agents, but CFU measurements

325 indicated a 1.9 Log-unit reduction for *C. albicans* and 1.1 Log-unit reduction for *S. aureus*. The
326 same experimental setting was applied to evaluate the effectiveness of the compounds after biofilm
327 development. CFU counts allowed measuring a higher killing activity of the combined treatment
328 on *C. albicans* compared to *S. aureus* (1.8 and 1.3 Log-unit reduction for *C. albicans* and *S. aureus*,
329 respectively). In the present experimental conditions, the combined use of the chalcone-based
330 derivative **1** and antibacterial agent **2** mainly affected fungal viability compared to bacterial
331 viability suggesting that *S. aureus* within the biofilm was more resistant to the killing. A possible
332 explanation is that *S. aureus* becoming encased in the biofilm matrix, during the polymicrobial
333 growth, enhanced tolerance to the polycyclic anthracene-maleimide compound **2**. This finding has
334 been previously reported for commonly used antibiotic drugs [27].

335 **3.7 Confocal laser scanning microscopy**

336 Confocal laser scanning fluorescence microscopy was performed on dual-species biofilms
337 treated with the antimicrobials, and untreated as control. Two markers were used to stain the
338 biofilms: SYTO9, allowing the detection of nucleic acids and Calcofluor white, targeting the
339 polysaccharides within the fungal cell wall. As expected Calcofluor white colors the walls of the
340 fungal cells and the extended hyphae of *C. albicans*. SYTO9 colored the nucleic acid material of
341 both species. Noticeably the treatment with agents **1** and **2** caused a strong reduction in fluorescence
342 intensity of both fluorophores (Supplementary Fig. 4). In the case of *C. albicans* the reduced
343 fluorescence intensity of Calcofluor white may indicate the derivative **1** activity in terms of
344 decreased polysaccharide synthesis, or chitin and β -1,3 glucan degradation. Indeed, the proposed
345 mechanism of action of chalcones involves the inhibition of both 1,3 β -glucan synthase and chitin
346 synthase [28]. For both species the reduced fluorescence intensity of SYTO9 is likely indicating
347 reduced amounts of nucleic acids possibly due to inhibition or degradation of DNA-RNA and leaks
348 in the cell membranes. Indeed, we previously demonstrated that the polycyclic anthracene-

349 maleimide compound **2** has membrane-disrupting activity on *S. aureus* cells, leading to nucleic
350 acids loss through the damaged cytoplasmic membrane.

351 Importantly, CLSM images in Figures 7 and 8 clearly revealed that the combined treatment
352 led to a considerable reduction of biomass and cell aggregates together with a significant decrease
353 in the amount of hyphae forms of *C. albicans*. The number of *C. albicans* cells was not significantly
354 decreasing but yeast-hyphal transition was remarkably impaired in line with the proposed activity
355 of the chalcone-derivative **1**. Images revealed also a reduction in the number *S. aureus* bacteria.

356 **4. Conclusions**

357 Taken together, the results herein obtained indicate as the combination therapy comprising
358 an antifungal agent and an antibacterial agent could represent a very useful strategy for achieving
359 prevention and treatment of a polymicrobial biofilm when the compounds act in synergy. This
360 strategy embodies an interesting principle to keep on exploring new combinations. A campaign has
361 been undertaken on this prototype combination aimed at optimizing its antimicrobial profile with
362 specific attention on selecting a more effective antifungal agent. A further approach to achieve this
363 goal could be the design and synthesis of hybrid molecules, as hybridization is regarded as a
364 valuable strategy to obtain drug candidates endowed with a multipotent profile. Thus, incorporating
365 the two studied molecules or their pharmacophore units into a single chemical entity offers
366 promises to obtain potent antibacterial and antifungal agents endowed with enhanced anti-biofilm
367 properties. In a medicinal chemistry perspective, this may represent a very challenging task,
368 requiring the hybrid molecule the preservation of a balanced good activity on really different
369 microorganisms.

