



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire : Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

Présenté par

Mlle BENAOUA Zohra

En vue de l'obtention du

diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Inhibition des biofilms mixtes formés *in vitro* par *Candida albicans* et des bactéries Gram négatives co-isolées de la cavité buccale d'enfants diabétiques de la ville de la Tlemcen par l'utilisation d'associations d'antimicrobiens et de la vitamine C

Soutenu le 28 juin 2025, devant le jury composé de :

Présidente	MEDJDOUB-BELAID Houria	MCA	Université de Tlemcen
Encadrante	BOUCHERIT-OTMANI Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Co-encadrante	GOURARI-BOUZOUINA Karima	Docteur	Université de Tlemcen
Examinatrice	HASSAINE-LAHFA Imane	MCB	Université de Tlemcen

Année universitaire 2024/2025

ملخص

تناولت هذه الدراسة تقييم التأثير المثبط للأمفوتيرييسين B والسيبروفلوكساسين، كل على حدة أو عند دمجها مع فيتامين C ، على الأغشية الحيوية المختلطة المشكلة داخل المختبر من طرف *Candida albicans1/Pantoea agglomerans* و *Candida albicans2/Enterobacter cloacae* المعزولة بشكل مشترك من التجويف الفموي لأطفال مصابين بداء السكري في مدينة تلمسان.

بلغت قيم التركيز المثبط الأدنى لفيتامين C في الحالة البلنكتونية 5 ملغ/مل تجاه الخمائر *C. albicans* و *P. agglomerans* و 2,5 ملغ/مل تجاه *E. cloacae*

أما تركيز التثبيط الأدنى الحيوي الثابت ($SCMI_{80}$) فقد ازداد مع نضج الغشاء الحيوي، ليصل إلى 512 ميكروغرام/مل بالنسبة للسيبروفلوكساسين و 128 بالنسبة للامفوتيرييسين B. قد أظهر فيتامين C فعالية تعتمد على الجرعة، رغم تداخله مع اختبار XTT .

كل السلالات المختبرة كانت قادرة على تشكيل أغشية حيوية، وتفاوتت القدرة على التشكيل حسب نوع الغشاء (أحادي أو مختلط) ومدة الحضارة. فعلاً، انتقلت التشاركات *C. albicans1/P. agglomerans* و *C. albicans2/E. cloacae* من الفئة +2 (ضعيفة التشكيل) إلى الفئة +4 بالنسبة ل *C. albicans2/E. cloacae* وإلى الفئة +5 بالنسبة ل *C. albicans1/P. agglomerans* (قوية التشكيل) بعد 24 و 48 ساعة على التوالي.

أظهر علاج الأغشية الحيوية المختلطة بالمركب الثلاثي amphotéricine B/Ciprofloxacin/Vitamine C أعلى فعالية، بنسبة تثبيط تفوق 96%. تؤكد هذه النتائج أهمية الجمع بين العلاجات في أهمية التدخل المبكر.

الكلمات المفتاحية: الأغشية الحيوية المختلطة، بكتيريا سلبية الغرام/ *C. albicans* ، تثبيط الأغشية الحيوية، التراكم العلاجي / فيتامين C ، تجويف الفم، الأطفال المصابون بالسكري

Résumé

Ce travail a porté sur l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine seules et associées à la vitamine C des biofilms mixtes formés *in vitro* par *Candida albicans*¹/*Pantoea agglomerans* et *Candida albicans*²/*Enterobacter cloacae* co-isolées de la cavité buccale d'enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.

Les concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C en mode planctoniques sont de 5mg/mL vis-à-vis des levures de *C. albicans* et de *P. agglomerans*, et de 2,5mg/mL vis-à-vis d'*E. cloacae*.

Les concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI₈₀) augmentent avec la maturation des biofilms formés par chaque espèce séparément, atteignant jusqu'à 512µg/mL pour la ciprofloxacine et 128µg/mL pour l'amphotéricine B. La vitamine C montre une efficacité dose-dépendante malgré son interférence avec le XTT.

Toutes les souches testées sont formatrices de biofilms. Ce potentiel dépend de la nature des biofilms, qu'ils soient mono ou multi-espèces ainsi que du temps d'incubation. En effet, pour les biofilms multi-espèces, les deux associations (*C. albicans*¹/*P. agglomerans* et *C. albicans*²/*E. cloacae*) passent de la catégorie +2 (faiblement formatrices de biofilms) à la catégorie+4 pour l'association *C. albicans*²/*E. cloacae* et à la catégorie+5 pour *C. albicans*¹/*P. agglomerans* (fortement formatrices de biofilms) pour des biofilms de 24 et 48 heures respectivement.

L'inhibition des biofilms multi-espèces s'est révélée la plus efficace lorsqu'ils sont traités par l'association amphotéricine B/Ciprofloxacine/Vitamine C avec des taux d'inhibition qui dépassent les 96%. Ces résultats soulignent l'intérêt des combinaisons thérapeutiques et l'importance d'un traitement précoce.

Mots clés : biofilms mixtes, *C. albicans*/bactéries Gram négatives, inhibition biofilms mixtes, associations antimicrobiens/vitamine C, cavité buccale, enfants diabétiques

Abstract

This study focused on evaluating the inhibitory effect of amphotericin B and ciprofloxacin, both individually and in combination with vitamin C, on mixed biofilms formed *in vitro* by *Candida albicans*1/*Pantoea agglomerans* and *Candida albicans*2/*Enterobacter cloacae* co-isolated from the oral cavity of diabetic children in the city of Tlemcen.

The planktonic minimal inhibitory concentrations (MICs) of vitamin C were 5mg/mL against *C. albicans* and *P. agglomerans*, and 2.5mg/mL against *E. cloacae*.

The sessile minimal inhibitory concentrations (SCMI₈₀) increased with the maturation of biofilms formed by each species separately, reaching up to 512µg/mL for ciprofloxacin and 128µg/mL for amphotericin B. Vitamin C showed a dose-dependent effectiveness despite its interference with the XTT assay.

All tested strains were biofilm-forming. This potential depended on the nature of the biofilms (mono- or multi-species) as well as the incubation time. Indeed, for multi-species biofilms, the two associations (*C. albicans*1/*P. agglomerans* and *C. albicans*2/*E. cloacae*) progressed from category +2 (weak biofilm producers) to category +4 for *C. albicans*2/*E. cloacae* and to category+5 for *C. albicans*1/*P. agglomerans* (strong biofilm producers) for 24- and 48-hour biofilms, respectively.

The inhibition of multi-species biofilms was most effective when treated with the combination of amphotericin B/Ciprofloxacin/Vitamin C, with inhibition rates exceeding 96%. These results highlight the importance of combination therapies and the need for early treatment.

