Rébublique Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique

Université Dr. Yahia Farès de Médéa

Faculté des Science

Thèse de Mémoire

Département : Science de La Nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par :

Nour El Houda Kheira Kerbouci

Marwa Bouchenafa

Hind Esselimani

Isolement, identification et étude de la sensibilité aux antibitioques des bactéries de la cavité buccale

Devant le jury composé de :

Mr Bouazza Chami	UNIV de Médéa	Examinateur
Mme Boumediane Farida	UNIV de Médéa	Examinatrice
Mme Belkacem Imane	UNIV de Médéa	Promotrice

Médéa, 2021/2022

Remerciement :

Tout d'abord, nos remerciements infinis sont adressés à Dieu le tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné foi et sagesse, ayant éclairé notre chemin de volonté et de courage pour avoir rendu possible ce modeste travail. Je remercie également toutes les personnes proches ou lointaines qui ont contribué à moi, même si avec un mot de motivation.

En seconde lieu

Nous tenons à remercier notre chère encadreur ***Mme Belkacem Imane*** *Maître de conférence B à la Faculté des sciences de la nature et de la vie, à l'université Dr YAHIA Fares de Médéa, pour ses précieux conseilles sa confiance et les encouragements.et son aide durant toute la période du travail.*

Nous souhaitons également remercier l'ensemble des membres de jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce mémoire.

À Mr ***Chami Bouazza****, qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider notre jury. Qu'il reçoive ici nos hommages respectueux.*

Nous adressons nos sincères remerciements à Madame ***Boumediane Farida****, Maître assistant au Département de biologie pour avoir accepté d'examiner ce travail, et c'est un honneur pour nous qu'elle juge ce travail.*

Nous remercie également très spécialement les techniciennes de laboratoire de l'université pour leur accueil et leur contribution dans ce travail.

A la fin

Nous exprimons nos vifs remerciements à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, et encouragé pour la réalisation de ce mémoire, qui ont contribué à la réalisation de ce travail .en particulier les enseignants et tous nos collègues d'études particulièrement notre promotion et les étudiants du département de biologie. Nous les remercions du fond du cœur. Veuillent bien accepter ici l'expression de nos remerciements les plus sincères.

Merci à tous ……

Dédicace :

Je remercie tout d'abord Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la force et la patience d'achever ce modeste travail. Je tiens avec immense plaisir que je dédie à :

A l'être la plus chère a ma vie ma mère*, ma douce et tendre, aimable, honorable : Tu représente pour moi le réseau de vivre de continuer, réseau d'être plus forte en franchissons les barrières de ma vie,*

Quoi que je fasse ou que je die, je ne sauraipoint te remercie comme il se doit, ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtes à toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles. Ton amour et ta gentillesse ont conquis nos cœurs, tu es mon modèle à suivre

A mon très cher père

Qui a semé en moi le respect et l'amour de la science Grâce à toi papa j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité Tu es le meilleur Papa qui a toujours fait de ton mieux avec nous.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que vous avez déployés pour mon éducation et ma formation. Vous êtes les plus chers à mon cœur

A mes sœurs adorées et mon chère frère, *Un signe d'amour et de gratitude pour leurs soutiens morale, leurs conseils précieux tout au long de mes études et les sacrifices dont vous avez fait preuve à mon égard. Que Dieu les protège et leurs offres la chance, la réussite et le bonheur.*

À mes trinômes Nour El Houda Kerbouci et Esselimani Hind *je les remercie pour le courage qu'elles ma donné et tous les moments qu'on a passés ensemble.*

À mes professeurs *pour leur encouragement et qui n'ont épargné aucun cher ou précieux pour mon bien.*

À toute ma promotion *pour sa fidélité et serviabilité. Puisse dieu vous apporte le bonheur, la réussite et sur tout la bonne santé*

Marwa





Dédicace :

Tout d'abord louange à Allah qui m'a guidée sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspirée les bons pas et les justes reflexes. Sans sa miséricorde. Ce travail n'aura pas abouti.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui, quels que soient les termes embrassés, je n'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A la femme, qui a souffert sans laisser souffrir, qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études, qui n'a jamais dit non âmes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse : ***Mon adorable mère****. Que Dieu leur donne une longue et joyeuse vie.*

A mon père *décédé. J'espère que, le du monde qui est sein maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fills qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde !*

A mes chère sœurs et frères *qui n'ont pas cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes études. Que Dieu les protège et leurs offre la chance et le bonheur.*