370 **Appendix A. Supplementary data**

371 **References**

- 372 1. Hirota, K.; Yumoto, H.; Sapaar, B.; Matsuo, T.; Ichikawa, T.; Miyake, Y. Pathogenic Factors in Candida
373 Biofilm-related Infectious Diseases. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *10*.
- 374 2. She, P.; Liu, Y.; Wang, Y.; Tan, F.; Luo, Z.; Wu, Y. Antibiofilm Efficacy of the Gold Compound Auranofin
375 on Dual Species Biofilms of *Staphylococcus Aureus* and *Candida* Sp. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 88–
376 101, doi:10.1111/jam.14443.
- 377 3. Vestby, L.K.; Grønseth, T.; Simm, R.; Nesse, L.L. Bacterial Biofilm and Its Role in the Pathogenesis of
378 Disease. *Antibiotics* **2020**, *9*, 59, doi:10.3390/antibiotics9020059.
- 379 4. Harriott, M.M.; Noverr, M.C. Importance of Candida–Bacterial Polymicrobial Biofilms in Disease.
380 *Trends Microbiol.* **2011**, *19*, 557–563, doi:10.1016/j.tim.2011.07.004.
- 381 5. Bernard, C.; Girardot, M.; Imbert, C. Candida Albicans Interaction with Gram-Positive Bacteria within
382 Interkingdom Biofilms. *J. Mycol. Médicale* **2020**, *30*, 100909, doi:10.1016/j.mycmed.2019.100909.
- 383 6. Ibberson, C.B.; Whiteley, M. The Social Life of Microbes in Chronic Infection. *Curr. Opin. Microbiol.*
384 **2020**, *53*, 44–50, doi:10.1016/j.mib.2020.02.003.
- 385 7. Kart, D.; Yabanoglu Ciftci, S.; Nemitlu, E. Altered Metabolomic Profile of Dual-Species Biofilm:
386 Interactions between *Proteus Mirabilis* and *Candida Albicans*. *Microbiol. Res.* **2020**, *230*, 126346,
387 doi:10.1016/j.micres.2019.126346.
- 388 8. Carolus, H.; Van Dyck, K.; Van Dijk, P. Candida Albicans and Staphylococcus Species: A Threatening
389 Twosome. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 2162, doi:10.3389/fmicb.2019.02162.
- 390 9. Batoni, G.; Masetta, G.; Esin, S. Therapeutic Potential of Antimicrobial Peptides in Polymicrobial
391 Biofilm-Associated Infections. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 482, doi:10.3390/ijms22020482.
- 392 10. Rodrigues, M.E.; Gomes, F.; Rodrigues, C.F. Candida Spp./Bacteria Mixed Biofilms. *J. Fungi* **2019**, *6*, 5,
393 doi:10.3390/jof6010005.
- 394 11. Peters, B.M.; Ovchinnikova, E.S.; Krom, B.P.; Schlecht, L.M.; Zhou, H.; Hoyer, L.L.; Busscher, H.J.; van
395 der Mei, H.C.; Jabra-Rizk, M.A.; Shirtliff, M.E. Staphylococcus Aureus Adherence to Candida Albicans
396 Hyphae Is Mediated by the Hyphal Adhesin Als3p. *Microbiology* **2012**, *158*, 2975–2986,
397 doi:10.1099/mic.0.062109-0.
- 398 12. Haiko, J.; Saeedi, B.; Bagger, G.; Karpati, F.; Özenci, V. Coexistence of Candida Species and Bacteria in
399 Patients with Cystic Fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 1071–1077,
400 doi:10.1007/s10096-019-03493-3.
- 401 13. Bertesteanu, S.; Triaridis, S.; Stankovic, M.; Lazar, V.; Chifiriuc, M.C.; Vlad, M.; Grigore, R.
402 Polymicrobial Wound Infections: Pathophysiology and Current Therapeutic Approaches. *Int. J.*
403 *Pharm.* **2014**, *463*, 119–126, doi:10.1016/j.ijpharm.2013.12.012.
- 404 14. Donlan, R. Biofilms and Device-Associated Infections. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 277–281,
405 doi:10.3201/eid0702.010226.
- 406 15. Klotz, S.A.; Chasin, B.S.; Powell, B.; Gaur, N.K.; Lipke, P.N. Polymicrobial Bloodstream Infections
407 Involving Candida Species: Analysis of Patients and Review of the Literature. *Diagn. Microbiol. Infect.*
408 *Dis.* **2007**, *59*, 401–406, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.07.001.
- 409 16. Costantino, L.; Barlocco, D. Privileged Structures as Leads in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.*
410 **2006**, *13*, 65–85, doi:10.2174/092986706775197999.
- 411 17. Bonvicini, F.; Gentilomi, G.; Bressan, F.; Gobbi, S.; Rampa, A.; Bisi, A.; Belluti, F. Functionalization of
412 the Chalcone Scaffold for the Discovery of Novel Lead Compounds Targeting Fungal Infections.
413 *Molecules* **2019**, *24*, 372, doi:10.3390/molecules24020372.
- 414 18. Bonvicini, F.; Manet, I.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Rampa, A.; Gentilomi, G.A.; Bisi, A. Targeting the
415 Bacterial Membrane with a New Polycyclic Privileged Structure: A Powerful Tool To Face
416 *Staphylococcus Aureus* Infections. *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 1524–1534,
417 doi:10.1021/acsinfecdis.9b00072.
- 418 19. Zhuang, C.; Zhang, W.; Sheng, C.; Zhang, W.; Xing, C.; Miao, Z. Chalcone: A Privileged Structure in
419 Medicinal Chemistry. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 7762–7810, doi:10.1021/acs.chemrev.7b00020.