Keywords: mixed biofilms, *C. albicans*/Gram-negative bacteria, mixed biofilm inhibition, antimicrobial combinations/vitamin, C oral cavity, diabetic children

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes	11
1. Matériel biologique	11
1.1. Microorganismes	11
1.2. Antimicrobiens	11
1.3. Antioxydant	11
2. Méthodes	12
2.1. Préparation des solutions mères des antimicrobiens	12
2.2. Préparation de la vitamine C	12
2.3. Préparation des sels de tétrazolium et de la ménadione	12
2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrice de la vitamine C vis-à-vis des souches de <i>Candida albicans</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Enterobacter cloacae</i>	13
2.5. Évaluation du potentiel des souches de <i>Candida albicans</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Enterobacter cloacae</i> à former des biofilms mono et multi-espèces	13
2.5.1. Formation des biofilms mono et multi-espèces	13
2.5.2. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms mono et multi-espèces formés <i>in vitro</i>	14
2.6. Inhibition <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces formés par <i>C. albicans</i> <i>P. agglomerans</i> et <i>E. cloacae</i>	15
2.6.1. Inhibition des biofilms mono-espèces	15
a. Phase d'adhésion initiale	16
b. Phase de prolifération	16
2.6.2. Inhibition des biofilms multi-espèces de <i>C. albicans</i> ¹ / <i>P. agglomerans</i> et <i>C.</i> <i>albicans</i> ² / <i>E. cloacae</i>	16
a. Phase d'adhésion initiale	17
b. Phase de prolifération	17
2.7. Etude statistique	17

Troisième partie : Résultats et discussion	18
1. Concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C vis-à-vis des cellules de <i>Candida albicans</i> , <i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Enterobacter cloacae</i>	19
2. Formation <i>in vitro</i> des biofilms mono et multi-espèces	20
2.1. Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> , de <i>P. agglomerans</i> et d' <i>E. cloacae</i>	20
2.2. Concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C vis-à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> , de <i>P. agglomerans</i> et d' <i>E. cloacae</i>	22
2.3. Activités métaboliques des biofilms mono et multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> , de <i>P. agglomerans</i> et <i>E. cloacae</i>	23
3. Inhibition des biofilms multi-espèces formés <i>in vitro</i> par <i>C. albicans</i> ¹ / <i>P. agglomerans</i> et <i>C. albicans</i> ² / <i>E. cloacae</i>	25
Quatrième partie : Conclusion générale	29
Cinquième partie : Références bibliographiques	32

Dédicaces

Louange à Allah, le Très Miséricordieux, le Très Clément, qui m'a accordé la patience, la force et l'opportunité d'accomplir ce travail.

Je dédie ce mémoire :

À mon cher père, qu'Allah lui accorde Sa miséricorde et lui ouvre les portes du Paradis. Son amour et ses conseils continuent de m'inspirer chaque jour.

À ma mère bien-aimée, pour ses sacrifices, ses prières et son amour inconditionnel.

À mon frère Ismail et à mes sœurs Sabine, Souhila et Dounia pour leur soutien moral, leur présence et leurs encouragements constants.

À mes camarades, avec qui j'ai partagé les efforts, les sourires et les réussites.

Que Dieu récompense chacun de vous pour tout ce que vous m'avez apporté.

Remerciements

Ce travail a été effectué dans le laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » de l'université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia, Professeure de biochimie au Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, pour avoir été une encadrante exceptionnelle tout au long de ce travail. Son soutien constant, ses encouragements bienveillants et la richesse de ses conseils ont été pour moi d'une grande valeur à chaque étape de cette étude. Sa passion pour la recherche, son dévouement rigoureux et sa disponibilité sans faille ont été une véritable source d'inspiration tout au long de mon parcours. Je lui suis profondément reconnaissante pour sa patience, sa pédagogie, ainsi que pour ses commentaires pertinents et ses orientations éclairées, qui ont largement contribué à la qualité et à la cohérence de ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement Madame GOURARI-BOUZOUINA Karima, docteur en biochimie, pour son implication précieuse tout au long de ce travail. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité, son écoute bienveillante, sans faille et son soutien moral m'ont beaucoup apporté tout au long de la préparation de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mme MEDJDOUB-BELAID Houria maître de conférences Classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de ma soutenance, et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail.

Je suis très honorée que Mme HASSAINE-LAHFA Imane, maître de conférences Classe B au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen a accepté d'examiner ce travail. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à ce mémoire.

Merci à tous les doctorants, les techniciens et les membres du laboratoire avec qui j'ai partagé mon parcours au sein du laboratoire. Merci pour votre soutien indéfectible, votre amitié, et pour tous les moments agréables que nous avons vécus ensemble.

Liste des figures

Figure N°1 : Les cinq compartiments du biofilm (Characklis et Marshall, 1990)	3
Figure N°2 : Processus de transport des microorganismes vers le support (Saur, 2014)	3
Figure N°3 : Cycle de formation d'un biofilm polymicrobien (Créer avec Figma.com)	4
Figure N°4 : Différents types d'interactions entre <i>C. albicans</i> et les bactéries (Lohse et al., 2017)..	7
Figure N°5 : Structure moléculaire de l'acide ascorbique ou la vitamine C (Brewer, 2011)	11
Figure N°6 : Concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C vis-à-vis de <i>C. albicans</i> 1, <i>C. albicans</i> 2, <i>P. agglomerans</i> et <i>E. cloacae</i>	19
Figure N°7 : Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine vis- à-vis des cellules sessiles de <i>C. albicans</i> , <i>P. agglomerans</i> et <i>E. cloacae</i>	21
Figure N°8 : Activités métaboliques des biofilms mono et multi-espèces obtenues par réduction du XTT après 24 et 48 heures d'incubation à 37°C	24
Figure N°9 : Inhibition des biofilms multi-espèces de <i>C. albicans</i> 1/ <i>P. agglomerans</i> et <i>C.</i> <i>albicans</i> 2/ <i>E. cloacae</i> par l'amphotéricine B, la ciprofloxacine et la vitamine C seules et associées	26

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine	11
---	----

Liste des abréviations

AmB : Amphotéricine B

Cipro : Ciprofloxacine

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMIs : Concentrations Minimales Inhibitrices

SCMI : Concentrations Minimales Inhibitrices sessiles

DMSO : Diméthylsulfoxyde

PBS : Solution saline tampon phosphate

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute Medium*

TSB: *Tryptic Soy Broth*

BHIB: *Brain Heart Infusion Broth*

DO : Densité optique

XTT : (2,3-Bis-(2-méthoxy-4-Nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide)

Première partie

Synthèse bibliographique

Dans leurs habitats naturels, les microorganismes se développent selon deux modes de vie : un mode planctonique, libre où les cellules isolées et indépendantes se déplacent dans un milieu liquide, et un mode en biofilm avec des cellules sessiles ou agrégées. Ce dernier étant souvent privilégié. Le choix du mode de vie en biofilm est une stratégie de survie pour les microorganismes pathogènes car il leur permet d'échapper au stress, à la phagocytose, à la restriction en nutriments et aux agents antimicrobiens conventionnels **(Olsen, 2015)**.

Par définition, les biofilms sont des communautés microbiennes dynamiques structurées, fixées à une surface biotique ou abiotique et encastrées dans une matrice exopolymérique autoproduite, avec un arrangement spatial optimal qui facilite l'apport des nutriments et l'élimination des déchets **[(Filloux et Vallet, 2003) ; (Jørgensen et al., 2015)]**.

La matrice exopolymérique est constituée majoritairement de polysaccharides (alginates), de protéines, de lipides, d'ADN extracellulaire et de canaux remplis d'eau qui forment un réseau de circulation permettant, d'une part, le passage de l'oxygène et les nutriments et d'autre part, l'évacuation des déchets **(Jefferson, 2004)**.

Elle représente également une barrière physique limitant l'accès des antimicrobiens au sein du biofilm, ce qui leur confère une résistance accrue aux différents traitements. En effet, les microorganismes sessiles peuvent tolérer des concentrations en antimicrobiens plus élevées que leurs homologues planctoniques (10 à 1000 fois supérieure) **[(Jefferson, 2004) ; (Høiby et al., 2010)]**.

De plus, l'activité de certains antibiotiques, peut être affectée par le gradient de nutriments et d'oxygène au sein du biofilm **(Stewart et Costerton, 2001)**.

