

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



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

- Larbi Chahinez**
- Meddas Nassira**
- Kerkra Faiza**

Thème

Etude de l'effet de différentes formulations combinées entre l'agent antifongique et le PEG sur la formation des biofilms chez *Candida albicans*

Soutenu publiquement le : 20/06/2023

Jury:

Grade

Président: D^r YEZLI W.

« MCA »

Encadrant: M^{lle} BENMESSOUAD A.

« Doctorante »

Co-encadrant: D^r BENSALIM M.O

« MCA »

Examineur: D^r KHADEM H.

« MCB »

Année universitaire 2022-2023

A decorative scroll with a parchment-like texture, featuring intricate floral and vine patterns in pink, purple, and green. A large red wax seal is visible at the bottom left. The text is centered on the scroll.

Remercîment

*Avant tout, nous remercions **AL.LAH** le tout puissant qui nous a donné le courage et la patience pour passer Tous les moments difficiles, et arriver à achever ce travail.*

*Nous tenons à remercier notre directeur de mémoire. Mlle **BENMESSAOUD Amel**, Recevez ici Nos sincères remerciements, pour Votre encadrement, confiance, disponibilité et votre gentillesse.*

*Tout le respect et l'appréciation à notre co-encadreur Dr. **BENSAID Mohamed Ouassini** Merci beaucoup pour votre présence, vos conseils et votre communication constante.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury, Dr **Yezli Wassim** et Dr **Khadem Hafidha** Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre Travail et de l'enrichir par leurs propositions,*

*Nous tenons aussi à exprimer nos Sincères remerciements à tout le personnel et tous nos enseignants de la faculté sciences de la nature et de la vie de **TIARET**.*

Enfin, on remercie tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin dans l'élaboration de notre travail.

Dédicace 1



*Avec tous mes sentiments de respect, avec
l'expérience de ma reconnaissance,
je dédie ma remise de diplôme et ma joie
À mon paradis, à la prunelle de mes yeux,
à la source de ma joie, ma lune et le
file d'espoir qui allumer mon chemin, ma
moitié*

Maman

*À celui qui m'a fait une femme, ma Source
de vie d'amour et d'affection, à mon
support qui était toujours à mes côtés
pour me soutenir et m'encourager*

PAPA

*À mes chers frères OMAR, YOUNES et RAFIK
À mes chères sœurs AHLAM, FATIMA, SONIA,
NOUR et ASSINAT, qui n'ont pas cessée de
me conseiller, encourager et soutenir
tout au long de mes études*

*Sous oublier ma trinôme CHAHINEZ et FAIZA
A tout se qui en participé à ma réussite
et a tous qui m'aime*

Nassira

Dédicace 2



*Avec un énorme plaisir et une immense
joie que je dédie ce mémoire :
A celui qui m'a tout donné et me pousse
toujours pour avancer et pour atteindre
mes buts, mon cher père LARBI AZZOUZ
A ma première école de la vie, la
prunelle de mes yeux. Ma tendre mère
BECHEIKH MALIKA*

*A celle qui a coloré ma vie avec son
sourire, à Ma sœur LARBI KHEIRA qui ma
toujours soutenus et étai toujours à mes
côtés.*

*A mon cher frère: LARBI MOSTAFA Vous êtes
ma plus grande force ; merci pour vos
encouragements et vos services, merci car
je sens votre présences.*

*Sans oublier ma Trinôme pour son soutien
morale sa patience et sa compréhension
tout au long de ce projet.*

A Tous mes amis chacun avec son nom.

Dédicace 3



A mon père ce mémoire est dédiée à l'esprit de mon père qui m'a toujours poussée et motivée dans mes études. Sans lui, je n'aurais certainement pas fait d'études, ce mémoire représente donc l'aboutissement du soutien et des encouragements qu'il m'a prodigués tout au long de mon parcours. L'unique chose que je peux faire pour lui est de prier Dieu pour lui accord son infini miséricorde et l'accueillir dans son éternel paradis.

Ma chère mère

J'aimerais toujours la remercier pour tous ce qu'elle a faits jusqu'à nos jours-là pour assurer l'éducation et la formation de tous ces enfants. Je me rappelle vraiment de tous tes efforts avec moi dès mon jeune âge tu été pour moi la lumière qui guide mes routes et qui m'emmène aux chemins de la réussite, j'espère que mon travail sera le témoignage de ma gratitude et mon respect le plus profond.

A mes sœurs et frères.

À mes chères copines CHAHINEZ et NASSIRA qui ont partagé avec moi les moments difficiles de ce Travail.

Faiza

Résumé

Cette étude visait à évaluer l'efficacité de deux conjugués, PEG2000-nystatine et PEG2000-terbinafine, en tant qu'agents antifongiques vis-à-vis de quatre souches de *Candida albicans* isolées des muqueuses buccales et deux souches de référence, que ce soit dans leur forme planctonique ou dans leur forme biofilm. Les résultats ont montré que la combinaison de la nystatine avec le polymère polyéthylène glycol (PEG) a conduit à une augmentation de l'efficacité contre les souches testées. Des simulations de dynamique moléculaire ont révélé la formation de liaisons hydrogène entre la nystatine et le PEG, renforçant ainsi l'effet inhibiteur. En revanche, la combinaison terbinafine-PEG n'a pas montré de synergie, chaque molécule agissant indépendamment. Ces résultats soulignent l'importance des interactions moléculaires spécifiques dans le développement de formulations antifongiques améliorées.

Mots clé : PEG2000, Nystatine, Terbinafine, *Candida albicans*, Biofilm.

دفعت هذه الدراسة إلى تقييم فعالية اثنين من المركبات الاصطناعية، النايستاتين الملصق بالبوليثيلين جلايكول PEG2000 والتيربينافين الملصق أيضاً بـ PEG2000، كعامل مضادة للفطريات ضد أربع سلالات من *Candida albicans* المعزولة من الأغشية المخاطية الفموية، واثنين من السلالات المرجعية، سواء كانوا في شكلهم الخلوي أو في شكل البايوفيلم. أظهرت النتائج أن الدمج بين النايستاتين وبوليمر الإيثيلينجلايكول (PEG) أدى إلى زيادة الفعالية ضد السلالات المختبرة. كشفت المحاكاة الجزيئية الديناميكية عن تشكل روابط هيدروجينية بين النايستاتين وPEG، مما يعزز التأثير المثبط. بالمقابل، لم يظهر المزيج التيربينافين-PEG أي تآزر، حيث يتصرف كل جزء بشكل مستقل. تؤكد هذه النتائج أهمية التفاعلات الجزيئية المحددة من أجل تطوير تركيبات مضادة للفطريات أكثر فعالية.

الكلمات المفتاحية: PEG2000، النايستاتين، التيربينافين، *Candida albicans*، البايوفيلم.

This study aimed to evaluate the effectiveness of two conjugates, PEG2000-nystatin and PEG2000-terbinafine, as antifungal agents against four strains of *Candida albicans* isolated from oral mucosa and two reference strains, both in their planktonic and biofilm forms. The results showed that combining nystatin with polyethylene glycol (PEG) led to an increased efficacy against the tested strains. Molecular dynamics simulations revealed the formation of hydrogen bonds between nystatin and PEG, enhancing the inhibitory effect. In contrast, the terbinafine-PEG combination did not exhibit synergy, with each molecule acting independently. These findings highlight the importance of specific molecular interactions in the development of improved antifungal formulations.

Keywords: PEG2000, Nystatin, Terbinafine, *Candida albicans*, Biofilm.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

LISTE DES ANNEXES

LISTE DES ABREVIATIONS

1	Introduction.....	1
2	Matériel et méthodes.....	4
2.1	Objectifs de travail.....	4
2.2	Date et lieu de travail.....	4
2.3	Produits et appareillage	4
2.4	Origine des souches testées	5
2.5	Protocole expérimentale	6
2.6	Évaluation de l'activité antifongique dans les conditions planctoniques	7
2.6.1	La standardisation	7
2.6.2	Antibiogramme.....	7
2.6.3	Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques (CMI)	7
2.6.4	Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques en combinaison avec le PEG2000	8
2.6.4.1	Préparation du conjugué Nystatine/PEG2000 à la fraction molaire (50/50)	9
2.6.4.2	Préparation du conjugué Terb/PEG2000 à la fraction molaire (50/50).....	10
2.6.5	Évaluation de l'activité antibiofilm.....	10
2.6.5.1	Détermination des taux de réduction des biofilms (TR).....	10
2.6.5.2	Quantification des biofilms	11
3	Résultats et discussion	12
3.1	Vérification de la pureté des souches	12

3.2	Evaluation de l'activité antifongique dans les conditions planctoniques	13
3.2.1	Diffusion sur disque	13
3.2.2	Détermination des CMI's	14
3.2.3	Etude par dynamique moléculaire des interactions physiques entre les antifongiques et PEG2000	15
3.3	Evaluation de l'activité antifongique dans les conditions biofilms	17
3.3.1	Détermination du taux de réduction des biofilms	17
4	Discussion.....	20
5	Conclusion.....	22
6	Références bibliographiques	24
7	Annexe.....	26

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Matériels et produits utilisés au laboratoire.	4
Tableau 2: Souches utilisées de <i>C. albicans</i>	5
Tableau 3: Les masses respectives à la fraction molaires 50/50 du conjugué Nyst/PEG.	9
Tableau 4: masses respectives à la fraction molaires 50/50 du conjugué Terb/PEG.	10
Tableau 5: Test de sensibilité des antifongiques vis-à-vis <i>C. albicans</i>	13
Tableau 6: Tableau représentant les CMI des antifongiques individuels et en combinaison avec le PEG2000.	14
Tableau 7: Taux de réduction des biofilms après traitement avec l'antifongique nystatine seule et en combinaison avec le PEG2000.	17
Tableau 8: Taux de réduction des biofilms après traitement avec l'antifongique terbinafine seul et en combinaison avec le PEG2000.	18

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Schéma du protocole expérimental.....	6
Figure 2: Formation et quantification des biofilms.....	11
Figure 3: Observations macroscopique et microscopiques des souches testées.	13
Figure 4: Diamètre des zones d'inhibition des agents : Nystatine, Terbinafine et PEG2000 vis-à-vis <i>C. albicans</i>	14
Figure 5: Résultat de l'association moléculaire par liaisons d'hydrogène du module 3D des deux composés (A) Nystatine-PEG et (B) Terbinafine-PEG.....	16
Figure 6: Schéma explicatif de l'association par liaison d'hydrogène des deux composés (A) Nystatine-PEG et (B) Terbinafine-PEG.....	17
Figure 7: Taux de réduction des biofilms vis-à-vis les souches de <i>C. albicans</i> présenté en pourcentage; Comparaison entre l'effet de l'antifongique Nystatine seul et combiné avec le PEG2000.	19
Figure 8: Taux de réduction des biofilms vis-à-vis des souches de <i>C. albicans</i> présenté en pourcentage; Comparaison entre l'effet de l'antifongique Terbinafine seul et combiné avec le PEG2000.	19

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Produits utilisés.....	26
Annexe 2: Equipment de laboratoire.....	28
Annexe 3: Compositions des milieux de cultures utilisées.....	29
Annexe 4: Observation des biofilms au microscope.....	30
Annexe 5: Réduction des biofilms chez <i>C. albicans</i>	31

LISTE DES ABREVIATIONS

ATF: Antifongique.