- 420 20. Bisi, A.; Mokhtar Mahmoud, A.; Allara, M.; Naldi, M.; Belluti, F.; Gobbi, S.; Ligresti, A.; Rampa, A.
421 Polycyclic Maleimide-Based Scaffold as New Privileged Structure for Navigating the Cannabinoid
422 System Opportunities. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 596–600,
423 doi:10.1021/acsmchemlett.8b00594.
- 424 21. Kirchhoff, L.; Weisner, A.-K.; Schrepffer, M.; Hain, A.; Scharmann, U.; Buer, J.; Rath, P.-M.;
425 Steinmann, J. Phenotypical Characteristics of the Black Yeast *Exophiala Dermatitis* Are Affected by
426 *Pseudomonas Aeruginosa* in an Artificial Sputum Medium Mimicking Cystic Fibrosis–Like Conditions.
427 *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 471, doi:10.3389/fmicb.2020.00471.
- 428 22. Jin, Y.; Zhang, T.; Samaranyake, Y.H.; Fang, H.H.P.; Yip, H.K.; Samaranyake, L.P. The Use of New
429 Probes and Stains for Improved Assessment of Cell Viability and Extracellular Polymeric Substances
430 in *Candida Albicans* Biofilms. *Mycopathologia* **2005**, *159*, 353–360, doi:10.1007/s11046-004-6987-7.
- 431 23. Peters, B.M.; Jabra-Rizk, M.A.; Scheper, M.A.; Leid, J.G.; Costerton, J.W.; Shirtliff, M.E. Microbial
432 Interactions and Differential Protein Expression in *Staphylococcus Aureus*–*Candida Albicans* Dual-
433 Species Biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, *59*, 493–503, doi:10.1111/j.1574-
434 695X.2010.00710.x.
- 435 24. Zago, C.E.; Silva, S.; Sanita, P.V.; Barbugli, P.A.; Dias, C.M.I.; Lordello, V.B.; Vergani, C.E. Dynamics of
436 Biofilm Formation and the Interaction between *Candida Albicans* and Methicillin-Susceptible (MSSA)
437 and -Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA). *PLOS ONE* **2015**, *15*.
- 438 25. Forte, L.; Torricelli, P.; Bonvicini, F.; Boanini, E.; Gentilomi, G.A.; Lusvardi, G.; Della Bella, E.; Fini, M.;
439 Vecchio Nepita, E.; Bigi, A. Biomimetic Fabrication of Antibacterial Calcium Phosphates Mediated by
440 Polydopamine. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, *178*, 43–53, doi:10.1016/j.jinorgbio.2017.10.004.
- 441 26. Cruz, C.D.; Shah, S.; Tammela, P. Defining Conditions for Biofilm Inhibition and Eradication Assays for
442 Gram-Positive Clinical Reference Strains. *BMC Microbiol.* **2018**, *18*, 173, doi:10.1186/s12866-018-
443 1321-6.
- 444 27. Harriott, M.M.; Noverr, M.C. *Candida Albicans* and *Staphylococcus Aureus* Form Polymicrobial
445 Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 3914–3922,
446 doi:10.1128/AAC.00657-09.
- 447 28. Mahapatra, D.K.; Bharti, S.K.; Asati, V. Chalcone Scaffolds as Anti-Infective Agents: Structural and
448 Molecular Target Perspectives. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *101*, 496–524,
449 doi:10.1016/j.ejmech.2015.06.052.
450

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Chemical structures of the chalcone-based derivative (compound **1**) and the polycyclic anthracene-maleimide adduct (compound **2**), previously discovered by us [17,18].

Figure 2. CLSM images (Top) and 3D reconstruction of Z-stack over 10 μm (Bottom) of mixed biofilm formations. Biofilms were stained with Calcofluor white and SYTO9 collecting fluorescence at 450 nm (blue images) and 525 nm (green) together with a merged image. These results demonstrate that *S. aureus* adheres to and forms biofilm aggregates around *C. albicans* hyphae.

Figure 3. Vero cells cultured for 48 h in presence of the chalcone-based derivative (**1**), the polycyclic anthracene-maleimide adduct (**2**), and both antimicrobials (**1+2**). The combined treatment significantly decreases cell viability (A) whereas LDH activity (B), index of cell death, remained acceptable (less than 25%) suggesting a cytostatic effect on cell proliferation rather than a cytotoxic activity. Percentage values are relative to the untreated cells.