Les biofilms sont structurés en cinq compartiments interconnectés, le support, le biofilm basal, le biofilm de surface, la phase liquide dans laquelle il est immergé, ainsi que la phase gazeuse **(Characklis et Marshall, 1990)**. **(Figure N°1)**

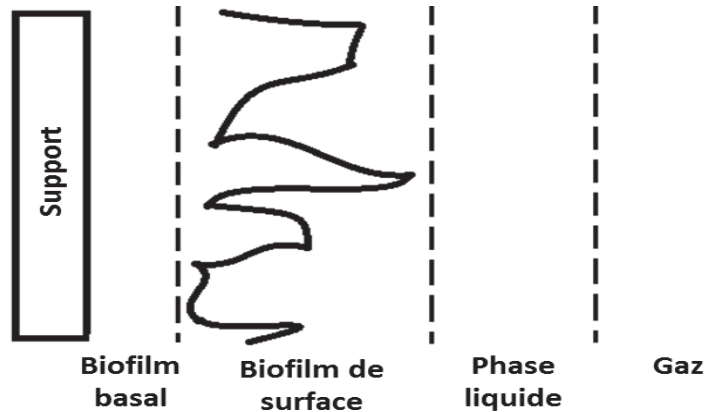


Figure N°1 : Les cinq compartiments d'un biofilm (Characklis et Marshall, 1990)

D'un point de vue physico-chimique, le développement des biofilms passe par cinq phases bien distinctes.

La première phase correspond à la formation quasi-instantané d'un film conditionnant sur lequel les glycoprotéines et les polysaccharides vont s'adsorber modifiant ainsi les propriétés de la surface. La deuxième phase est caractérisée par le transport des microorganismes vers la surface via des forces hydrodynamiques, des mécanismes de diffusion, des mouvements Browniens, la gravité (sédimentation), et enfin la motilité propre des cellules (**Figure N°2**).

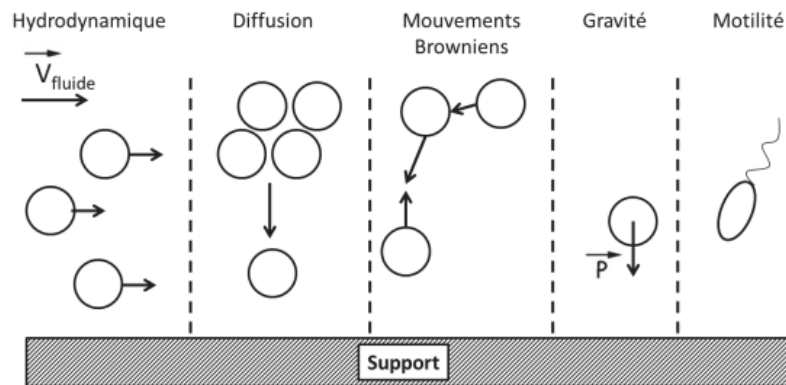


Figure N°2 : Processus de transport des microorganismes vers le support (Saur, 2014)

Cette phase est suivie par l'adhésion microbienne qui est initiée par une adsorption réversible faisant intervenir des forces de faible énergie telles que les forces de Van der Waals London, les interactions électrostatiques et les interactions acido-basiques. Des interactions spécifiques covalentes sont ensuite engagées et l'adhésion devient irréversible [(Characklis et Marshall, 1990) ; (Wang et al., 2011)].

Une fois l'adhésion est irréversible, la formation des biofilms est inévitable. Lors de la phase de prolifération, la production de la matrice exopolymérique est très importante. Des modifications métaboliques ainsi que des interactions intercellulaires assurant l'organisation et la structure du biofilm, sont observées. Le processus de formation des biofilms se termine par la phase de dispersion au cours de laquelle les microorganismes peuvent interagir avec des signaux environnementaux et se détacher des surfaces, permettant la colonisation et la formation de nouveaux biofilms (Marsh, 2004) (Figure N°3).

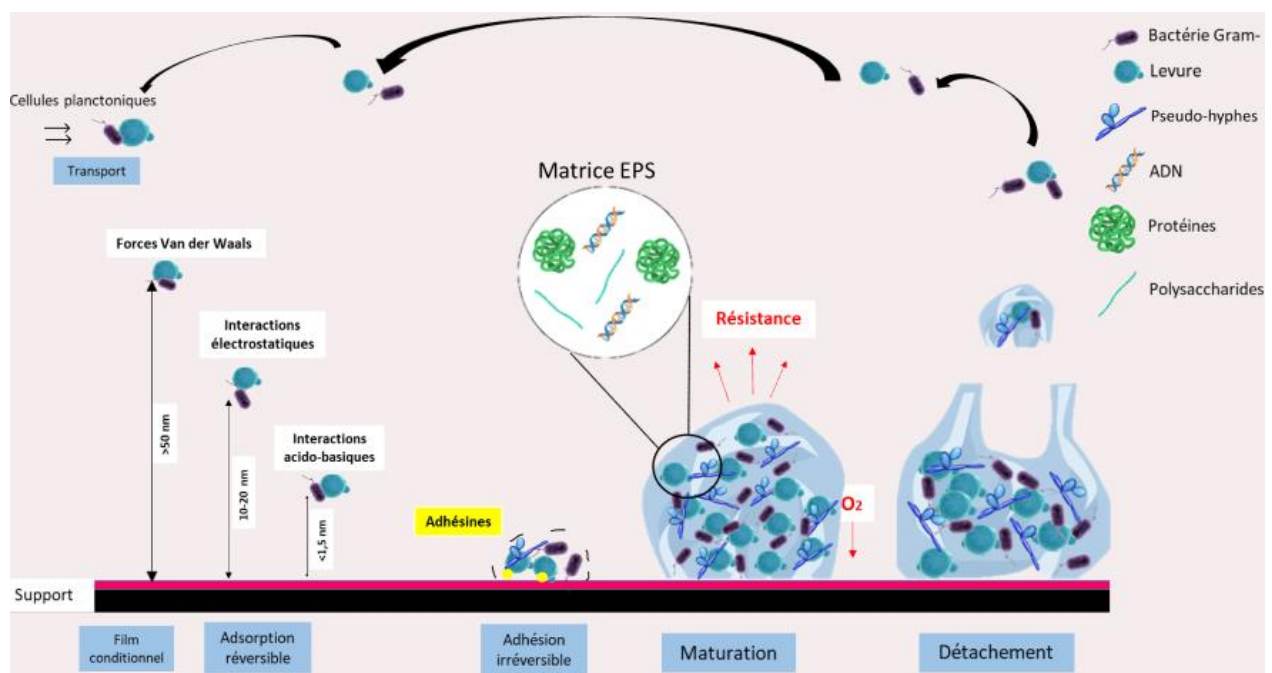


Figure N°3 : Cycle de formation d'un biofilm polymicrobien (Crée avec figma.com)

Dans un contexte infectieux, les biofilms sont majoritairement mixtes ou multi-espèces abritant diverses espèces (fongiques et bactériennes) et sont responsables de 65 à 80% des infections polymicrobiennes **(Pang et al., 2023)**.

Parmi les biofilms polymicrobiens, ceux de la plaque dentaire et des maladies parodontales semblent être mieux décrits. Ces biofilms sont des environnements d'une grande complexité et hétérogénéité, caractérisés par une diversité physique, chimique, et biotique **(Socransky et Haffajee, 2002)**.

La flore commensale orale est caractérisée par sa diversité microbienne composée de bactéries, de levures dont les genres prédominants sont *Candida*, *Aspergillus* et *Fusarium*. En effet, l'espèce *Candida albicans* fait partie de la microflore endogène présente chez au moins 70% de la population humaine saine **(Pappas et al., 2018)**.

Il s'agit d'une levure polymorphe opportuniste, dotée de mécanismes d'adaptation complexes qui lui permettent de survivre dans diverses conditions environnantes et de causer une grande variété d'infections avec des atteintes superficielles (candidoses mucocutanées) ou profondes (candidoses systémiques, souvent mortelles) **(Alvarez-Rueda et al., 2020)**.