ATCC: American Type Culture Collection.

CMI: Concentration minimale inhibitrice.

DMSO : Diméthylesulfoxyde.

SAB: Sabouraud Bouillon.

SCA: Sabouraud Chloramphenicol Actidione.

TTC: Triphenyltetrazolium chloride.

Terb: Terbinafine.

Nyst : Nystatine.

PEG2000: Polyéthylène glycol.

CA: *Candidats albicans*.

UFC: Unité formant des colonies par millimètres.

TR : Taux de réduction.

DZI: Diamètre des zones d'inhibition.

PCFF: Polymer consistent force feiled.

NPT : Nombre d'atomes pression- température constants.

Introduction

Introduction

Introduction

Les infections fongiques constituent un problème de santé mondial croissant, avec une incidence en constante augmentation ces dernières années. Ces affections causées par des champignons pathogènes représentent une menace sérieuse pour la santé humaine, en particulier chez les individus immunodéprimés et les patients soumis à des interventions médicochirurgicales. La candidose, principalement causée par *Candida albicans*, est l'une des infections fongiques les plus courantes et représente un défi majeur pour les cliniciens en raison de sa résistance aux traitements antifongiques conventionnels (Lee et al., 2021; Garnaud & Cornet, 2020; Petosa et al., 2018).

Parmi les différents mécanismes de résistance développés par ce champignon, sa capacité à former des biofilms, caractérisés par une structure complexe et une matrice extracellulaire, qui se forment fréquemment sur des surfaces biotiques et abiotiques. Lorsque *C. albicans* forme des biofilms sur ces surfaces, ceux-ci agissent comme une barrière physique contre les attaques du système immunitaire de l'hôte et permet aux cellules fongiques de résister efficacement aux traitements. De plus, le biofilm favorise la communication cellulaire et la production de facteurs de virulence, augmentant ainsi la capacité pathogène de *C. albicans*. Cette combinaison de protection et de virulence renforce la capacité de survie et de propagation de ce champignon, rendant les infections plus difficiles à traiter et plus sévères pour l'hôte (Mukherjee & Chandra, 2004; Turan & Demirbilek, 2018; Uppuluri & Lopez Ribot, 2017).

Les traitements actuels contre les infections à *C. albicans* sont basés sur l'utilisation d'antifongiques, tels que les azolés, les polyènes, les échinocandines et les allylamines, qui agissent selon des modes d'action différents. Les azolés inhibent la synthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane cellulaire fongique, tandis que les polyènes, interagissent avec l'ergostérol pour altérer la perméabilité de la membrane. Les allylamines, quant à elles, ciblent spécifiquement une enzyme clé appelée la squalène-époxydase, qui est impliquée dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane cellulaire des champignons (Dupont, 2006; Lee et al., 2021).

Cependant, ces traitements rencontrent plusieurs limitations et inconvénients lorsqu'il s'agit de traiter efficacement les biofilms. Outre les limitations liées à leur efficacité, ces traitements peuvent également présenter des problèmes de toxicité, notamment chez les patients fragiles, ce qui souligne le besoin urgent de développer de nouvelles alternatives thérapeutiques plus efficaces, moins toxiques et abordables (Sardi et al., 2013).

Introduction

Dans ce contexte, la présente étude vise à explorer de nouvelles approches pour améliorer l'efficacité des agents antifongiques contre les infections à *C. albicans*. L'objectif est de développer des formulations innovantes qui combinent des agents antifongiques conventionnels avec des polymères hydrophiles tels que le polyéthylène glycol (PEG), afin de surmonter les limitations des traitements existants. Le PEG est largement utilisé dans de nombreux domaines, notamment la médecine, en raison de ses excellentes propriétés. Il est non toxique, ce qui le rend sûr pour une utilisation en contact avec le corps humain. De plus, il est non volatil, non inflammable, biodégradable et peu coûteux, ce qui en fait un matériau polyvalent et très apprécié dans diverses industries, notamment dans le domaine médical (Haryanto et al., 2018; Thanh et al., 2020).

La problématique centrale de cette étude est donc la suivante : Comment améliorer l'efficacité des agents antifongiques contre *C. albicans* en utilisant des formulations combinant des antifongiques conventionnels avec des polymères hydrophiles tels que le PEG? Cette problématique se décline en plusieurs questions de recherche, telles que l'effet de la combinaison de ces agents sur l'activité antifongique, les mécanismes d'action sous-jacents, les interactions moléculaires impliquées et l'impact de ces nouvelles formulations sur la résistance des souches fongiques.

Pour répondre à ces questions, une approche multidisciplinaire sera adoptée, combinant des études expérimentales *in vitro* et des simulations de dynamique moléculaire. Cette approche permettra d'explorer les interactions physico-chimiques entre les agents antifongiques et les polymères hydrophiles, de comprendre les mécanismes d'action impliqués et d'évaluer l'efficacité de ces nouvelles formulations contre *C. albicans*.

En résumé, cette étude vise à contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre les infections fongiques en améliorant l'efficacité des agents antifongiques grâce à l'utilisation de formulations innovantes. Les résultats de cette recherche pourraient avoir un impact significatif sur la prise en charge des patients atteints d'infections fongiques, en offrant des options de traitement plus efficaces et mieux tolérées.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

1. Matériel et méthodes

1.1 Objectifs de travail

L'objectif de notre étude est de démontrer l'effet antifongique et antibiofilm de deux agents antifongiques, à savoir la terbinafine et la nystatine, lorsqu'ils sont combinés avec le polyéthylène glycol 2000 (PEG2000), vis-à-vis des souches de référence et cliniques de *Candida albicans*.

1.2 Date et lieu de travail

La démarche expérimentale de cette étude a été menée du 19 février 2023 au 16 mars 2023, au sein du laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Ibn Khaldoun-Tiaret.

1.3 Produits et appareillage

L'ensemble des milieux de cultures utilisés, produits et appareils sont cités dans le tableau 1.

Tableau 1: Matériels et produits utilisés au laboratoire.

Appareils	Verreries et Autre	Produits chimiques	Milieux de cultures
-Agitateur magnétique thermique (STUART) + (Kira)	-Becher	-Acide acétique	-Sabouraud bouillon
-Etuve (Rostfrei 37C°)	-Tubes à essais	-Méthanol	-Gélose
-Four pasteur	-Boîtes de pétri	-Ethanol	Sabouraud
-Vortex (vibrofixe électronique VFI)	-Lames	-Huile d'immersion	-Gélose Sabouraud
-Balance électrique (Kern)	-Lamelles	-Solvant	Chloramphénicol
-Bain marie	-Embouts	-Eau physiologique	Actidione
-Microscope optique (B350Optika)	-Tubes eppendorfs	-Violet de Gentiane	
-Bec Bunsen	-Anse de platine	-Bleu de méthylène	
	-Pipettes Pasteur	-Eau distillée stérile	
	-Microplaques à 96 puits	-Polyéthylène glycol 2000 (PEG2000)	
		-Terbinfine hydrochloride	
		-Nystatine	
		-Tréphenyl-terazolium Chloride	

Matériel et méthodes

-Autoclave (Sanoclav) -Micropipettes (10/100/1000µl) -Spectrophotomètre (Jenway7305) -Spectrophotomètre lecteur de microplaques (ELX800 Universel Microplate Reader)			
--	--	--	--

1.4 Origine des souches testées

Pour l'étude du pouvoir antifongique et antibiofilm, nous avons utilisé deux souches de référence de *C. albicans* ATCC (10231 et 12037) ainsi que quatre souches cliniques. Ces souches cliniques ont été isolées et identifiées en 2022 à partir des muqueuses buccales (voir tableau 2). Les souches ont été conservées à -4 °C dans un milieu contenant du glycérol et du Bouillon Sabouraud (50%). Pour leur réactivation, elles ont été repiquées sur une gélose SCA, puis observées macroscopiquement et microscopiquement afin de vérifier leur pureté.

Tableau 2: Souches utilisées de *C. albicans*.

Souches		Origine	Code
Isolées	<i>C. albicans</i>	Muqueuse buccale	CA1
	<i>C. albicans</i>	Muqueuse buccale	CA2
	<i>C. albicans</i>	Muqueuse buccale	CA3
	<i>C. albicans</i>	Muqueuse buccale	CA4
Référénciées	<i>C. albicans</i>	ATCC10231	M3
	<i>C. albicans</i>	ATCC12037	CA

Matériel et méthodes

1.5 Protocole expérimentale

Le protocole expérimental de cette étude est représenté dans le schéma suivant :