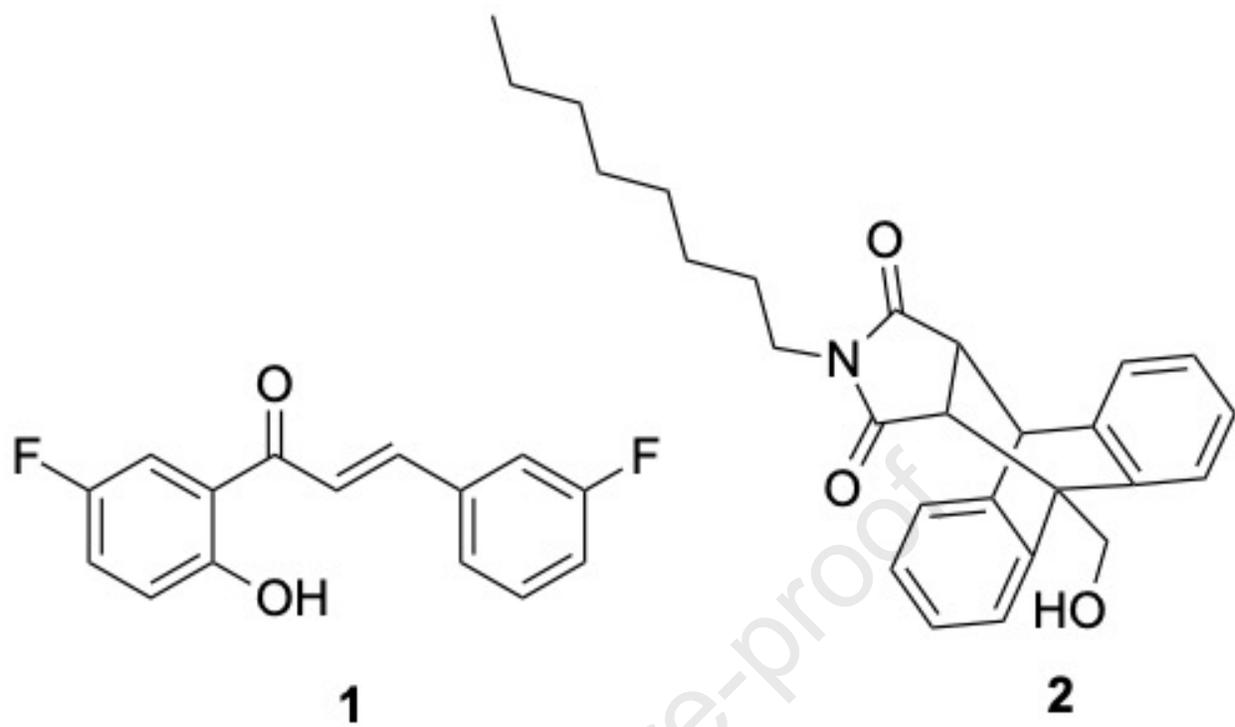
Figure 4. Anti-biofilm activity of the combined treatment on the mono-species biofilms. Compounds were used at their IC_{50} values and their inhibitory properties were evaluated on biofilm formation (A) and on a preformed 24-h biofilm (B).

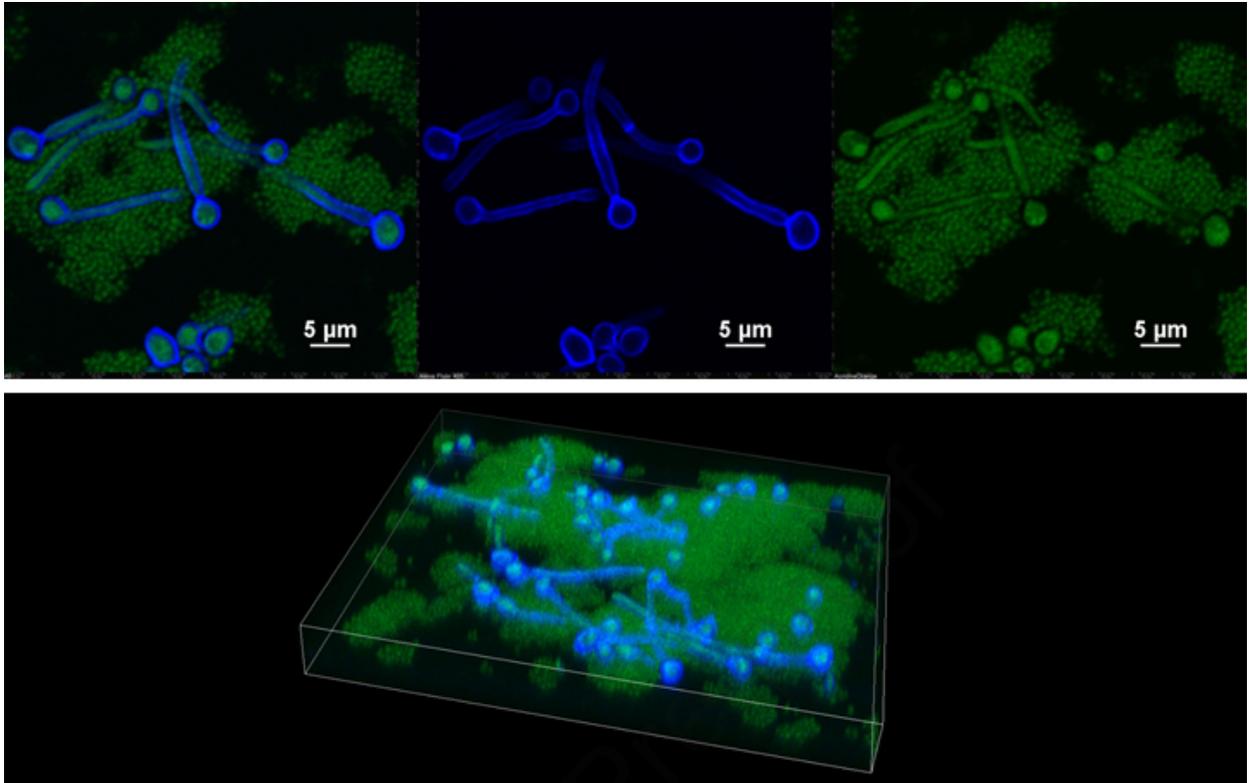
Figure 5. Percentage values of biofilm inhibition obtained by using different combination of compounds against the polymicrobial biofilm. Red arrows indicate the effect of the combined agents at their IC_{50} values. In both experimental conditions (A: biofilm formation; B: biofilm disruption), the overall inhibition is higher than the sum of the individual effect of the compounds.