Dans la cavité buccale, *Candida albicans* peut interagir avec les autres microorganismes commensaux. En **2007**, **Klotz et al.**, ont montré que de nombreuses candidémies étaient de nature polymicrobienne. Ainsi *C. albicans* possède de nombreuses opportunités d'interaction et de formation potentielle de biofilms polymicrobiens avec d'autres espèces fongiques ou bactériennes **(Ponde et al., 2021)**. Plusieurs facteurs influencent le type d'interaction entre les cellules fongiques et bactériennes au sein d'un biofilm, notamment l'espèce ainsi que des paramètres environnementaux tels que la température, le pH et le niveau de glucose **(Roy et al., 2021)**. C'est pourquoi, des relations d'antagonisme, de coopération, de mutualisme ou de synergie, peuvent se produire dans un biofilm mixte formé par *Candida albicans* et des espèces bactériennes **(Tyasningsih, 2022)**.

C. albicans peut avoir des relations synergiques avec certaines bactéries anaérobies par son potentiel à consommer rapidement l'oxygène de son environnement, permettant ainsi la survie et la croissance de ces bactéries **(Fox et al., 2014) (Figure N°4)**.

Des relations antagonistes ont également été décrites entre *C. albicans* et des bactéries appartenant au genre *Streptococcus*. Ces dernières produisent des acides qui peuvent inhiber la formation d'hyphes par *C. albicans* (Lof et al., 2017). Une autre relation antagoniste a été décrite entre *C. albicans* et *P. aeruginosa*. L'adhésion de *P. aeruginosa* à la forme hyphale de *C. albicans* va induire la mort des cellules fongiques. Cependant, le farnésol, produit par *C. albicans* perturbe le quorum sensing de *P. aeruginosa* (Peleg et al., 2010).

Par ailleurs, certaines bactéries comme *Staphylococcus aureus* sont capables d'adhérer uniquement aux formes filamenteuses de *C. albicans*, alors que *Staphylococcus epidermidis* adhère aux deux formes filamenteuse et hyphale [(Adam et al., 2002) ; (Harriott et Noverr, 2009)].

L'échange de nutriments est également possible entre *S. aureus* qui peut consommer le cholestérol issu du métabolisme de *C. albicans* (Weidt et al., 2016). De même *C. albicans* peut consommer le lactate produit par *S. mutans* (Lof et al., 2017).

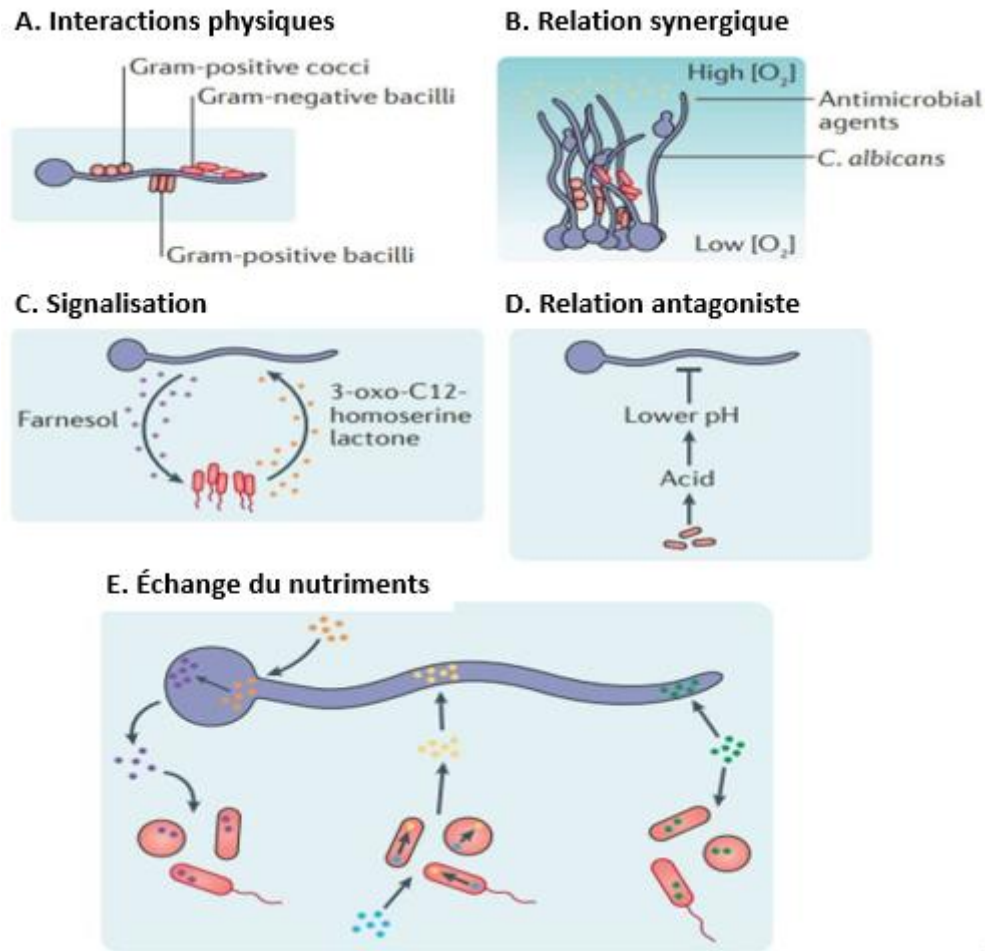


Figure N°4 : Différents types d'interactions entre *C. albicans* et les bactéries (Lohse et al., 2017)

Les bactéries sont représentées en rouge (les Gram+ ont un contour noir et les Gram- ont un contour rouge). A. Adhérence des bactéries à *C. albicans* ; B. relation synergique C. communication inter-règne ; D. relation antagoniste E. échange de nutriments ou utilisation de sous-produits du métabolisme.

Ces multiples interactions au sein des biofilms polymicrobiens, renforcent la virulence et la résistance des microorganismes qui le composent et compliquent, par conséquent, le diagnostic et le traitement de ces infections (**Lohse et al., 2020**). Pour cela, la prise en charge de ces infections associées aux biofilms mixtes est un réel déficit tant sur plan clinique qu'économique.

Pour pallier à ce problème, plusieurs chercheurs se sont orientés vers le développement de nouvelles approches thérapeutiques parmi lesquelles nous pouvons citer la combinaison entre les agents antimicrobiens en vue d'optimiser leurs efficacités.

Les premiers travaux qui ont mis l'accent sur l'efficacité de l'association d'antifongiques vis-à-vis des cellules sessiles de *Candida albicans* ont été menés en **2018**, par **Touil et ses collaborateurs** en utilisant l'amphotéricine B combinée à la caspofungine et au voriconazole. Ces auteurs ont mis en évidence une interaction synergique entre les associations amphotéricine B/voriconazole, amphotéricine B/caspofungine et voriconazole/caspofungine vis-à-vis des cellules planctoniques et sessiles de *Candida albicans*. De même, **Benahmed et al., (2023)**, ont montré que l'amphotéricine B combinée à la colistine présente une meilleure efficacité vis-à-vis des biofilms mixtes formés par *Candida parapsilosis/Enterobacter cloacae* comparée aux deux antimicrobiens utilisés seuls. Cette interaction est de type synergique.

Par ailleurs, la vitamine C, en raison de ses propriétés antioxydantes et immunomodulatrices, a suscité un intérêt croissant en tant qu'adjuvant dans les thérapies antimicrobiennes. Elle peut être associée à des antibiotiques et antifongiques pour moduler l'immunité, l'expression génique et divers processus physiologiques essentiels (**Sorice et al., 2014**).