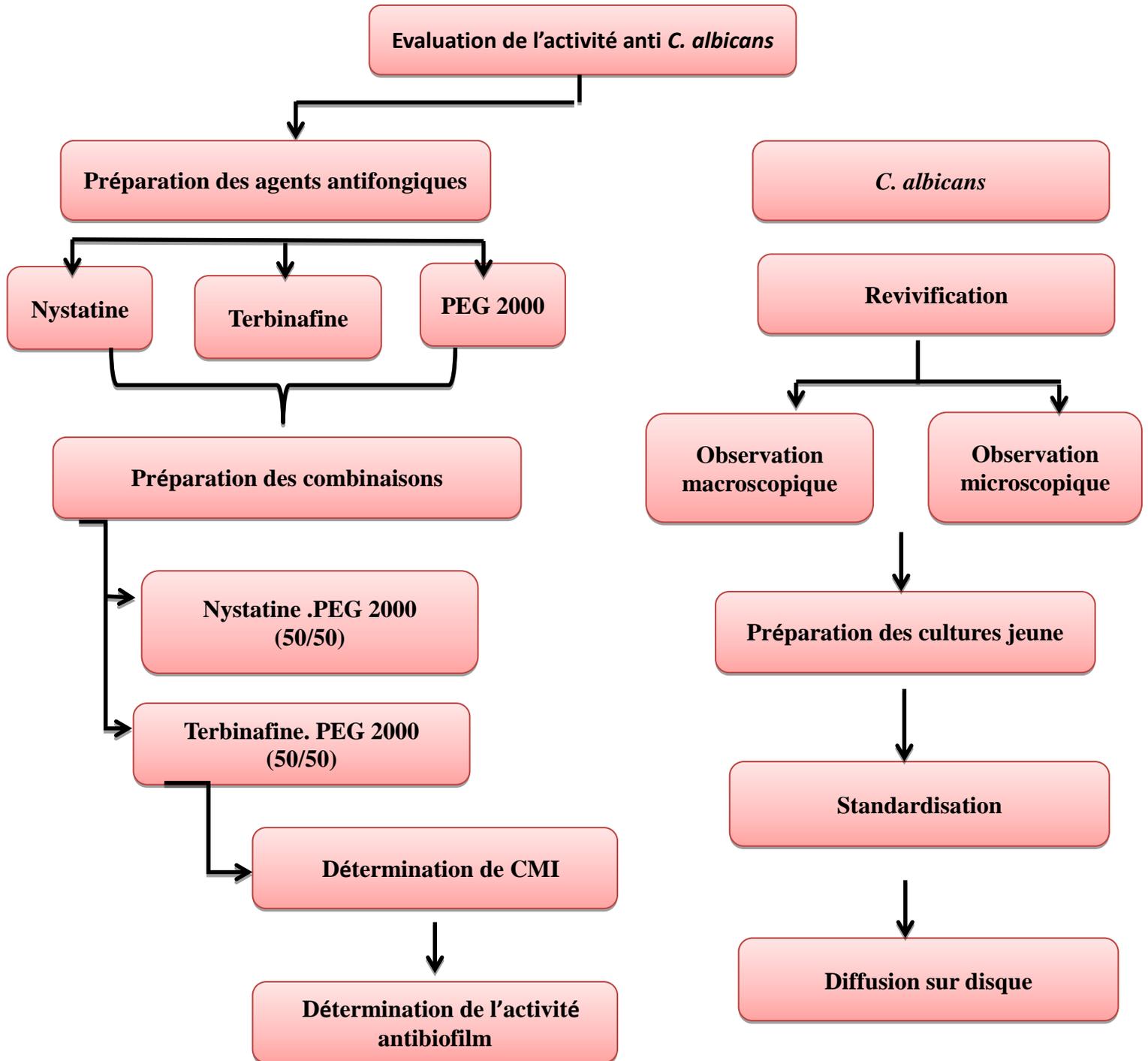


Figure 1: Schéma du protocole expérimental.

1.6 Évaluation de l'activité antibiofilm

1.6.1 La standardisation

À partir d'une culture pure de *C. albicans*, des suspensions de levures ont été préparées dans le bouillon Sabouraud, puis incubées à 37 °C pendant 18 h. Après le temps d'incubation, les solutions ont été diluées pour obtenir une concentration cellulaire de 1 à 1.5 x 10⁶ UFC par spectrophotométrie d'absorbance UV-visible à une longueur d'onde de 630 nm. La densité optique de chaque échantillon a été mesurée en ajustant la suspension de manière à obtenir une DO₆₃₀ égale à 0,15 (Mendoza-Juache et al., 2017).

1.6.2 Antibiogramme

L'examen a été réalisé selon la méthode de diffusion en milieu solide décrite par Salehei et al. (2012). Cette technique consiste à ensemencer par écouvillonnage l'inoculum standardisé en surface du milieu Sabouraud. Des disques de Nystatine (50 µg), Terbinafine (30 µg) et PEG2000 (50 µl) (solution 1 mg/ml) ont été déposés sur la gélose préalablement ensemencée, puis laissés incuber à 37 °C pendant 24 h. Chaque test a été répété deux fois pour chaque agent antifongique. Après le temps d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et enregistrés et la sensibilité des souches a été interprétée selon les critères de Rosco (2011).

1.6.3 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques (CMI)

Les CMI ont été effectuées selon la méthode de microdilution sur des microplaques en polystyrène à 96 puits (Seddiki et al., 2015). En bref, 100 µl de bouillon Sabouraud ont été ajoutés à chaque puits de la microplaque, puis 100 µl de solution antifongique (terbinafine/nystatine) ont été ajoutés au premier puits à une concentration finale de 128 µg/ml. À partir du premier puits, une série de dilutions en cascade de 1/2 a été réalisée de puits en puits, pour obtenir des concentrations finales allant de 128 à 0.5 µg/ml. Chaque puits a été ensemencé avec 100 µl de l'inoculum. Pour servir de témoin négatif, un milieu sans inoculum a été placé dans le dernier puits. Les microplaques ont ensuite été scellées et incubées à 37 °C pendant 24 h. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'agent antifongique à laquelle aucune croissance n'a été observée.

Après le temps d'incubation, la croissance fongique a été révélée en ajoutant un indicateur de couleur, le chlorure de triphenyltetrazolium Chloride (TTC), à chaque puits (à une concentration finale de 0.05 %). Après 3 h d'incubation, la présence de cellules vivantes a été révélée par la formation d'un dérivé coloré du formazan (rouge) (Lakhdar et al., 2017).

1.6.4 Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antifongiques en combinaison avec le PEG2000

1.6.4.1 Préparation du conjugué Nystatine/PEG2000 à la fraction molaire (50/50)

Pour une concentration de départ de 1 mg/ml ($C_p = 1\text{mg/mg}$) du conjugué Nyst/PEG

$$\text{On a: } \frac{m_A + m_B}{V} = 1\text{mg/ml} \rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$$

Tel que :

m_A : c'est la masse de l'antifongique (Nystatine) en mg.

m_B : c'est la masse du PEG-2000 en mg.

Pour réaliser un volume de 4 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 4 = 4\text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \rightarrow n_A = X_A (n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATF (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles).

$$n_A - X_A \times n_A = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - X_A \times n_A}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Nystatine de masse molaire : $M_A = 926,1\text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire: $M_B = 2000\text{ g/mol}$.

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

$$\text{On définit } W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Ce qui revient à dire $m_B = m_A \times W$

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$m_A + m_A \times W = 4 \Rightarrow m_A (1 + W) = 4$$

$$m_A = \frac{4}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} m_A = \frac{4}{1+W} \\ m_B = 4 - m_A \end{cases}$$

Matériel et méthodes

Donc pour réaliser une solution mère de 1mg/ml du conjugué; dans un volume total de 4 ml de DMSO, une quantité déterminée en mg de PEG-2000 et de Nystatine (tableau 3) a été ajoutée.

Tableau 3: Les masses respectives à la fraction molaires 50/50 du conjugué Nyst/PEG.

Fraction molaire (Nyst/PEG)	50/50
m (PEG-2000) (mg)	2.73
m (Nystatine) (mg)	1.27

1.6.4.2 Préparation du conjugué Terb/PEG2000 à la fraction molaire (50/50)

Pour une concentration de départ de 1 mg/ml ($C_p = 1\text{mg/ml}$) du conjugué Terb/PEG

On a: $\frac{m_A + m_B}{V} = 1\text{mg/ml} \rightarrow m_A + m_B = 1 \times V$

Tel que :

m_A : c'est la masse de l'antifongique (Terbinafine hydrochloride) en mg

m_B : c'est la masse du PEG-2000 en mg.

Pour réaliser un volume de 4 ml de la solution finale notre équation devient alors :

$$m_A + m_B = 1 \times 4 = 8\text{ mg} \rightarrow (1)$$

Maintenant par définition de la fraction molaire :

$$X_A = \frac{n_A}{n_A + n_B} \rightarrow n_A = X_A (n_A + n_B)$$

n_A : le nombre de moles de l'ATF (moles).

n_B : le nombre de moles PEG-2000 (moles).

$$n_A - X_A \times n_A = X_A \times n_B$$

$$n_B = \frac{n_A - X_A \times n_A}{X_A} = n_A \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

Maintenant passons des nombres de moles vers les masses :

Soit notre antifongique est le Nystatine de masse molaire : $M_A = 327,9\text{ g/mol}$

Pour le PEG sa masse molaire: $M_B = 2000\text{ g/mol}$.

$$\frac{m_B}{M_B} = \frac{m_A}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right) \rightarrow m_B = m_A \times \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$$

On définit $W = \frac{M_B}{M_A} \left(\frac{1}{X_A} - 1 \right)$

Ce qui revient à dire $m_B = m_A \times W$

Matériel et méthodes

Revenant maintenant à notre équation (1) :

$$mA + mA \times W = 4 \Rightarrow mA (1 + W) = 8$$

$$mA = \frac{8}{1 + W}$$

$$\text{Donc en fin : } \begin{cases} mA = \frac{8}{1+W} \\ mB = 8 - mA \end{cases}$$

Donc pour réaliser une solution mère de 1mg/ml du conjugué; dans un volume total de 8 ml de DMSO, une quantité déterminée en mg de PEG-2000 et de Terbinafine (tableau 4) a été ajoutée.

Tableau 4: masses respectives à la fraction molaires 50/50 du conjugué Terb/PEG.

Fraction molaire (Terb/PEG)	50/50
m (PEG-2000) (mg)	6.87
m (Terbinafine) (mg)	1.13

L'effet antifongique des deux conjugués a été testé par la méthode de microdilution, et les CMI's ont été mesurées en suivant la même approche que celle adoptée précédemment. À partir des solutions préparées (Nyst/PEG) (Terb/PEG), 100 µl ont été ajoutés au premier puits, sur lequel 100 µl de bouillon Sabouraud ont été ajoutés pour obtenir une concentration finale de 128 µg/ml. Ensuite, des dilutions en cascade de 1/2 ont été effectuées de puits en puits afin d'obtenir des concentrations finales allant de 128 à 0.5 µg/ml.