Figure 6. CFU counts of each microbial species following the combined treatment of the polymicrobial biofilm. Cells were recovered from the biofilms and regrowth on selective agar plates. In both experimental conditions, biofilm inhibition and disruption of a pre-formed biofilm, *C. albicans* displays a higher susceptibility to the killing of the compounds.

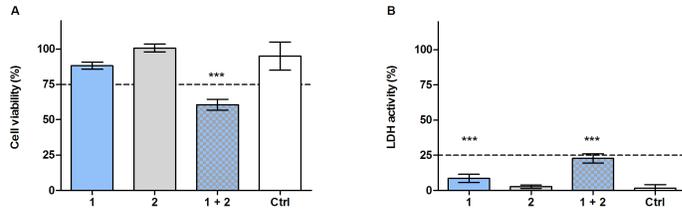
Figure 7. CLSM images of polymicrobial biofilms with Calcofluor white and SYTO9 collecting fluorescence at 450 nm (blue images) and 525 nm (green) together with a merged image. (Bottom) untreated biofilm, (Top) biofilm treated with the antimicrobials **1** and **2**. LUT intensity scale is displayed for each monochromatic image.

Figure 8. CLSM Z-stack images of polymicrobial biofilms colored with Calcofluor white and SYTO9 collecting fluorescence at 450 nm (blue images) and 525 nm (green). The yellow arrow in the central panel showing the XY plane for the untreated sample points to evident attachments of staphylococci to the fungal hyphae. The panels on the right and below represent the orthogonal views of the Z-stack displaying the XZ and YZ planes in correspondence of the orange lines.