En effet, des études ont montré que les propriétés antioxydantes de la vitamine C peuvent contribuer à réduire le stress oxydatif et l'inflammation, ce qui pourrait augmenter l'efficacité des antibiotiques dans la lutte contre les infections bactériennes, notamment contre certaines pathogènes Gram-négatifs comme *Pseudomonas*, *E. coli* et *Enterobacter* [(**Liu et al., 2018**) ; (**Rafa et Rini, 2023**)].

De plus, **Belhachemi et al (2021)**, ont montré que la complexation de l'amphotéricine B à des molécules antioxydantes comme la vitamine C, réduit l'oxydation lipidique induite par cet antifongique avec une amélioration de son efficacité vis-à-vis de *Candida albicans* ATCC10231.

Partant de ces données, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur la :

- Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C vis-vis des cellules planctoniques de *Candida albicans*, d'*Enterobacter cloacae complex* et de *Pantoea agglomerans*.
- Mise en évidence du potentiel de formation de biofilms mono et multi-espèces *in vitro* par les souches étudiées.
- Détermination des SCMI₈₀ de l'amphotéricine B, de la ciprofloxacine et de la vitamine C seules vis-à-vis des biofilms mono-espèces.
- Evaluation de l'activité métabolique de *Candida albicans*, d'*Enterobacter cloacae complex* et de *Pantoea agglomerans* au sein des biofilms mono et mutli-espèces.
- Evaluation de l'effet inhibiteur des biofilms mixtes formés par les associations *Candida albicans/Pantoea agglomerans* et *Candida albicans/Enterobacter cloacae* par l'amphotéricine B, la ciprofloxacine et la vitamine C seules et combinées.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » (LapSab) de l'Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen.

1. Matériel biologique

1.1. Microorganismes

Cette étude a porté sur deux levures de *Candida albicans* et de deux bactéries Gram négatives co-isolées en 2024 de la cavité buccale d'enfants atteints d'un diabète de type 1 de la wilaya de Tlemcen. Il s'agit de *Candida albicans/Pantoea agglomerans* et *Candida albicans/Enterobacter cloacae*.

Les souches sont entretenues par repiquages réguliers et conservées à +4°C sur gélose Sabouraud pour les levures et sur gélose nutritive pour les bactéries.

Tableau N°1 : Concentrations minimales inhibitrices de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine

Souches	L'amphotéricine B	La ciprofloxacine
<i>Candida albicans</i> 1	1µg/mL	/
<i>Candida albicans</i> 2	0,125µg/mL	/
<i>Pantoea agglomerans</i>	/	0,25ug/ml
<i>Enterobacter cloacae</i>	/	0,5ug/ml

1.2. Antimicrobiens

Nous avons utilisé un antifongique systémique, l'amphotéricine B et un antibiotique à large spectre de la famille des fluoroquinolones, la ciprofloxacine.

1.3. Antioxydant

Notre choix a porté sur un antioxydant naturel, l'acide ascorbique ou la vitamine C (Vit C), disponible au laboratoire de recherche « LapSab » en poudre blanche

(Sigma-Aldrich) avec une pureté de 99%. La vitamine C, est un dérivé d'ose qui présente une structure à six atomes de carbone ($C_6H_8O_6$) (**Figure N°5**).

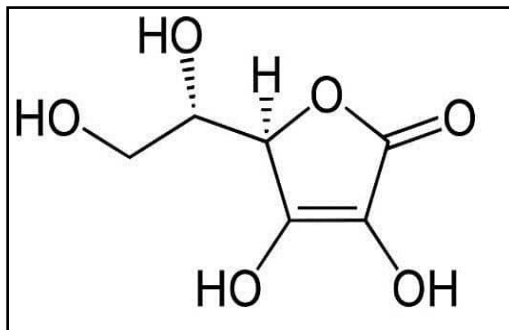


Figure N°5 : Structure moléculaire de l'acide ascorbique ou vitamine C (Brewer, 2011)

2. Méthodes

2.1. Préparation des solutions mères des antimicrobiens

Les solutions mères des deux antimicrobiens sont préparées en extemporané par dissolution de l'amphotéricine B dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 1,6mg/mL et de la cirpofloxacine dans l'eau distillée stérile à une concentration de 512µg/mL.

2.2. Préparation de la vitamine C

La solution mère de la vitamine C est préparée en extemporané dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 40mg/mL pour les CMI et 160mg/mL pour le SCMI.

Une dilution au 1/2 est réalisée dans le milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) tamponné à pH7 avec du MOPS à 0,165mol/L pour les levures et dans le milieu Müller-Hinton pour les bactéries.

2.3. Préparation des sels de tétrazolium et de la ménadione

Le tétrazolium XTT (2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfo-phényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide) provient des laboratoires SIGMA, est un indicateur de viabilité des cellules.

Le XTT est dissous dans du tampon phosphate salé de sodium (PBS) pH 7,4 ; 10mM à une concentration de 0,5g/L. La solution ainsi préparée est stérilisée par filtration à l'aide d'un filtre millipore de porosité 0,22µm, puis conservée à -20 °C à l'abri de la lumière.

La ménadione (2-méthyl-1,4-naphtoquinone), également connue sous le nom de vitamine K3 (SIGMA), est utilisée comme accepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire. La solution mère de ménadione est préparée extemporanément dans de l'acétone à une concentration de 0,17mg/mL, puis stérilisée par filtration.

1µL de la solution de ménadione est ajouté à 10mL de solution du XTT. Le mélange est immédiatement filtré à travers un filtre millipore de 0,22µm avant l'utilisation.

2.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C vis-à-vis des souches de *Candida albicans*, de *Pantoea agglomerans* et d'*Enterobacter cloacae*

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de la vitamine C vis-à-vis des deux souches de *C. albicans*¹, *C. albicans*² sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits selon le protocole standard de *Clinical and Laboratory Standards Institute* publié en 2008 qui recommande le milieu *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) (**CLSI, 2008 M27-A3**). Pour les deux bactéries *P. agglomerans* et d'*E. cloacae*, nous avons suivi la même technique que les levures en suivant le protocole du **CLSI, 2016** qui utilise le milieu Müller-Hinton.

Les concentrations cellulaires de départ sont fixées à $1,5 \times 10^3$ cellules/mL et à 10^7 UFC/mL pour les levures et les bactéries respectivement.

Dans les puits d'une microplaque contenant 100µL de l'inoculum levurien ou bactérien, nous avons ajouté 100µL de la solution de vitamine C. Les concentrations finales en vitamine C sont comprises entre 0,0195 et 10mg/mL.

Un contrôle positif (inoculum seul) et un contrôle négatif (milieu de culture seul) sont utilisés. La microplaque est ensuite scellée puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

La CMI correspond à la concentration de la vitamine C où aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Les tests sont réalisés en triplicata.

2.5. Evaluation du potentiel des souches de *Candida albicans*, de *Pantoea agglomerans* et d'*Enterobacter cloacae* à former des biofilms mono-et multi-espèces

2.5.1. Formation des biofilms mono et multi-espèces

Afin d'évaluer le potentiel des deux souches de *Candida albicans*, de *Pantoea agglomerans* et d'*Enterobacter cloacae* à former des biofilms mono et multi-espèces *in vitro*, nous avons suivi les protocoles de **Pierce et al., (2008)** et de **Seghir et al., (2015)** respectivement.

Des précultures de 24 heures sur le milieu Sabouraud liquide pour les levures et sur le milieu Brain Heart Infusion (BHIB) pour les bactéries sont centrifugées à 3000g pendant 5 minutes et à 1000g pendant 15 minutes à 4 °C respectivement. Les culots sont lavés deux fois avec du PBS pH 7,4 ;10mM.

L'inoculum de départ est ajusté à 10⁶ cellules/mL dans le RPMI (pH7) pour les levures et à 10⁷ UFC/mL dans le milieu Tryptic Soy (TSB) pour les bactéries.