1.6.5 Évaluation de l'activité antibiofilm

1.6.5.1 Détermination des taux de réduction des biofilms (TR)

La mesure des taux de réduction a été effectuée selon la méthode de microdilution décrite précédemment. Dans chaque puits de la microplaque, nous avons ajouté 100 µl de bouillon Sabouraud. Au puits n°1, nous avons ajouté 100 µl de chaque agent antifongique (nystatine, terbinafine, Terb/PEG et Nyst/PEG). Après homogénéisation, nous avons prélevé 100 µl du premier puits et les avons transférés dans le deuxième puits, et ainsi de suite jusqu'au dixième puits, ce qui a permis d'obtenir des concentrations finales allant de 128 à 0.5 µg/ml pour tous les agents. Enfin, nous avons ajouté 100 µl de la suspension fongique standardisée dans chaque puits. Dans le puits n°11, 200 µl de milieu sans inoculum ont été placés pour servir de témoin négatif, tandis que dans le puits n°12, 200 µl de la suspension ont

Matériel et méthodes

été placés pour servir de témoin positif. Après 48 h d'incubation à 37 °C, un lavage a été effectué avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les cellules non adhérentes.

1.6.5.2 Quantification des biofilms

Le principe de cette méthode consiste à colorer les biofilms avec du violet de gentiane. En bref, 100 µl de violet de gentiane ont été ajoutés dans chaque puits et incubés pendant 20 min. Ensuite, les microplaques ont été rincées quatre fois pour éliminer l'excès de colorant. Ensuite, il a été nécessaire de détacher et de libérer le violet de gentiane lié au biofilm. Pour cela, 100 µl d'éthanol (96 %) ont été ajoutés dans chaque puits. Après une incubation à température ambiante pendant 15 min, notre microplaque était prête pour la lecture sur ELISA à une longueur d'onde de 630 nm. Le taux de réduction (TR) a été calculé en pourcentage d'inhibition selon la formule suivante: (Proškovcová et al., 2021)

$$TR = 100 (1 - (A_{630nm \text{ des biofilms}} / A_{630nm \text{ du control positif}}))$$

A_{630} : densité optique à 630 nm.

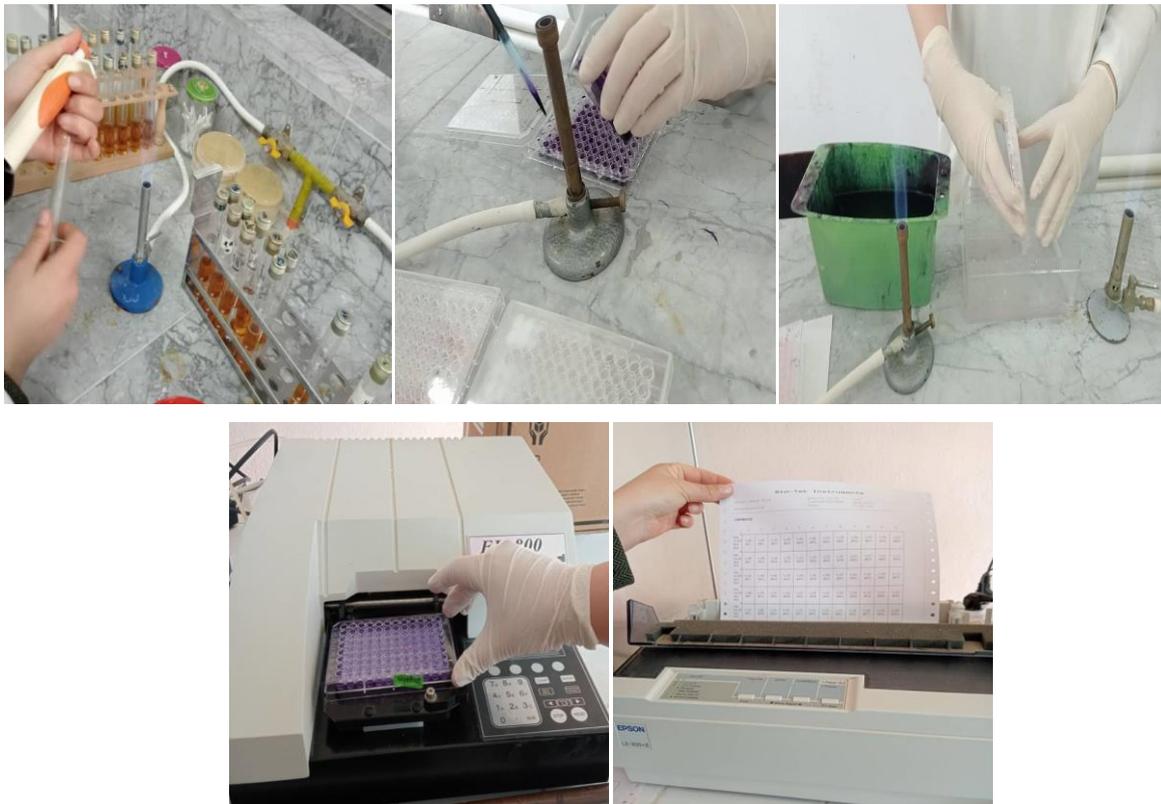


Figure 2: Formation et quantification des biofilms.

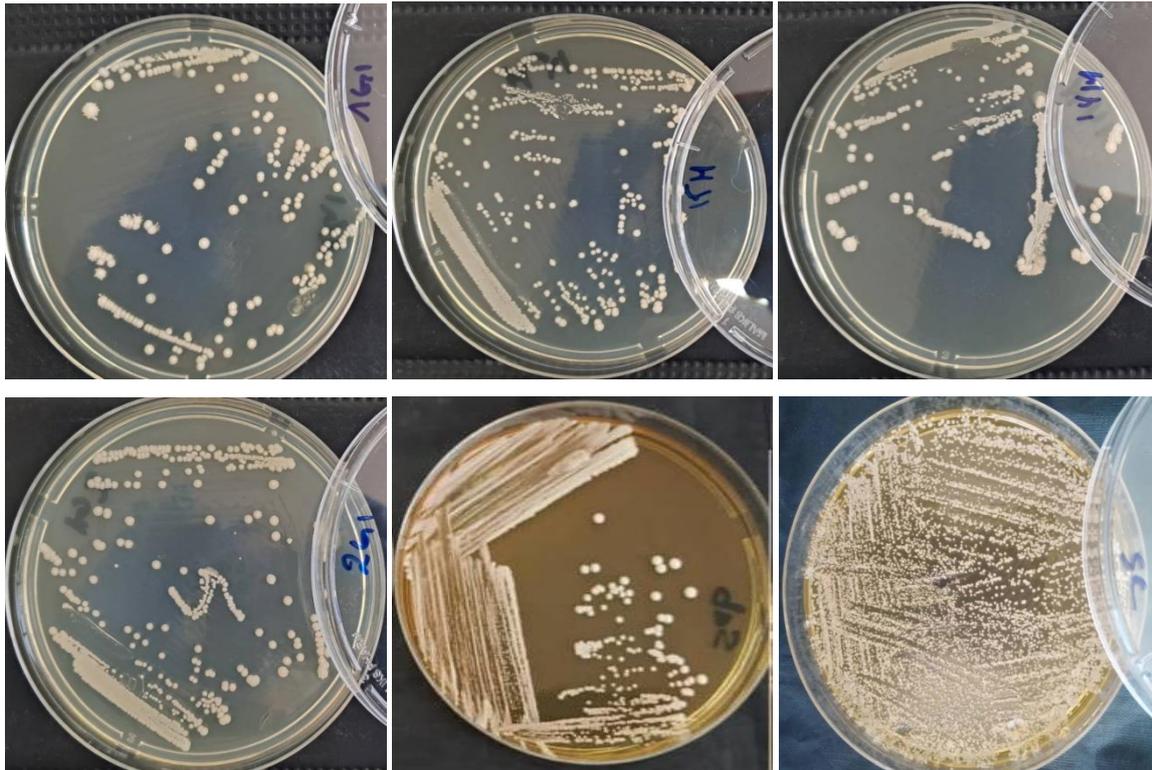
Résultats et discussion

2. Résultats et discussion

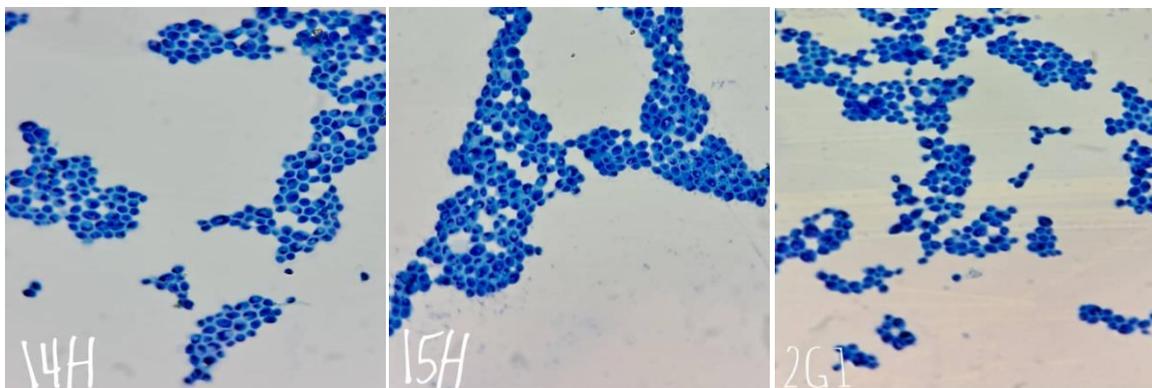
1.7 Vérification de la pureté des souches

L'examen macroscopique des souches a révélé des colonies lisses, crémeuses à blanchâtres, caractéristiques de l'espèce *C. albicans*. L'observation microscopique est similaire pour toutes les souches testées, montrant des cellules de forme ovale et parfois filamenteuses (figure 3).

a- Observations macroscopiques



b- Observations microscopiques



Résultats et discussion

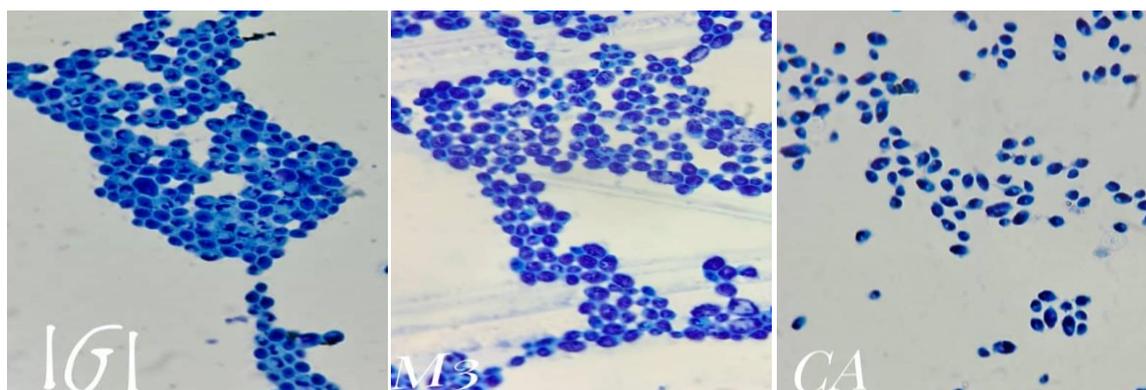


Figure 3: Observations macroscopique et microscopiques des souches testées.