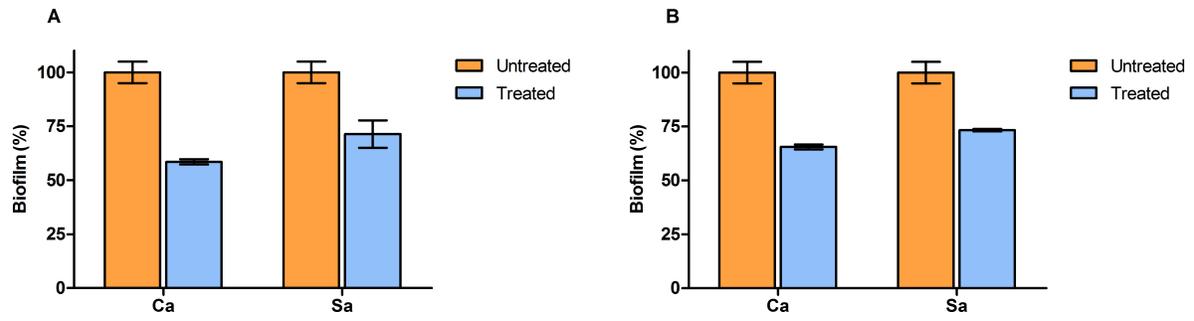




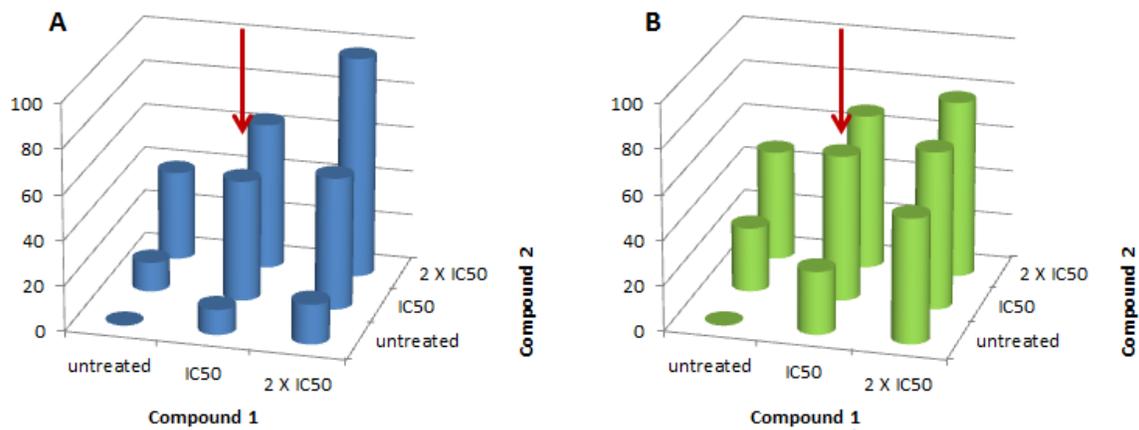
Journal Pre-proof



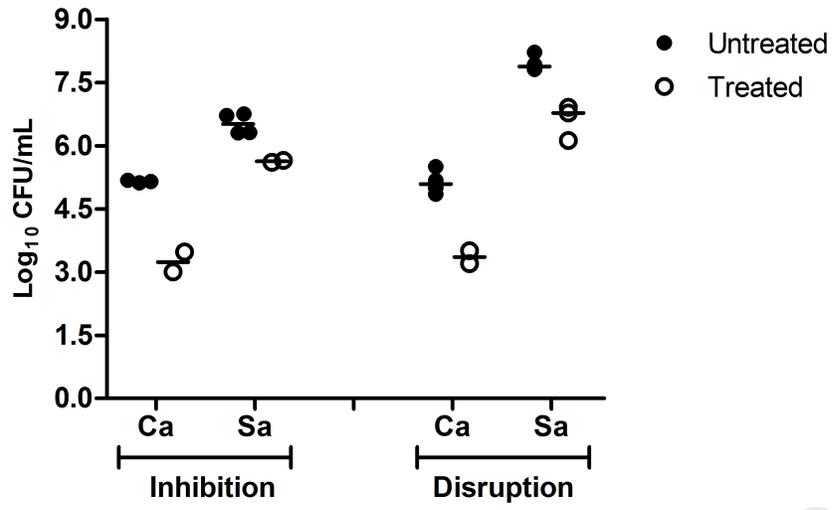
Journal Pre-proof

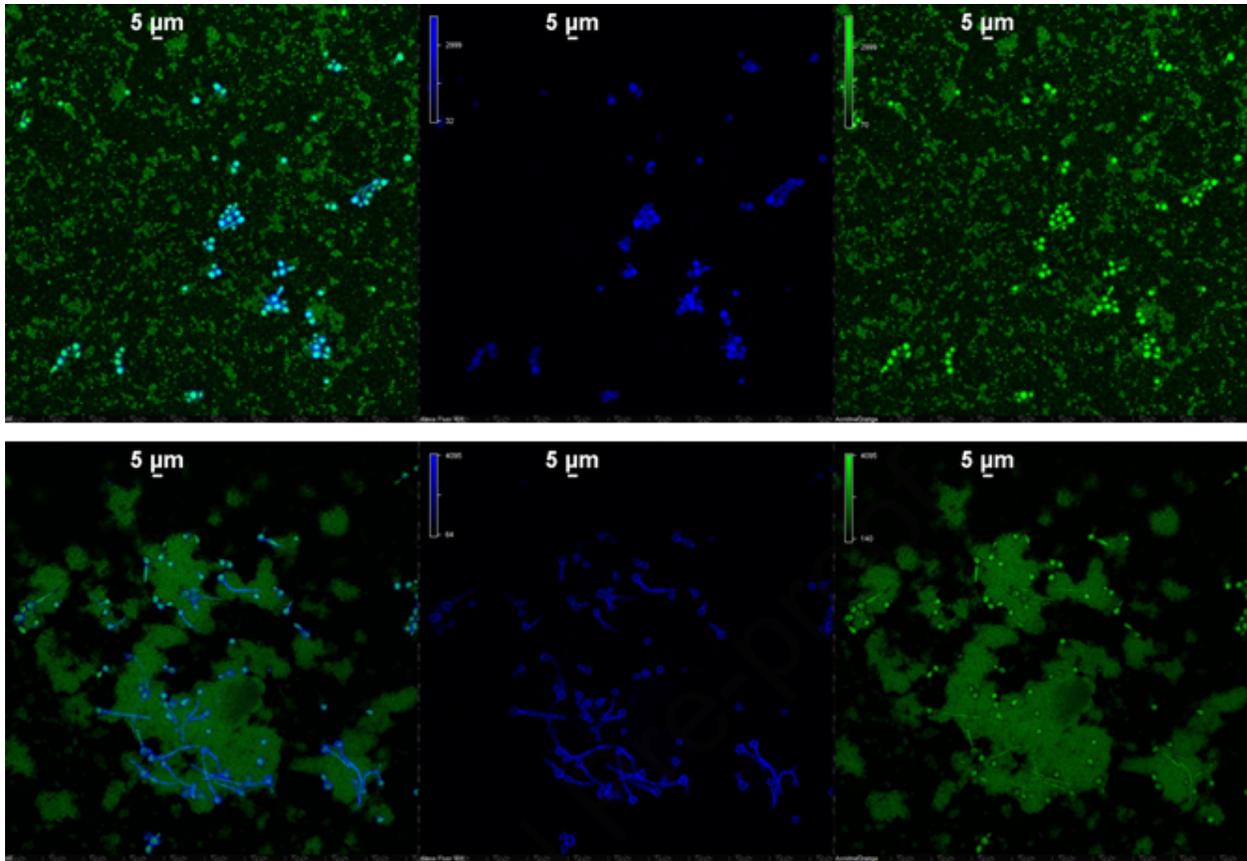


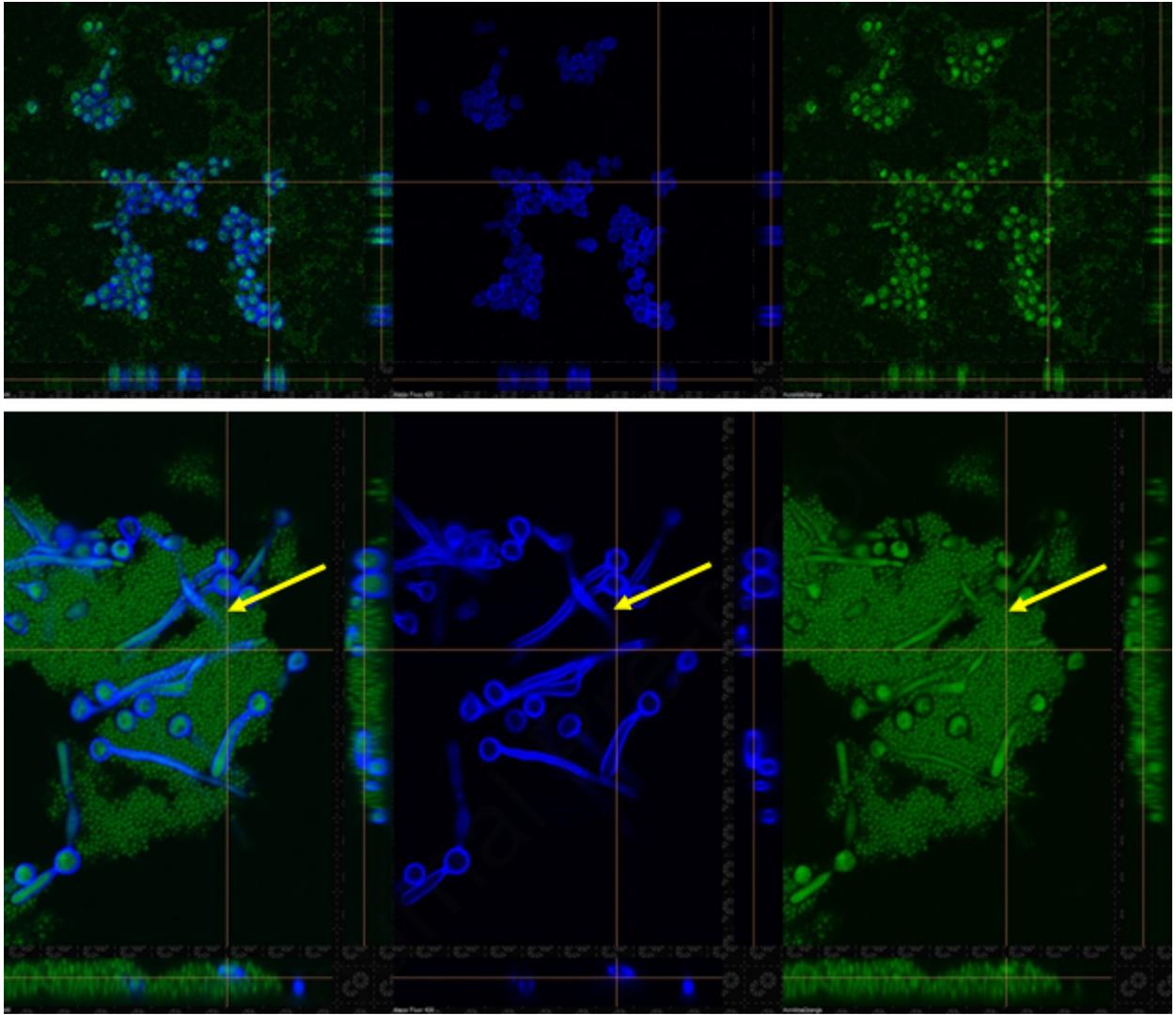
Journal Pre-proof



Journal Pre-proof







Résumé

Les biofilms mixtes sont à l'origine de nombreuses infections nosocomiales. Ils peuvent se former sur des tissus vivants comme ils se forment sur des dispositifs médicaux. Ils sont extrêmement difficiles à éradiquer dont la capacité potentielle de certains microorganismes. Des approches nouvelles et innovantes sont donc nécessaires pour assurer la réussite de la gestion des infections liées aux biofilms. Dans cette étude, un dérivé à base de chalcone et un dérivé à base d'anthracène polycyclique-maléimide, qui ont été précédemment déterminés comme inhibiteurs de la croissance de *C. albicans* et de *S. aureus*, respectivement, ont été reconsidérés dans une nouvelle perspective en évaluant l'efficacité d'un traitement combiné contre *C. albicans* et *S. aureus*, l'efficacité d'un traitement combiné contre un biofilm polymicrobien. Des analyses quantitatives et qualitatives ont été effectuées afin de déterminer leur potentiel inhibiteur sur la population polymicrobienne. Les résultats indiquent que ces antimicrobiens nouvellement identifiés sont efficaces pour réduire la biomasse du biofilm mixte de *C. albicans-S. aureus* et