A toute ma famille*, mes proches et à ceux qui me donnent de l'amour et la vivacité.*

A mes trinômes ***Bouchenafa Marwa*** *et* ***Esselimani Hind*** *pour son soutien moral, son patience et son compréhension tout au long de ce projet.*

A mes enseignements *de l'école primaire jusqu'à l'université dont les conseils précieux m'ont guidée ; qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.*

A ma promotion de microbiologie *pour sa fidélité et serviabilité. Puisse dieu vous apporte le bonheur, la réussite et sur tout la bonne santé.*

Nour El houda





Dédicace :

Je dédie ce modeste travail

A Dieu tout puissant, qui ma donné la force, la santé et le coutage de réaliser ce précieu travail.

C'est avec une profonde émotion que je dédie ce mémoire :

Ames très chèrs mais qui ne font plus partie de ce monde, ***mon grande pére*** *et* ***ma grande mére****, ainsi que* ***mon oncle*** *partie si tôt, que dieu leur accord sa miséricorde.*

Spéciale dédicace A la personne la plus chère à mon cœur : ***Maman*** *pour son chaleureux encouragement, sa tendrasse, sa douceur et ses sacrifices et qui m'a supportée viallement pas à pas tout au long de ma vie…*

A mon père *qui est ma fierté dans cette vie qui remercié pour tout leur aides, leur appuis, leur sacrifices et leur encouragement durant toutes mes années d'études.*

A mes très chèrs sœurs *pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur encouragement.*

A mon frère *pour l'amour, l'attention et l'aide qu'il m'a apporté.*

A tout ***ma famille****,* ***mes oncles****,* ***mes tantes****,* ***mes cousines*** *et* ***cousins****.*

A mes trinômes ***Bouchenafa Marwa*** *et* ***Kerbouci Nour El Houda*** *je les remercie pour le courage qu'elles ma donné et tous les moments qu'on a passé ensembles.*

A mes amis et à toutes les personnes que j'aime.

A toute la promo de microbiologie appliquée.

Hind



Sommaire :

Liste des tableaux.

Liste des figures.

Liste d'abréviation.

Résume.

Abstract.

الملخص.

Introduction…….. 1

Partie bibliographique

Chapitre 01 : Généralités sur la cavité buccale

1. La cavité buccale…… 3
   - 1.1. Définition…….. 3
   - 1.2. Le rôle de la cavité buccale…….. 3
   - 1.3. Anatomie de la cavité buccale…… 4
     - 1.3.1. Langue…… 4
     - 1.3.2. Glandes salivaires et la salive……..... 5
     - 1.3.3. Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule…….... 6
     - 1.3.4. Dents…….. 7
   - 1.4. Anatomie dentaire…….... 8
     - 1.4.1. Partie coronaire…….... 8
     - 1.4.2. Partie radiculaire…….…... 8
     - 1.4.3. Parodonte……...… 9
2. Description de la flore bactérienne……... 10
3. La flore buccale. ……...… 11
   - 3.1. Définition……...… 11
   - 3.2. Composition de la flore buccale……... 11
   - 3.3. Flore bucco-dentaire……..... 12

Chapitre 02 : Généralités sur le biofilm.

1. Historique..... 15
2. Définition……. 15
3. Les étapes de formation du biofilm…….... 16
   - 3.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)……... 17
   - 3.2. Phase d'adhésion réversible……. 17
   - 3.3. Phase d'adhésion irréversible…….. 17
   - 3.4. Phase de prolifération…….. 17
   - 3.5. Phase de maturation……..... 18

3.6. Phase de détachement……..... 19
4. Composition et organisation…….... 19
4.1. Composition……... 19
4.1.1. Les microorganismes…… 20
4.1.2. La matrice……. 20
4.2. Organisation…….. 20
5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm…… 20
5.1. Caractéristique de surface……. 20
5.1.1. Rugosité de la surface……... 21
5.1.2. Propriété physico – chimique de la surface…….. 21
5.1.3. Présence de filme protéiques sur la surface…….. 21
5.2. Caractéristique du milieu……... 21
5.3. Caractéristique des microorganismes……..... 22
6. propriété d'un biofilm……..... 22
7. Le biofilm buccale (la plaque dentaire)……. 23
7.1. Définition…… 23
7.2. Rôle de la plaque dentaire dans les pathologies bucco dentaire…… 24
7.3. Classification des plaques dentaires…… 24
7.3.1. Selon l'habitat…… 24
7.3.2. Selon le pouvoir pathogène…… 26
7.4. La composition bactérienne de la plaque dentaire…….. 27
8. L'homéostasie……..... 27
9. Régulation de la formation de biofilm…… 28
9.1. Les molécules impliquées dans le quorum sensing…… 28
9.2. Rôle du quorum sensing…… 28
9.3. Altération du quorum sensing…… 28

Chapitre 03 : les infections bucco-dentaires.