Pour les biofilms mono-espèces, 100µL de chaque suspension cellulaire sont introduits dans les puits des microplaques de 96 puits qui sont ensuite scellées et placées dans une étuve à 37 °C pendant 24 et 48 heures. Pour les biofilms mixtes formés par *C. albicans*1/*P. agglomerans* et *C. albicans*2/*E. cloacae*, 50µL de la suspension levurienne sont mélangés avec 50µL d'une suspension bactérienne à des concentrations cellulaires de 10⁶cellules/mL pour les levures et de 10⁷UFC/mL pour les bactéries. Les microplaques sont scellées puis mises à incuber dans une étuve à 37°C pendant 24 et 48 heures.

2.5.2. Evaluation de l'activité métabolique des biofilms mono et multi-espèces formés *in vitro*

Pour mesurer l'activité métabolique au sein des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans*1/*P. agglomerans* et *C. albicans*2/*E. cloacae*, nous avons suivi le protocole de **Villar-Vidal et al., (2011)**, basé sur la réduction du XTT en formazan, un composé orange dont la concentration est déterminée par mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 490nm dans le milieu extracellulaire.

Après la formation des biofilms, les surnageants sont aspirés et les puits sont rincés 3 fois avec du PBS stérile (pH 7,4 ;10mM). 100µL du mélange XTT/ménadione sont ajoutés à chaque puits.

Après incubation des microplaques pendant 3 à 4 heures à 37°C à l'abri de la lumière, un volume de 75µL du contenu de chaque puits est transféré dans de nouvelles microplaques stériles, puis l'absorbance est mesurée à 490nm à l'aide d'un lecteur de microplaques spectrophotométrique (**Asys UVM 340**).

Les concentrations minimales inhibitrices des cellules sessiles (SCMI) sont évaluées à 80% d'inhibition selon la formule suivante :

$$SCMI_{80} = 100 \left[1 - \frac{\text{Moyenne des } DO_{490} \text{ avec antimicorbien}}{\text{Moyenne des } DO_{490} \text{ sans antimicorbien}} \right]$$

Les microorganismes sont considérés comme formateurs de biofilms lorsque la densité optique mesurée est supérieure ou égale à 0,200. En fonction de la valeur de cette dernière, les levures sont regroupées en 6 catégories :

- Catégorie +1 (DO < 0,20) : souches non-formatrices de biofilms
- Catégorie + 2 (DO = 0,20 à 0,39) : souches faiblement formatrices de biofilms
- Catégories +3 (DO = 0,40 à 0,69) ; +4 (DO = 0,70 à 0,99) : souches modérément formatrices de biofilms
- Catégorie +5 (DO = 1 à 1,29), +6 (DO > 1,30) : souches hautement formatrices de biofilms

2.6. Inhibition *in vitro* des biofilms mono et multi-espèces de *C. albicans*, *E. cloacae* et *P. agglomerans*

2.6.1. Inhibition des biofilms mono-espèces

Les biofilms mono-espèces de *C. albicans*¹, *C. albicans*², *E. cloacae* et *P. agglomerans*, sont formés *in vitro* dans les puits d'une microplaque en polystyrène selon le protocole de **Pierce et al., (2008)** décrit précédemment.

Les antimicrobiens (amphotéricine B et ciprofloxacine) et la vitamine C sont ajoutés aux puits des microplaques au temps zéro de la croissance (début de la phase d'adhésion) et après 24 heures (phase de prolifération).

L'effet inhibiteur de l'amphotéricine B, de la ciprofolxacine et de la vitamine C seules et associées est évalué par quantification de l'activité métabolique des biofilms formés selon le protocole de **Villar-Vidal et coll., (2011)** décrit précédemment.

a. Phase d'adhésion initiale

Un volume de 100µL de la suspension levurienne ou bactérienne est déposé dans les puits d'une microplaque à 96 puits, auxquels sont ajoutés 100µL de l'un des antimicrobiens à tester. Après homogénéisation, une série de dilution de ½ de puits en puits est effectuée.

Les concentrations finales de l'amphotéricine B, de la ciprofloxacine et de la vitamine C varient respectivement de 0,125 à 64µg/mL, de 0,5 à 256µg/mL et de 0,078 à 40mg/mL. Les microplaques ainsi préparées sont scellées puis placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures à 37° C. Chaque test est réalisé en duplicata.

b. Phase de prolifération

100µL de la solution d'amphotéricine B, de cirpofloxacine ou de vitamine C sont ajoutés aux puits d'une microplaque dans lesquels des biofilms de 24 heures ont été formés selon le protocole de **Pierce et al., (2008)**.

Les concentrations finales varient de 0,25 à 128µg/mL pour l'amphotéricine B, de 1 à 512µg/mL pour la ciprofloxacine et de 0,156 à 80mg/mL pour la vitamine C.

Les microplaques sont scellées et placées dans une étuve à 37° C pendant 24 heures.

2.6.2. Inhibition des biofilms multi-espèces *C. albicans*¹/ *P. agglomerans* et *C. albicans*²/*E. cloacae*

Pour l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'amphotéricine B, la ciprofloxacine et la vitamine C seules et associées sur des biofilms multi-espèces formés *in vitro* par *C. albicans1*/*P. agglomerans* et *C. albicans2*/*E. cloacae*, nous avons suivi le protocole de **Benahmed et al., (2023)**.

L'amphotéricine B est utilisée à des concentrations finales de 32µg/mL pour la souche *C. albicans1* et de 16µg/mL pour la souche *C. albicans2*. Quant à la ciprofloxacine, les concentrations finales sont de 128µg/mL pour *P. agglomerans* et de 64µg/mL pour *E. cloacae*.

Il est important de noter que les concentrations finales de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacine utilisées correspondent à leurs SCMI₈₀ respectives vis-à-vis des levures et des bactéries testées.

Concernant la vitamine C, nous avons choisi deux concentrations finales, 0,078mg/mL et 0,039mg/mL. Ce choix est basé sur les travaux de **Abdelraheem et al., (2022)**, qui ont montré que des concentrations sub-inhibitrices de la vitamine C comprises entre 0,0195 et 0,3125mg/mL, exercent un effet anti-biofilm (100% d'inhibition) vis-à-vis des bactéries gram négatives.

a. Phase d'adhésion initiale

25µL de la suspension levurienne et 25µL de la suspension bactérienne sont introduits dans les puits d'une microplaque 96 puits auxquels sont ajoutés 50µL des antimicrobiens et de la vitamine C seuls (AmB, Cipro et VitC) et associés (AmB/Cipro ; AmB/VitC, Cipro/VitC et AmB/Cipro/VitC). Les microplaques sont scellées et mises à incuber pendant 24 heures à 37° C.

b. Phase de prolifération

Dans les puits d'une microplaque contenant des biofilms de 24 heures, nous avons introduit 100µL de la solution d'antimicrobiens et de la vitamine C seuls (AmB, Cipro et VitC) et associés (AmB/Cipro ; AmB/VitC, Cipro/VitC et AmB/Cipro/VitC) selon le protocole de **Benahmed et al., (2023)**.

L'activité métabolique est évaluée selon le protocole de **Villar-Vidal et al., (2011)** décrit précédemment.