la viabilité des cellules fongiques-bactériennes au sein de la communauté polymicrobienne, de plus, la microscopie confocale à balayage laser démontre que le traitement des composés 1 et 2 modifie en profondeur l'architecture du biofilm à deux espèces.

Mots clé : Biofilm mixte , dispositifs médicaux , *Candida albicans* , *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Mixed biofilms are the cause of many nosocomial infections. They can form on living tissue as well as on medical devices. They are extremely difficult to eradicate due to the potential capacity of certain microorganisms.

Thus, new and innovative approaches are needed for successful management of biofilm-related infections. In this study, a chalcone-based derivative and a polycyclic anthracene-maleimide-based derivative, which were previously determined to inhibit the growth of *C. albicans* and *S. aureus*, respectively, were reconsidered from a new perspective by evaluating the efficacy of a combination treatment against *C. albicans* and *S. aureus*, the efficacy of a combination treatment against polymicrobial biofilm. Quantitative and qualitative analyses were performed to determine their inhibitory potential on the polymicrobial population. Results indicate that these newly identified antimicrobials are effective in reducing the biomass of the mixed *C. albicans-S. aureus* biofilm and the viability of fungal-bacterial cells within the polymicrobial community, furthermore, confocal laser scanning microscopy demonstrates that the treatment of compounds 1 and 2 profoundly alters the architecture of the two-species biofilm.