1. Infections dentaires…….. 29
1.1. La carie……..... 29
1.2. Épidémiologie…….. 29
1.3. Définition…… 30
1.4. Localisation des carries……..... 30
1.5. Les facteurs de risque…….. 30
1.6. Mécanisme de développement…… 31
1.7. la prévention de la carie…….. 32
2. Infections endodontiques……... 32
3. Microbiologie des maladies parodontales…….. 33
3.1. Les gingivites…….. 34
3.1.1. Définition et étiologie……..... 34
3.1.2. Mécanisme de formation…… 35
3.2. Les parodontites…….. 37
3.2.1. Définition…… 37
3.2.2. Mécanisme de formation…… 38

4. Abcès parodontal……..…….. 38
5. Stomatites……..…….. 39
6. Aphtes……..…… 40
7. Prévention et traitement des maladies bucco-dentaires. ……..……... 42
8. La propolis et les infections bucco-dentaires. ……..……... 42
8.1. Généralités sur la propolis……..…….... 42
8.1.1. Un peu d'histoire sur la propolis……..…… 42
8.2. Définition……..…… 43
8.3. La récolte……..…… 43
8.3.1. La récolte par les abeilles……..…… 43
8.3.2. La récolte par les apiculteurs……..…….. 44
8.4. Composition……..…… 44
8.4.1. Résine végétale……..…… 44
8.4.2. Cire……..…….. 44
8.5. Utilisation de la propolis……..…… 44
8.5.1. Utilisation de la propolis par les abeilles……..… 44
8.5.2. Utilisation traditionnelle……... 45
8.5.3. Utilisation commerciale……... 45
8.5.4. Utilisation de la propolis contre les infections bucco-dentaires…... 45
8.6. Effet indésirable de la propolis……..… 45
8.7. Conservation……..…… 46

Partie expérimentale

Chapitre 04 : Matériel et méthodes.

1. Objectif d'étude……...….. 47
2. Cadre d'étude……..…… 47
3. Matériel……..…….. 47
4. Echantillonnage et technique de prélèvement……..……... 48
5. Protocole expérimentale…….. 50
6. Isolement des bactéries de la cavité buccale……... 50
6.1. Préparation des milieux de culture……... 50
6.1.1. Milieux de culture liquide…… 51
6.1.1.1. Bouillon cœur cervelle…… 51
6.1.1.2. Bouillon nutritif…… 51
6.1.2. Milieux de culture solide…….. 51
6.1.2.1. Gélose Nutritive…… 51
6.1.2.2. Milieux Chapman…… 51
6.1.2.3. Milieu Hektoen…… 51
6.1.2.4. Gélose au sang frais…….. 52
6.1.2.5. Gélose Sabouraud…… 52
6.1.2.6. Gélose Muller-Hinton……..…….. 52
7. Méthodes d'isolement des souches bactériennes……..…… 52
7.1. Enrichissement…….. 52
7.2. Mise en culture……..…. 52

7.3. Purification…….…. 53
7.4. Conservation des souches……..…. 53
8. Méthode d'identification des souches bactériennes……..….. 53
8.1. Tests préliminaires……..….. 54
8.1.1. Examen macroscopique…… 54
A. Aspects macroscopiques clé pour les CGP (cocci gram +)……..……. 54
a. Mannitol-Sel……..…… 54
b. Test d'hémolyse……...…….. 55
B. Aspects macroscopiques clés pour les BGN (Bacille à gram -)…...…….. 55
a. Fermentation de lactose…….. 55
8.1.2. Examen microscopique…….…… 56
A. Examen à l'état frais…….. 56
B. Examen après coloration de Gram…… 56
8.1.3. Analyse microbiologique des bactéries pathogènes…….…… 57
A. Recherche des Staphylocoques……...…….. 57
B. Recherche des Streptocoques……...…… 58
C. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa*……...…… 59
8.1.4. Analyse biochimique……..…… 59
8.1.4.1. Galeries classiques…….. 59
8.1.4.2. Test complémentaire……... 61
A. Test catalase. …… 61
B. Test Coagulase. …… 61
C. Test oxydase…….…….. 62
D. Test d'identification de *Candida albicans*……. 62
9. Antibiogramme……..…... 62
10. Les techniques d'évaluation de la formation de biofilm in vitro…….. 65
10.1. La méthode du Rouge Congo Agar. …… 65
10.2. Effet de la propolis brute sur la formation du biofilm……... 67
10.3. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)…… 67