2.7. Etude statistique

Une analyse statistique basée sur un test ANOVA à un facteur, suivie du test de Tukey, est réalisée afin de comparer l'effet des différents traitements (monothérapie, bithérapie et trithérapie), avec un seuil de signification fixé à $p \leq 0,05$.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Abdelraheem, W. M., Refaie, M. M., Yousef, R. K. M., Abd El Fatah, A. S., Mousa, Y. M., & Rashwan, R. (2022). Assessment of antibacterial and anti-biofilm effects of vitamin C against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 847449.
2. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol* 2002;51:344–9.
3. Alvarez-Rueda N., Rouges C., Touahri A., Misme-Aucouturier B., Albassier M., Pape P.L. (2020) *In vitro* immune responses of human PBMCs against *Candida albicans* reveals fungal and leucocyte phenotypes associated with fungal persistence. *Scientific reports*, *10*(1):1-16
4. Belhachemi, M. H., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Belmir, S. (2021). Influence of ascorbic acid and α -tocopherol on the autoxidation and *in vitro* antifungal activity of amphotericin B. *Current Medical Mycology*, *7*(1), 12.
5. Benahmed, A., Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Tani, Z. Z. B. A. K., Aissaoui, M., Merabet, D. H., ... & Boucherit, K. (2023). *In vitro* evaluation of biofilm formation by *Candida parapsilosis* and *Enterobacter cloacae*. Scanning electron microscopy and efficacy of antimicrobial combinations study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *107*(1), 116003. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2023.116003>
6. Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *10*(4), 221-247.
7. Characklis, W. G., & Marshall, K. C. (1990). Biofilms. (*No Title*).
8. Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., & Fink, G. R. (2004). Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(14), 5048-5052.
9. Chen, Y., Gao, Y., & Yin, J. (2024). Ascorbic Acid Enhances the Inhibitory Effect of Theasaponins against *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(19), 10661.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; document M100S, 26th ed.

11. CLSI (2008). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3.2008. *Clinical and Laboratory Standards Institute*
12. El-Azizi, M. A., Starks, S. E., & Khardori, N. (2004). Interactions of *Candida albicans* with other *Candida* spp. and bacteria in the biofilms. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1067-1073.
13. Filloux, A., & Vallet, I. (2003). Biofilm: Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne [Biofilm: positioning and organization of bacterial communities]. *Medical Science*, 19, 77-83.
14. Fox EP, Cowley ES, Nobile CJ et al. Anaerobic bacteria grow within *Candida albicans* biofilms and induce biofilm formation in suspension cultures. *Curr Biol* 2014;24:2411–6
15. González-Párraga, P., Sánchez-Fresneda, R., Zaragoza, Ó., & Argüelles, J. C. (2011). Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1810(8), 777-783.
16. Goswami, M., Mangoli, S. H., & Jawali, N. (2011). Antibiotics and antioxidants: Friends or foes during therapy. *Barc Newsletter*, 323, 42-46.
17. Harriott, M. M., & Noverr, M. C. (2009). *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(9), 3914-3922.
18. Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 322-332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
19. Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 163-173.
20. Jorgensen, J. H., Pfaller, M. A., Carroll, K. C., Funke, G., Landry, M. L., Richter, S. S., & Warnock, D. W. (2015). Manual of clinical microbiology, ASM Press. Washington, DC.[Google Scholar].

21. Klotz SA, Chasin BS, Powell B et al. Polymicrobial bloodstream infections involving *Candida* species: analysis of patients and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59:401–6.
22. Kuhn, D. M., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*, 70(2), 878-888.
23. Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6), 1773-1780.
24. Liu, F., Wang, F., Du, L., Zhao, T., Doyle, M. P., Wang, D., ... & Xu, W. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against *Enterobacter cloacae*. *Food Control*, 84, 442-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.004>
25. Lof, M., Janus, M. M., & Krom, B. P. (2017). Metabolic interactions between bacteria and fungi in commensal oral biofilms. *Journal of Fungi*, 3(3), 40.
26. Lohse M.B., Gulati M., Craik C.S., Johnson A.D., Nobile C.J. (2020) Combination of antifungal drugs and protease inhibitors prevent *Candida albicans* biofilm formation and disrupt mature biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 11:1027.
27. Lohse M.B., Gulati M., Valle Arevalo A., Fishburn A., Johnson A.D., Nobile C.J. (2017) Assessment and optimizations of *Candida albicans in vitro* biofilm assays. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(5):e02749-16.
28. Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries research*, 38(3), 204-211.
29. Masadeh, M. M., Mhaidat, N. M., Alzoubi, K. H., Al-Azzam, S. I., & Shaweesh, A. I. (2012). Ciprofloxacin-induced antibacterial activity is reversed by vitamin E and vitamin C. *Current microbiology*, 64, 457-462.
30. Nailis, H., Kucharíková, S., Řičicová, M., Van Dijck, P., Deforce, D., Nelis, H., & Coenye, T. (2010). Real-time PCR expression profiling of genes encoding potential virulence factors in *Candida albicans* biofilms: identification of model-dependent and-independent gene expression. *BMC microbiology*, 10, 1-11.

31. Nett, J. E., Lepak, A. J., Marchillo, K., & Andes, D. R. (2009). Time course global gene expression analysis of an *in vivo* *Candida* biofilm. *The Journal of infectious diseases*, 200(2), 307-313.
32. Nett, J., Lincoln, L., Marchillo, K., Massey, R., Holoyda, K., Hoff, B., ... & Andes, D. (2007). Putative role of β -1, 3 glucans in *Candida albicans* biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(2), 510-520.
33. Olsen, I. (2015). Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 877–886.
34. Pang, L., Lin, H., Yang, F., et Deng, D. (2023). Editorial: Mechanisms of biofilm development and antibiofilm strategies. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1190611>
35. Pappas P.G., Lionakis M.S., Arendrup M.C., Ostrosky-Zeichner L., Kullberg B.J. (2018) Invasive candidiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1):1-20.
36. Pathak D.T., Wei X., Bucuvalas A., Haft D.H., Gerloff D.L., Wall D. (2012) Cell contact–dependent outer membrane exchange in Myxobacteria: genetic determinants and mechanism. *PLoS genetics*, 8(4):e1002626
37. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:340–9.
38. Perumal, P., Mekala, S., & Chaffin, W. L. (2007). Role for cell density in antifungal drug resistance in *Candida albicans* biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(7), 2454-2463.
39. Pierce, C. G., Uppuluri, P., Tristan, A. R., Wormley Jr, F. L., Mowat, E., Ramage, G., & Lopez-Ribot, J. L. (2008). A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nature protocols*, 3(9), 1494-1500.
40. Ponde, N. O., Lortal, L., Ramage, G., Naglik, J. R., & Richardson, J. P. (2021). *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Critical reviews in microbiology*, 47(1), 91-111. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1843400>
41. Rafa, Z. T., & Rini, S. C. (2023). *The combined effects of ciprofloxacin and vitamin C on the multi drug resistant Gram-negative bacteria* (Doctoral dissertation, Brac University).

42. Ramage, G., Saville, S. P., Wickes, B. L., & López-Ribot, J. L. (2002). Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5459-5463.
43. Roy, P. K., Ha, A. J. W., Mizan, M. F. R., Hossain, M. I., Ashrafudoulla, M., Toushik, S. H., ... & Ha, S. D. (2021). Effects of environmental conditions (temperature, pH, and glucose) on biofilm formation of *Salmonella enterica* serotype Kentucky and virulence gene expression. *Poultry Science*, 100(7), 101209. doi: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101209>
44. Saur, T. (2014). Structuration morphologique et microbiologique des biofilms multi-espèces: de l'adhésion au biofilm mature (Doctoral dissertation, Université Montpellier II-Sciences et Techniques du Languedoc).
45. Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., & Anselme-Bertrand, I. (2015). Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen. Première étude en Algérie. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 123-129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.001>
46. Socransky, S.S., and Haffajee, A.D. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000 28, 12–55.
47. Stergiopoulou, T., Meletiadis, J., Sein, T., Papaioannidou, P., Tsiouris, I., Roilides, E., & Walsh, T. J. (2009). Comparative pharmacodynamic interaction analysis between ciprofloxacin, moxifloxacin and levofloxacin and antifungal agents against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), 343-348.
48. Stewart, P.S., and Costerton, J.W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 358, 135–138.
49. Taşkın, A., Ulusal, H., Taşkın, S., & Tarakçıoğlu, M. (2020). Tetrazolium-based cytotoxicity tests may not always reflect accurate results. *Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 17(1), 6-12. doi : 10.35440/hutfd.600652
50. Touil, H.F.Z., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., 2018. *In vitro* activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from

medical devices in an intensive care department. *J. Mycol. Medicale*. 28, 414–418.
<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.06.008>

51. Tyasningsih W., Ramandinianto S.C., Ansharieta R., Mutamsari Witaningrum A., Permatasari D.A., Wardhana D.K., Helmi Effendi M., Nnabuike Ugbo E. (2022) Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from raw milk in East Java, Indonesia. *Veterinary World*, 15(8):2021-2028. doi: 10.14202/vetworld.2022.2021-2028.