Keywords: mixed Biofilm , Medical devices , *candida albicans* , *staphylococcus aureus*.

المخلص

الأغشية الحيوية المختلطة هي سبب العديد من التهابات المستشفيات. يمكن أن تتشكل على الأنسجة الحية وكذلك على الأجهزة الطبية. من الصعب للغاية القضاء عليها بسبب القدرة المحتملة لبعض الكائنات الحية الدقيقة. وبالتالي، هناك حاجة إلى نهج جديدة ومبتكرة للإدارة الناجحة للإلتهابات ذات الصلة بيو فيلم. في هذه الدراسة، تم إعادة النظر في مشتق أساسه chalcone ومشتق قائم على anthracene-malimide متعدد الحلقات، والذي تم تحديده مسبقاً لمنع نمو *C. albicans* و *S. aureus*، على التوالي، من منظور جديد من خلال تقييم فعالية الجمع بين العلاج ضد بكتيريا المطثية البيضاء والمكورات العنقودية الذهبية، فعالية العلاج المركب ضد الغشاء الحيوي متعدد الميكروبات. تم إجراء التحليلات الكمية والنوعية لتحديد إمكاناتها المثبطة على السكان متعددي الميكروبات. تشير النتائج إلى أن مضادات الميكروبات التي تم تحديدها حديثاً فعالة في تقليل الكتلة الحيوية لمختلط *C. albicans-S. aureus* biofilm وصلاحية الخلايا البكتيرية الفطرية داخل المجتمع متعدد الميكروبات، علاوة على ذلك، يوضح الفحص المجهرى للمسح بالليزر متحد البؤر أن معالجة المركبين 1 و 2 يغيران بشكل كبير بنية الأغشية الحيوية من النوعين.

كلمات مفتاحية: الأغشية الحيوية المختلطة، أجهزة طبية، داء المبيضات، المكورات العنقودية الذهبية.