1.8 Evaluation de l'activité antifongique dans les conditions planctoniques

1.8.1 Diffusion sur disque

La sensibilité des levures aux antifongiques a été déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition. Les résultats ont été enregistrés dans le tableau 5. Deux antifongiques ont été utilisés pour ce test, la nystatine s'est révélée être plus efficace avec des zones d'inhibition allant de 23 à 29 mm, suivie par la terbinafine avec des zones d'inhibition allant de 12 à 20 mm. Une sensibilité et sensibilité intermédiaire des souches vis-à-vis les deux antifongiques ont été observées. En revanche, le PEG2000 n'a montré aucun effet sur les souches (figure 4).

Tableau 5: Test de sensibilité des antifongiques vis-à-vis *C. albicans*.

Souches	DZI (mm)					
	Nystatine (50µg/ml)	Interprétation	Terbinafine (30µg/ml)	Interprétation	PEG2000 (50µg/ml)	Interprétation
M3	26,5 ± 0,5	Sensible	18.5 ± 4.5	Intermédiaire	0	Résistante
CA	29 ± 1	Sensible	20 ± 3	Sensible	0	Résistante
CA1	25,5 ± 0,5	Sensible	14 ± 0	Intermédiaire	0	Résistante
CA2	23 ± 2	Sensible	15 ± 0	Intermédiaire	0	Résistante
CA3	26 ± 1	Sensible	15 ± 0	Intermédiaire	0	Résistante
CA4	25 ± 0	Sensible	12 ± 0	Intermédiaire	0	Résistante

DZI : Diamètre des zones d'inhibitions (calculés en moyenne avec écart type).



Figure 4: Diamètre des zones d'inhibition des agents : Nystatine, Terbinafine et PEG2000 vis-à-vis *C. albicans*.

1.8.2 Détermination des CMI

Le tableau 6 représente les CMI obtenues pour les antifongiques (Nyst, Terb) ainsi que les combinaisons antifongiques-PEG2000 (Nyst/PEG et Terb/PEG). Les valeurs des CMI enregistrées pour la Nyst sont comprises entre 4 et 8 $\mu\text{g/ml}$, tandis que celles pour la Terb vont de 8 à 16 $\mu\text{g/ml}$. Ces résultats confirment ceux obtenus par le test de diffusion sur disque. Des CMI significativement plus faibles ont été enregistrées pour la combinaison Nyst-PEG, avec des valeurs deux fois inférieures aux CMI obtenues avec la Nyst seule pour toutes les souches, à l'exception de la souche CA2. Des résultats variables ont été observés pour la combinaison Terb-PEG, à l'exception des souches CA2 et CA3 qui présentent des valeurs plus élevées.

Tableau 6: Tableau représentant les CMI des antifongiques individuels et en combinaison avec le PEG2000.

Souches	CMI ($\mu\text{g/ml}$)					
	Terb	Terb-PEG	Effet	Nyst	Nyst-PEG	Effet
M3	16	32	Indifférent	8	4	Bénéfique
CA	16	16	Indifférent	8	4	Bénéfique
CA1	16	32	Indifférent	8	4	Bénéfique
CA2	16	8	Bénéfique	8	8	Indifférent
CA3	16	8	Bénéfique	4	4	Indifférent
CA4	8	8	Indifférent	8	4	Bénéfique

CMI : Concentration minimal inhibitrice ; Terb : Terbinafine ; Nyst : Nystatine ; PEG : Polyéthylèneglycol.

1.8.3 Etude par dynamique moléculaire des interactions physiques entre les antifongiques et PEG2000

Dans le but de mieux comprendre les interactions physiques entre les différentes combinaisons (Terb-PEG) et (Nyst-PEG) à l'échelle atomique, où les techniques expérimentales conventionnelles présentent souvent des limitations ou sont même impossibles à réaliser, nous avons entrepris une étude computationnelle en utilisant la dynamique moléculaire pour examiner la structure finale. Les différentes interactions ont été décrites par le champ de force PCFF (Polymer Consistent Force field).

Nous avons réalisé des simulations en utilisant le code MS Modeling. Le système a été examiné dans l'ensemble NPT (Nombre d'atomes - Pression - Température constants). Les équations de mouvement ont été intégrées en utilisant l'algorithme de Verlet avec un pas d'intégration de 1 fs pour les interactions intramoléculaires et intermoléculaires. Les dynamiques ont été effectuées à une température de 300 K et à une pression de 1 atm, pour une durée de simulation de 2 ns.

Après avoir atteint l'équilibre énergétique, nos simulations de dynamique moléculaire montrent la formation de plusieurs liaisons hydrogène (4 liaisons d'hydrogène) entre la Nystatine et le PEG, tandis qu'aucune formation de liaison hydrogène n'a été observée pour le composé Terb-PEG (figure 5). Ce processus se déroule à une échelle de temps de quelques nanosecondes. Pour expliquer ce qui s'est passé au niveau atomique dans le système Nyst-PEG, les interactions électrostatiques faibles des liaisons hydrogène intermoléculaires permettent aux molécules de Nystatine et aux chaînes de PEG d'exister en tant que molécules associées. Les effets de ces associations moléculaires se reflètent dans l'augmentation de la taille et de la masse moléculaire du composé chimique, ainsi que dans les propriétés de la molécule Nystatine (son mécanisme d'action) et du PEG (son mécanisme d'action), en plus de l'hydrosolubilité du PEG. Cela explique l'efficacité de cette nouvelle molécule (Nystatine-PEG) sur nos souches étudiées. Malheureusement, cette association moléculaire, garantie par la formation de liaisons hydrogène, n'a pas été observée dans la deuxième combinaison (Terb-PEG), ce qui explique que chaque molécule agira de manière indépendante comme le montre le schéma de la figure 6. Étant donné que le mécanisme d'action du PEG n'est pas suffisant pour lutter contre nos souches étudiées, seul le mécanisme d'action de la terbinafine se manifesterait, expliquant ainsi l'absence de synergie entre ces deux composés.

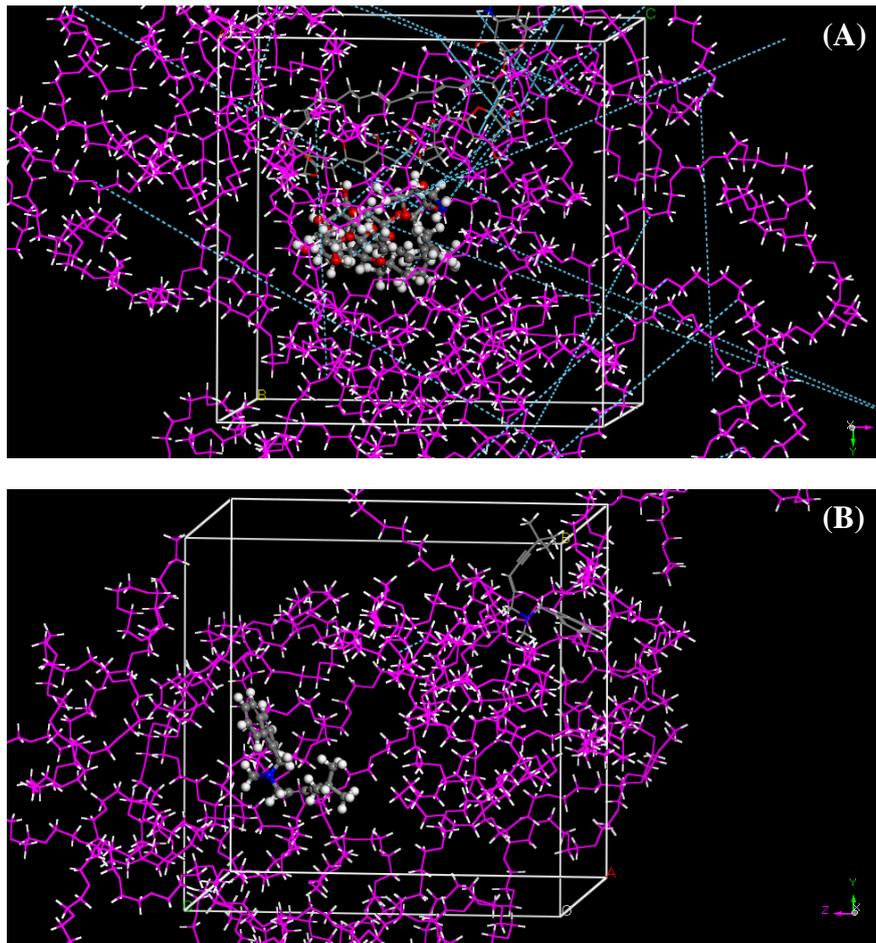
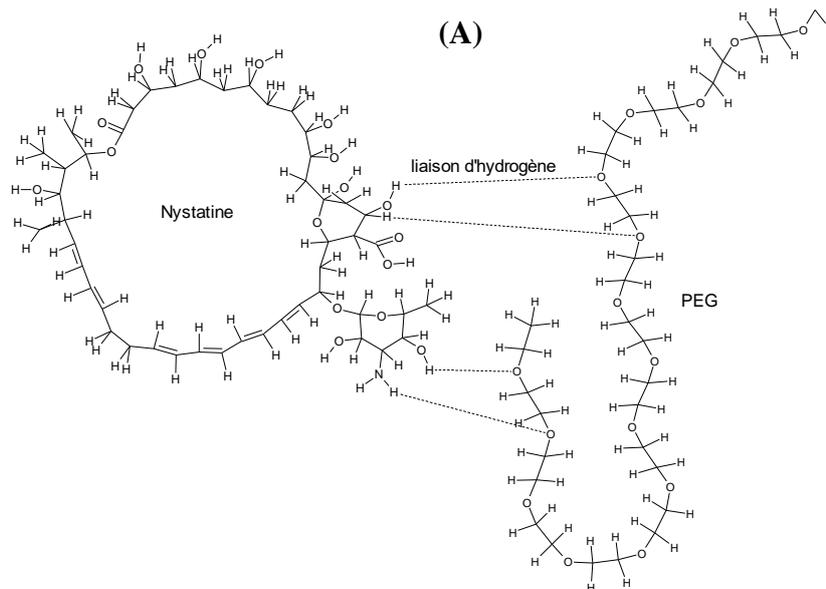


Figure 5: Résultat de l'association moléculaire par liaisons d'hydrogène du module 3D des deux composés (A) Nystatine-PEG et (B) Terbinafine-PEG.