52. Villar-Vidal, M., Marcos-Arias, C., Eraso, E., & Quindós, G. (2011). Variation in biofilm formation among blood and oral isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(9), 660-665.

53. Wang, H., Sodagari, M., Chen, Y., He, X., Newby, B. M. Z., & Ju, L. K. (2011). Initial bacterial attachment in slow flowing systems: effects of cell and substrate surface properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87(2), 415-422.

54. Weidt S, Haggarty J, Kean R et al. (2016) A novel targeted/untargeted GC-Orbitrap metabolomics methodology applied to *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Metabolomics*, 12:189. DOI 10.1007/s11306-016-1134-

ملخص

تناولت هذه الدراسة تقييم التأثير المثبط للأموغوتريسين B والسيبروفلوكساسين، كل على حدة أو عند دمجهما مع فيتامين C ، على الأغشية الحيوية المختلطة المشكلة داخل المختبر من طرف *Candida albicans1/Pantoea agglomerans* و *Candida albicans2/Enterobacter cloacae* المعزولة بشكل مشترك من التجويف الفموي للأطفال مصابين بداء السكري في مدينة تلمسان.

بلغت قيم التركيز المثبط الأدنى لفيتامين C في الحالة البلنكتونية 5 ملغ/مل تجاه الخمائر *C. albicans* و *P. agglomerans* و 2,5 ملغ/مل تجاه *E. cloacae*. أما تركيز التثبيط الأدنى الحيوي الثابت (SCMI₈₀) فقد ازداد مع نضج الغشاء الحيوي، ليصل إلى 512 ميكروغرام/مل بالنسبة للسيبروفلوكساسين و 128 بالنسبة للأموغوتريسين B. قد أظهر فيتامين C فعالية تعتمد على الجرعة، رغم تداخله مع اختبار XTT .

كل السلالات المختبرة كانت قادرة على تشكيل أغشية حيوية، وتفاوتت القدرة على التشكيل حسب نوع الغشاء (أحادي أو مختلط) ومدة الحضانة. فعلاً، انتقلت التشاركات *C. albicans1/P. agglomerans* و *C. albicans2/E. cloacae* من الفئة +2 (ضعيفة التشكيل) إلى الفئة +4 بالنسبة ل *C. albicans2/E. cloacae* وإلى الفئة +5 بالنسبة ل *C. albicans1/P. agglomerans* (قوية التشكيل) بعد 24 و 48 ساعة على التوالي.

أظهر علاج الأغشية الحيوية المختلطة بالمركب الثلاثي amphotéricine B/Ciprofloxacin/Vitamine C أعلى فعالية، بنسبة تثبيط تفوق 96%. تؤكد هذه النتائج أهمية الجمع بين العلاجات أهمية التدخل المبكر.

الكلمات المفتاحية: الأغشية الحيوية المختلطة، بكتيريا سلبية الغرام/ *C. albicans* ، تثبيط الأغشية الحيوية، التراكيب العلاجية / فيتامين C ، تجويف الفم، الأطفال المصابون بالسكري

Résumé

Ce travail a porté sur l'évaluation de l'effet inhibiteur de l'amphotéricine B et de la ciprofloxacin seules et associées à la vitamine C des biofilms mixtes formés *in vitro* par *Candida albicans1/Pantoea agglomerans* et *Candida albicans2/Enterobacter cloacae* co-isolées de la cavité buccale d'enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.

Les concentrations minimales inhibitrices de la vitamine C en mode planctoniques sont de 5mg/mL vis-à-vis des levures de *C. albicans* et de *P. agglomerans*, et de 2,5mg/mL vis-à-vis d'*E. cloacae*.

Les concentrations minimales inhibitrices sessiles (SCMI₈₀) augmentent avec la maturation des biofilms formés par chaque espèce séparément, atteignant jusqu'à 512µg/mL pour la ciprofloxacin et 128µg/mL pour l'amphotéricine B. La vitamine C montre une efficacité dose-dépendante malgré son interférence avec le XTT.

Toutes les souches testées sont formatrices de biofilms. Ce potentiel dépend de la nature des biofilms, qu'ils soient mono ou multi-espèces ainsi que du temps d'incubation. En effet, pour les biofilms multi-espèces, les deux associations (*C. albicans 1/P. agglomerans* et *C. albicans2/E. cloacae*) passent de la catégorie +2 (faiblement formatrices de biofilms) à la catégorie +4 pour l'association *C. albicans2/E. cloacae* et à la catégorie +5 pour *C. albicans 1/P. agglomerans* (fortement formatrices de biofilms) pour des biofilms de 24 et 48 heures respectivement.

L'inhibition des biofilms multi-espèces s'est révélée la plus efficace lorsqu'ils sont traités par l'association amphotéricine B/Ciprofloxacin/Vitamine C avec des taux d'inhibition qui dépassent les 96%. Ces résultats soulignent l'intérêt des combinaisons thérapeutiques et l'importance d'un traitement précoce.

Mots clés : biofilms mixtes, *C. albicans*/bactéries Gram négatives, inhibition biofilms mixtes, associations antimicrobiens/vitamine C, cavité buccale, enfants diabétiques

Abstract

This study focused on evaluating the inhibitory effect of amphotericin B and ciprofloxacin, both individually and in combination with vitamin C, on mixed biofilms formed *in vitro* by *Candida albicans1/Pantoea agglomerans* and *Candida albicans2/Enterobacter cloacae* co-isolated from the oral cavity of diabetic children in the city of Tlemcen.

The planktonic minimal inhibitory concentrations (MICs) of vitamin C were 5mg/mL against *C. albicans* and *P. agglomerans*, and 2.5mg/mL against *E. cloacae*.

The sessile minimal inhibitory concentrations (SCMI₈₀) increased with the maturation of biofilms formed by each species separately, reaching up to 512µg/mL for ciprofloxacin and 128µg/mL for amphotericin B. Vitamin C showed a dose-dependent effectiveness despite its interference with the XTT assay.

All tested strains were biofilm-forming. This potential depended on the nature of the biofilms (mono- or multi-species) as well as the incubation time. Indeed, for multi-species biofilms, the two associations (*C. albicans1/P. agglomerans* and *C. albicans2/E. cloacae*) progressed from category +2 (weak biofilm producers) to category +4 for *C. albicans2/E. cloacae* and to category +5 for *C. albicans1/P. agglomerans* (strong biofilm producers) for 24- and 48-hour biofilms, respectively.

The inhibition of multi-species biofilms was most effective when treated with the combination of amphotericin B/Ciprofloxacin/Vitamin C, with inhibition rates exceeding 96%. These results highlight the importance of combination therapies and the need for early treatment.

Keywords: mixed biofilms, *C. albicans*/Gram-negative bacteria, mixed biofilm inhibition, antimicrobial combinations/vitamin, C oral cavity, diabetic children