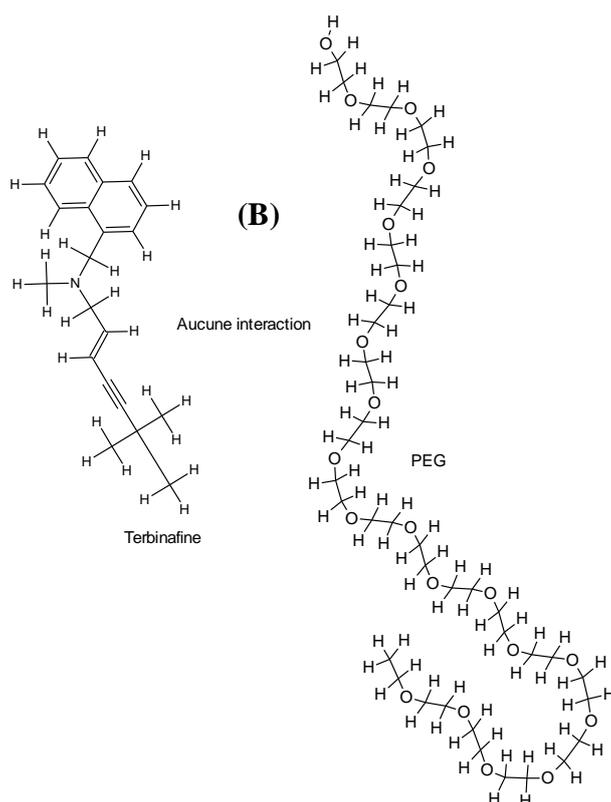


Figure 6: Schéma explicatif de l'association par liaison d'hydrogène des deux composés (A) Nystatine-PEG et (B) Terbinafine-PEG.

1.9 Evaluation de l'activité antifongique dans les conditions biofilms

1.9.1 Détermination du taux de réduction des biofilms

Le tableau 7 représente les taux de réduction de biofilm obtenus pour la combinaison Nyst/PEG2000. On observe une diminution significative de l'effet de tous les agents et combinaisons testés, avec une résistance plus marquée de la forme biofilm par rapport à la forme blastospore. L'agent nystatine seul a enregistré des taux de réduction allant de 29 à 52% à une concentration de 8 $\mu\text{g/ml}$, tandis que l'association de la nystatine avec le PEG a donné des taux plus élevés, allant de 38 à 56%. Le PEG a semblé renforcer l'effet de l'antifongique nystatine.

Tableau 7: Taux de réduction des biofilms après traitement avec l'antifongique nystatine seule et en combinaison avec le PEG2000.

Souches		Taux de réduction en %				
		8 $\mu\text{g/ml}$	16 $\mu\text{g/ml}$	32 $\mu\text{g/ml}$	64 $\mu\text{g/ml}$	128 $\mu\text{g/ml}$
M3	Nys	52	53	55	56	59
	Nys-PEG	56	56	58	59	59
CA	Nys	41	46	51	57	58
	Nys-PEG	52	55	57	59	59
CA1	Nys	39	43	52	58	61

Résultats et discussion

	Nys-PEG	43	47	56	61	64
CA2	Nys	41	42	50	54	58
	Nys-PEG	48	50	53	55	57
CA3	Nys	29	35	48	52	55
	Nys-PEG	38	45	49	53	55
CA4	Nys	45	50	54	55	59
	Nys-PEG	45	54	57	59	61

Le tableau 08 représente les taux de réduction de biofilm obtenus pour la combinaison Terb/PEG2000. Selon les résultats, l'effet de la terbinafine est moins marqué sur la forme sessile de *C. albicans*, avec un taux de réduction du biofilm compris entre 38 et 49% à une concentration de 16 µg/ml. La combinaison avec le PEG a donné des taux moins significatifs, allant de 34 à 47%. Le PEG n'a pas semblé influencer l'effet de l'antifongique terbinafine.

Tableau 8: Taux de réduction des biofilms après traitement avec l'antifongique terbinafine seul et en combinaison avec le PEG2000.

Souches		Taux de réduction en %				
		8 µg/ml	16 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml	128 µg/ml
M3	Terb	41	43	50	55	57
	Terb-PEG	23	34	41	45	46
CA	Terb	37	38	47	50	52
	Terb-PEG	26	38	35	43	46
CA1	Terb	35	48	52	54	56
	Terb-PEG	38	41	45	53	56
CA2	Terb	36	47	50	53	53
	Terb-PEG	39	42	43	51	58
CA3	Terb	39	46	48	49	51
	Terb-PEG	34	41	47	50	53
CA4	Terb	44	49	50	53	55
	Terb-PEG	41	47	47	50	52

Les résultats des taux d'inhibition de la nystatine et de la terbinafine, ainsi que leur combinaison avec le PEG2000, vis-à-vis des souches de référence et des souches isolées, sont présentés dans les figures 2 et 3. Il ressort de ces graphiques que la combinaison Nys-PEG présente un taux d'inhibition plus élevé que celui de la nystatine seule. En revanche, la combinaison Terb-PEG a montré des résultats indifférents, avec des taux de réduction moins importants. Il est également important de noter que l'effet du PEG change, et son effet devient indifférent en présence de concentrations élevées de nystatine.

Résultats et discussion

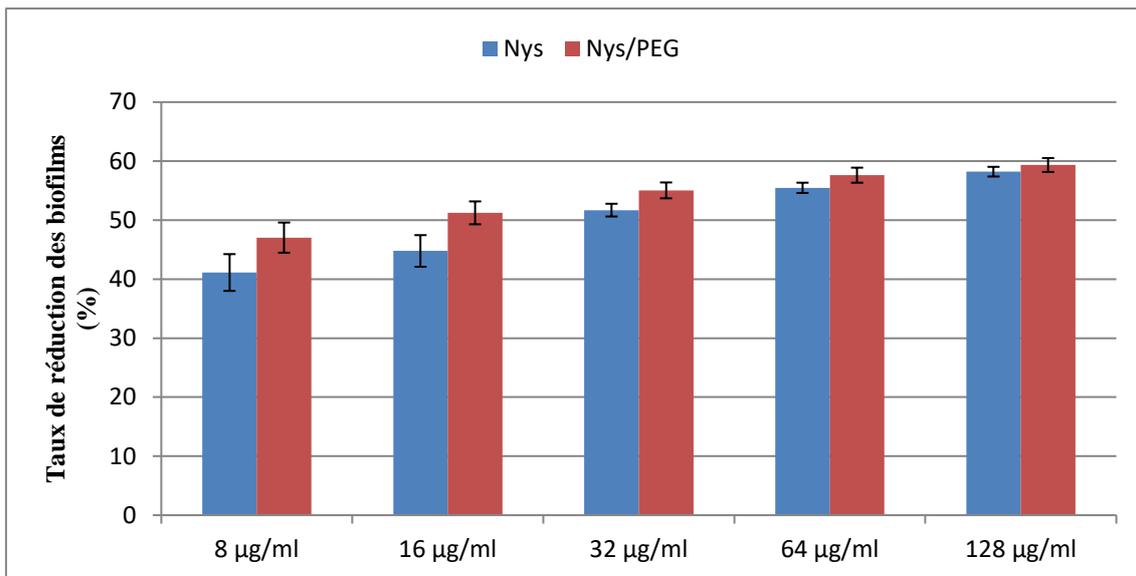


Figure 7: Taux de réduction des biofilms vis-à-vis les souches de *C. albicans* présenté en pourcentage; Comparaison entre l'effet de l'antifongique Nystatine seul et combiné avec le PEG2000.

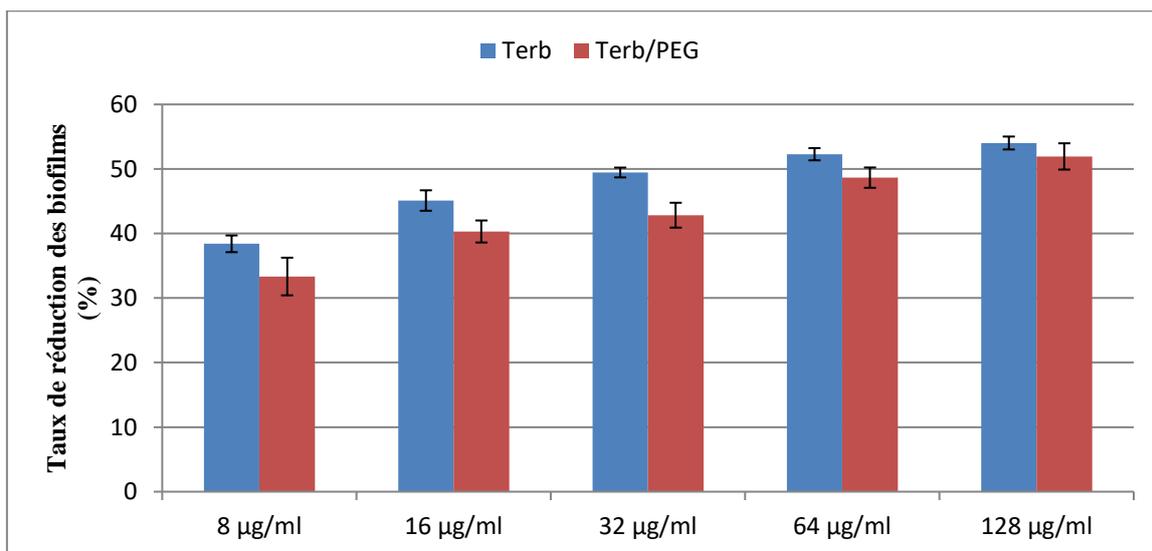


Figure 8: Taux de réduction des biofilms vis-à-vis des souches de *C. albicans* présenté en pourcentage; Comparaison entre l'effet de l'antifongique Terbinafine seul et combiné avec le PEG2000.

Discussion

3. Discussion

Afin d'évaluer l'activité antifongique des agents Nystatine et Terbinafine contre des souches de *C. albicans* isolées à partir des muqueuses buccales, des tests de sensibilité, notamment l'antibiogramme par la méthode de diffusion sur disque, ont été réalisés. Ces tests ont révélé une sensibilité de toutes les souches envers la Terbinafine et la Nystatine, avec une efficacité supérieure pour cette dernière. Ces résultats ont été corroborés par des tests de mesure des concentrations minimales inhibitrices (CMI), qui ont montré des valeurs plus élevées pour la Nystatine (CMI de 4-8 µg/ml) par rapport à la Terbinafine (CMI de 8-16 µg/ml). Dans une autre étude menée par Sharafutdinov et al. (2020) sur des souches isolées des cavités buccales, une sensibilité modérée a été observée envers les deux antifongiques, avec des CMI de 2-32 µg/ml pour la Terbinafine et de 2-16 µg/ml pour la Nystatine.

Cette étude vise à tester une nouvelle combinaison entre des antifongiques et un polymère hydrophile afin d'améliorer leur efficacité. Les résultats obtenus pour l'activité antifongique du conjugué PEG-ATF sur les cellules planctoniques de *C. albicans* ont révélé que la formulation PEG-Nyst présentait un effet plus prometteur, avec des CMI de 4 à 8 µg/ml, inférieurs à ceux obtenus pour la Nystatine seule. Cette amélioration peut s'expliquer par la synergie établie entre les deux agents. Une simulation de dynamique moléculaire a été réalisée pour comprendre comment l'association intermoléculaire s'est déroulée à l'échelle atomique. La figure 6 montre que plusieurs liaisons hydrogènes ont fortement lié les deux molécules, ce qui a uni leurs actions individuelles et a rendu cette nouvelle molécule chimique plus efficace contre les cellules de *C. albicans*. Ainsi, la combinaison de la Nystatine et du PEG a démontré l'importance de ce dernier pour améliorer l'effet thérapeutique de l'antifongique, peut-être en augmentant la perméabilité.

Dans une autre étude menée par Valéry (2013), il a été démontré qu'il était possible de former de nouvelles molécules d'antifongiques encapsulées dans une matrice polymérique de polyester et de polyéthylène glycol (PLA-g-PEG) afin de résoudre les problèmes de taux de dissolution et d'absorption de l'agent antifongique. Le PEG, grâce à sa propriété hydrophile présente en surface des nanoparticules, jouait un rôle de répulsion aux protéines, ce qui réduisait leur exposition aux phagocytoses.

L'étude de l'activité antibiofilm a révélé que les CMI obtenues dans notre étude pour les deux antifongiques ne semblent pas être très efficaces contre la forme biofilm de *C. albicans*. Les taux de réduction des biofilms varient entre 38 et 56% pour la Nystatine et entre 34 et 47% pour la Terbinafine. Selon plusieurs études, cette résistance des biofilms est en grande partie associée à la présence de la matrice extracellulaire, qui constitue une barrière

Discussion

physique empêchant la diffusion et le transport des agents antimicrobiens à travers le biofilm pour atteindre les cellules microbiennes (Madoda, 2014).

Cependant, l'amélioration de l'efficacité des antifongiques est liée à leur capacité de diffusion à l'intérieur des biofilms. La combinaison Nystatine-PEG a montré des taux de réduction plus importants par rapport à la Nystatine seule. Ces résultats suggèrent que le PEG a joué un rôle important dans la diffusion de la Nystatine à l'intérieur du biofilm. Une autre hypothèse à considérer concerne le mode de vie au sein d'un biofilm, qui repose sur la présence de canaux aqueux assurant la disponibilité des nutriments pour les micro-organismes. Cependant, la diffusion des antifongiques, en tant qu'agents hydrophobes, semble être défavorisée. Le PEG, en s'associant à l'agent antifongique, peut lui conférer des caractéristiques hydrophiles, favorisant ainsi sa diffusion à travers les canaux aqueux du biofilm (Mutschler, 2017; Valéry, 2013)

En revanche, la formulation PEG-Terb a montré un effet indifférent avec des CMI moins importantes allant de 8 à 32 $\mu\text{g/ml}$, ainsi que des taux de réduction de biofilm moins significatifs par rapport aux résultats obtenus avec la Terbinafine seule. Cela peut s'expliquer par l'absence d'association entre les deux molécules, comme le montre la figure où aucune liaison d'hydrogène n'a été observée. Ces résultats indiquent que les deux molécules agissent de manière indépendante et que l'effet inhibiteur du biofilm est uniquement dû à l'action de la Terbinafine.

Conclusion

Conclusion

Conclusion

Les infections fongiques sont devenues des affections très dangereuses, leur fréquence augmentant de façon considérable ces dernières années en raison du nombre croissant de patients immunodéprimés et d'interventions médico-chirurgicales. Le problème de la résistance des souches fongiques aux traitements reste un défi majeur, incitant de nombreux chercheurs à déployer tous leurs efforts pour développer de nouveaux agents antifongiques non toxiques et plus efficaces.

Dans cette étude, nous avons testé l'activité antifongique *in vitro* de deux conjugués, PEG2000-nystatine et PEG2000-terbinafine, dans le but de trouver des alternatives aux antifongiques conventionnels. Ces conjugués ont été choisis en raison de leur disponibilité en Algérie ainsi que de leur large spectre d'action contre les souches fongiques, en particulier *C. albicans*. Nous avons obtenu des résultats préliminaires sur l'efficacité du polymère polyéthylène glycol (PEG) qui pourraient ouvrir la voie au développement et à l'amélioration de nouvelles formulations ayant un effet inhibiteur plus puissant contre différents champignons.

Dans le but de mieux comprendre les interactions physiques entre ces combinaisons (Terb-PEG) et (Nyst-PEG) à l'échelle atomique, nous avons entrepris une étude computationnelle utilisant la dynamique moléculaire avec le champ de force PCFF (Polymer Consistent Force field). Les simulations ont révélé la formation de liaisons hydrogène entre la Nystatine et le PEG, tandis que la combinaison Terb-PEG n'a montré aucune formation de liaison hydrogène. Ces résultats mettent en évidence l'importance des interactions moléculaires spécifiques dans l'efficacité des formulations.

Notre étude confirme que la combinaison Nyst-PEG présente une synergie entre les deux molécules, ce qui conduit à une augmentation de l'efficacité par rapport à l'utilisation de la Nystatine seule. Les simulations de dynamique moléculaire ont permis de visualiser les interactions atomiques entre la Nystatine et le PEG, notamment les liaisons hydrogène, qui renforcent l'efficacité de la nouvelle molécule Nyst-PEG contre les souches étudiées. En revanche, la combinaison Terb-PEG n'a pas montré de synergie, chaque molécule agissant de manière indépendante.

Ces résultats soulignent l'importance des interactions moléculaires spécifiques entre les antifongiques et les polymères, et mettent en évidence le potentiel du PEG2000-nystatine en tant que formulation améliorée pour le traitement des infections fongiques. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour approfondir notre compréhension des mécanismes

Conclusion

d'action et des interactions au sein des biofilms fongiques, afin de développer des stratégies plus efficaces pour lutter contre ces infections.

Références bibliographiques

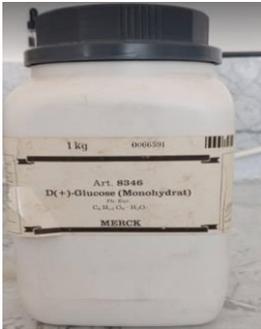
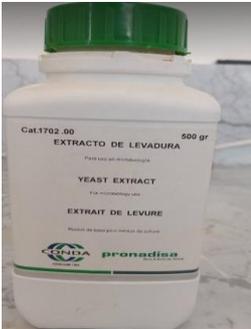
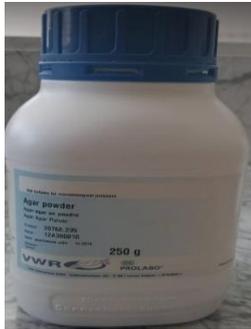
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Dupont, B. (2006). Utilisation des antifongiques topiques. *Thérapie*, 61(3), 251–254. <https://doi.org/10.2515/therapie:2006041>
- Garnaud, C., & Cornet, M. (2020). Membrane et paroi fongiques : des rôles clés dans la résistance aux antifongiques. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2020(519), 50–58. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(20\)30062-9](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(20)30062-9)
- Haryanto, Fani, & Mahardian, A. (2018). Biocompatible Hydrogel Film of Polyethylene Oxide-Polyethylene Glycol Dimetacrylate for Wound Dressing Application. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 288(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/288/1/012076>
- Lakhdar, L., Farah, A., Lahlou, I., Rida, S., Bouziane, A., & Ennibi, O. (2017). Antibacterial Effectiveness of Selected Moroccan Essential Oils Against the Highly Virulent Jp2 Clone of Aggregatibacter Actinomycetemcomitans. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(2), 47. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i2.13406>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- Madoda, D. (2014). *Étude de l'effet d'agents potentiellement perturbateurs de la structure des biofilms sur la diffusion des macromolécules dans les biofilms de Streptococcus mutans: cas de l'EDTA et de l'aspirine.*
- Mendoza-Juache, A., Aranda-Romo, S., Bermeo-Escalona, J. R., Gómez-Hernández, A., Pozos-Guillén, A., & Sánchez-Vargas, L. O. (2017). The essential oil of *Allium sativum* as an alternative agent against *Candida* isolated from dental prostheses. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34(3), 158–164. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2016.11.008>
- Mukherjee, P. K., & Chandra, J. (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug Resistance Updates*, 7(4–5), 301–309. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2004.09.002>
- Mutschler, A. (2017). *UNIVERSITÉ DE STRASBOURG Nouveaux concepts de revêtements antimicrobiens à base de peptides naturels et de polypeptides appliqués aux dispositifs médicaux. 1121.*
- Petosa, C., Govin, J., & Mietton, F. (2018). Champignons pathogènes: Un nouvel espoir de traitement des infections généralisées. *Medecine/Sciences*, 34(2), 123–125. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183402007>

- Proškovcová, M., Čonková, E., Váczi, P., Harčárová, M., & Malinovská, Z. (2021). Antibiofilm activity of selected plant essential oils from the lamiaceae family against candida albicans clinical isolates. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 28(2), 260–266. <https://doi.org/10.26444/aaem/135892>
- Rosco. (2011). Susceptibility Testing of Yeasts 2011: Agar Diffusion Method. *Rosco Diagnostica*, 2–5.
- Salehei, Z., Seifi, Z., & Mahmoudabadi, A. Z. (2012). Sensitivity of vaginal isolates of Candida to eight antifungal drugs isolated from Ahvaz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 5(4), 574–577. <https://doi.org/10.5812/jjm.4556>
- Sardi, J. C. O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes Giannini, M. J. S. (2013). Candida species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 62(PART1), 10–24. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.045054-0>
- Seddiki, S. M. L., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., & Kunkel, D. (2015). Infectivités fongiques des cathéters implantés dues à Candida sp. Formation des biofilms et résistance. *Journal de Mycologie Médicale*, 25(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.03.003>
- Sharafutdinov, I. S., Ozhegov, G. D., Sabirova, A. E., Novikova, V. V., Lisovskaya, S. A., Khabibrakhmanova, A. M., Kurbangalieva, A. R., Bogachev, M. I., & Kayumov, A. R. (2020). Increasing Susceptibility of Drug-Resistant Candida albicans to Fluconazole and Terbinafine by 2(5H)-Furanone Derivative. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030642>
- Thanh, T., Thi, H., Pilkington, E. H., Nguyen, D. H., & Lee, J. S. (2020). The Importance of Poly (ethylene glycol) Alternatives for Overcoming PEG Immunogenicity in Drug. *Polymers*, 12(2), 298.
- Turan, H., & Demirbilek, M. (2018). Biofilm-forming capacity of blood-borne Candida albicans strains and effects of antifungal agents. *Revista Argentina de Microbiologia*, 50(1), 62–69. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.05.003>
- Uppuluri, P., & Lopez Ribot, J. L. (2017). Candida albicans biofilms. *Candida Albicans: Cellular and Molecular Biology: Second Edition*, 18(5), 63–75. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4_5
- Valéry, A. (2013). *Développement de nouvelles formulations d ' antifongiques et évaluation de l ' activité sur Candida spp . et Aspergillus spp .* 201.

Annexes

Annexe 1: Produits utilisés.

		
<p>PEG 2000</p>	<p>DMSO</p>	<p>Bleu de méthylène</p>
		
<p>Peptone</p>	<p>Terbinafine</p>	<p>Nystatine</p>
		
<p>Glucose</p>	<p>Extrait de levure</p>	<p>Agar</p>

Annexe 2: Equipement de laboratoire.

		
<p>Microscope</p>	<p>Spectrophotometre UV – visible</p>	<p>vortex</p>
		
<p>Elisa</p>	<p>Etuve</p>	<p>Balance</p>
		
<p>Agitateur magnétique thermique</p>	<p>Bain marie</p>	<p>Autoclave</p>

Annexe 3: Compositions des milieux de cultures utilisées.

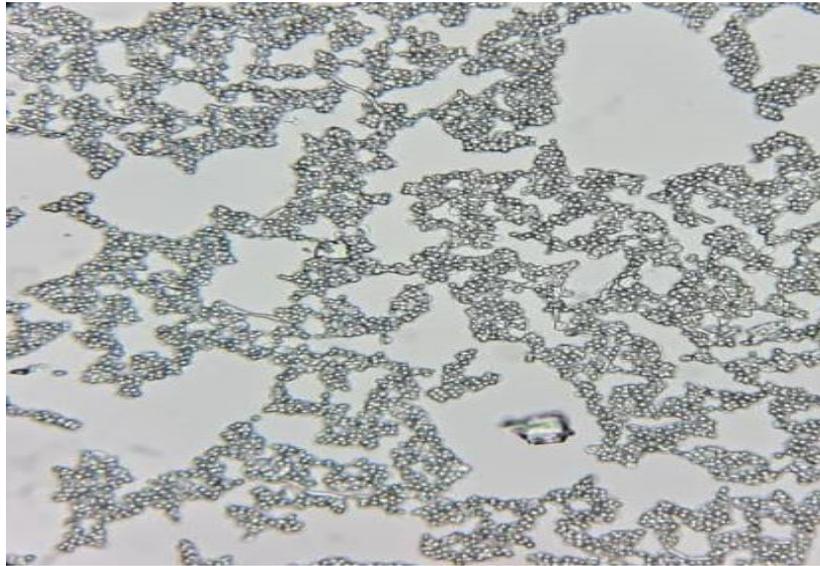
➤ Milieu Yeast Peptone dextrose

Peptone.....	20g
Glucose (dextrose).....	20g
Extrait de levure.....	10g
L'eau distillée stérile.....	1000ml

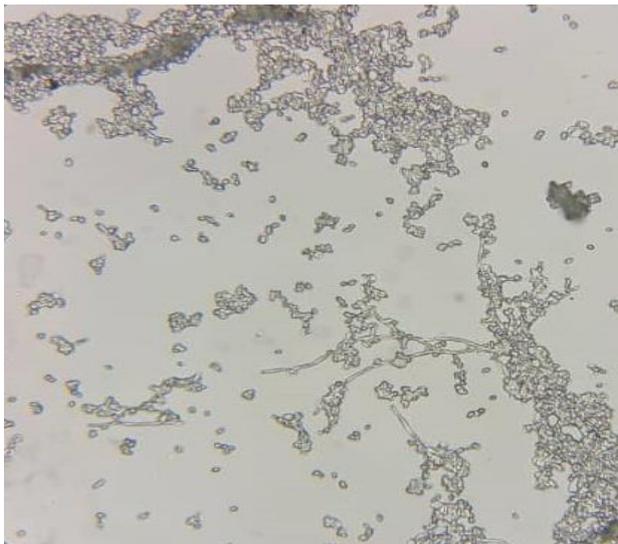
➤ Milieu Sabouraud

Peptone.....	10 g
Glucose.....	40 g
Agar agar.....	15 g
Actidione.....	0.5 g
Chloramphenicol.....	0.5 g
L'eau distillée stérile.....	1000 ml

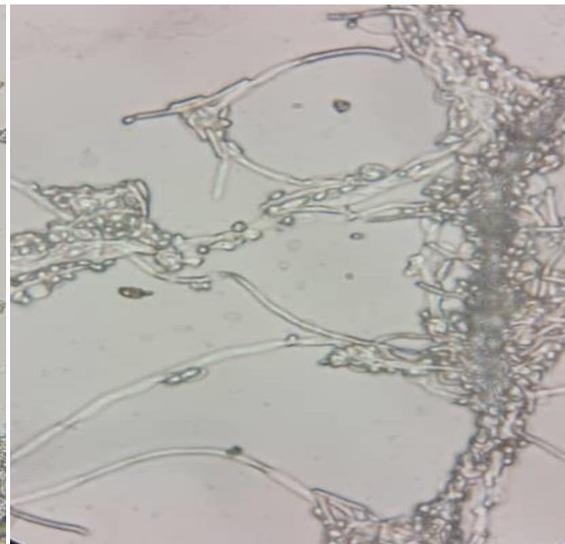
Annexe 4: Observation des biofilms au microscope.



G X 40 (Photo originale)



G X 40



G X 100

Souche 4G3 après formation de biofilm
(Photo originale)

Annexe 5: Réduction des biofilms chez *C. albicans*.

Tableau : Densités optiques obtenues après traitement à différentes concentration de Nystatine

Souches		Concentrations de l'agent Nystatine en µg/ml					T-
		8	16	32	64	128	
M3	DO	0,092	0,09	0,087	0,085	0,08	0,193
	TR%	52	53	55	56	59	
CA	DO	0,11	0,101	0,091	0,08	0,078	0,186
	TR%	41	46	51	57	58	
CA1	DO	0,114	0,107	0,089	0,078	0,073	0,187
	TR%	39	43	52	58	61	
CA2	DO	0,102	0,101	0,086	0,08	0,073	0,173
	TR%	41	42	50	54	58	
CA3	DO	0,118	0,108	0,087	0,079	0,075	0,166
	TR%	29	35	48	52	55	
CA4	DO	0,107	0,096	0,089	0,086	0,079	0,193
	TR%	45	50	54	55	59	

Tableau : Densités optiques obtenues après traitement à différentes concentration du combiné Nys-PEG.

		Concentrations de l'agent Nystatine-PEG en µg/ml					T-
		8	16	32	64	128	
M3	DO	0,102	0,101	0,097	0,096	0,094	0,232
	TR%	56	56	58	59	59	
CA	DO	0,108	0,101	0,097	0,092	0,091	0,224
	TR%	52	55	57	59	59	
CA1	DO	0,114	0,107	0,089	0,078	0,073	0,201
	TR%	43	47	56	61	64	
CA2	DO	0,116	0,11	0,104	0,1	0,094	0,221
	TR%	48	50	53	55	57	
CA3	DO	0,106	0,095	0,087	0,081	0,077	0,172
	TR%	38	45	49	53	55	
CA4	DO	0,109	0,091	0,085	0,081	0,078	0,199
	TR%	45	54	57	59	61	

Tableau : Densités optiques obtenues après traitement à différentes concentration de Terbinafine.

		Concentrations de l'agent Terbinafine en µg/ml					
		8	16	32	64	128	T-
M3	DO	0,11	0,106	0,092	0,083	0,08	0,185
	TR%	41	43	50	55	57	
CA	DO	0,112	0,109	0,094	0,088	0,085	0,177
	TR%	37	38	47	50	52	
CA1	DO	0,117	0,094	0,087	0,084	0,079	0,181
	TR%	35	48	52	54	56	
CA2	DO	0,112	0,092	0,087	0,082	0,081	0,174
	TR%	36	47	50	53	53	
CA3	DO	0,103	0,091	0,088	0,086	0,083	0,168
	TR%	39	46	48	49	51	
CA4	DO	0,113	0,103	0,1	0,094	0,09	0,2
	TR%	44	49	50	53	55	

Tableau : Densités optiques obtenues après traitement à différentes concentration du conjugué Terb-PEG

		Concentrations de l'agent Terbinafine-PEG en µg/ml					
		8	16	32	64	128	T-
M3	DO	0,126	0,108	0,097	0,091	0,089	0,164
	TR%	23	34	41	45	46	
CA	DO	0,124	0,105	0,11	0,095	0,09	0,168
	TR%	26	38	35	43	46	
CA1	DO	0,11	0,103	0,096	0,082	0,077	0,176
	TR%	38	41	45	53	56	
CA2	DO	0,112	0,107	0,105	0,09	0,077	0,183
	TR%	39	42	43	51	58	
CA3	DO	0,114	0,102	0,092	0,086	0,081	0,172
	TR%	34	41	47	50	53	
CA4	DO	0,111	0,1	0,099	0,094	0,089	0,187
	TR%	41	47	47	50	52	