Chapitre 05 : Résultats et discussion

1. Résultat de l'enrichissement…….. 72
2. Aspect macroscopique après l'isolement…… 72
3. Résultats d'identifications microscopiques…… 81
3.1. Observation des mouvements bactériens…… 81
3.2. Coloration différentiel de Gram……... 85
4. Résultat de l'enrichissement et la purification (repiquage)…… 89
5. Tests complémentaires…… 90
5.1. Test catalase……. 90
5.2. Résultat de test Coagulase……... 91
5.3. Test cytochrome oxydase…….. 93
5.4. Test d'identification de *Candida albicans*…….. 94
5.4.1. Test blastèse……. 94

6. Résultat d'identification biochimique…… 94
7. Antibiogramme……... 96
8. La formation de biofilm chez les souches bactériennes……..... 99
    8.1. Résultats de méthode Rouge Congo……... 99
    8.2. Résultat de méthode Crystal violet…… 100
        8.2.1. Effet de la propolis brute…… 100
        8.2.2. Effet de la PB sur la formation de biofilms de S.aureus et Streptococcus…… 100
        8.2.2.1. Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de S.aureus et Streptococcus…… 101

Discussion…….. 107

Conclusion……. 110

Référence …….. 112

Annexe

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans la cavité buccale.

Tableau 02 : Caractéristique de biofilm bactérienne clinique.

Tableau 03 : Les différentes bactéries impliquées dans les maladies parodontales.

Tableau 04 : Comparaison entre gencive sains et gingivite.

Tableau 05 : Matériel utilisé dans notre travail.

Tableau 06 : La nature et période de prélèvement.

Tableau 07: Les principaux Staphylocoques isolés en microbiologie.

Tableau 08 : Les principaux Streptocoques du groupe D isolées en microbiologie.

Tableau 09 : Identification biochimique à l'aide de la galerie classique.

Tableau 10 : Liste des antibiotiques testés.

Tableau 11 : Résultats de l'isolement des différents prélèvements effectués.

Tableau 12 : Les résultats de la forme, la mobilité et le mode de regroupement des différents isolats.

Tableau 13 : Les résultats des observations microscopique (coloration de gram).

Tableau 14 : Résultats de tests catalase.

Tableau 15 : Résultats de tests coagulase.

Tableau 16 : Résultats de test oxydase.

Tableau 17 : Résultats de tests blastèse.

Tableau 18 : Résultats de galerie classiques.

Tableau 19 : Résultats de l'antibiogramme de Stapylococcus aureus.

Tableau 20 : Résultats de l'antibiogramme de Streptococcus.

Tableau 21 : Résultats de l'antibiogramme de Pseudomonas aerugenosa.

Tableau 22 : Réalisation d'antibiogramme.

Tableau 23 : Les résultats de S.aureus.

Tableau 24 : Les résultats de Streptococcus.

Liste des figures :

Figure 01 : Anatomie de la cavité buccale.

Figure 02 : Photo de la face dorsale d'une langue.

Figure 03 : Distribution buccale des glandes salivaires majeurs et leurs respectifs canaux excréteurs.

Figure 04 : Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule(1).

Figure 05 : Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule (2).

Figure 06 : Coupe schématique d'une dent.

Figure 07 : Schématisation de biofilm.

Figure 08 : Formation du biofilm dentaire.

Figure 09: Représentation de la coagrégation bactérienne dans la plaque dentaire humaine: Les colonisateurs précoces se lient à des récepteurs présents dans la pelliculeacquise à la surface dentaire. Par la suite, d'autres micro-organismes peuvent s'agréger à ce lit bactérien.

Figure 10 : Cycle des changements écologiques dans le microbiote buccal qui causent la maladie. Une mauvaise hygiène buccale, des troubles immunologiques et certaines compositions génétiques sont des facteurs majeurs qui contribuent au début de ce cycle. Une condition peut conduire les microbes à devenir anormaux ou à acquérir des facteurs de virulence, et à leur tour, activer le reste du cycle et éventuellement la maladie.

Figure 11 : Diagramme illustrant les différentes surfaces de la dent facilitant la colonisation microbienne.

Figure 12 : Evolution de la lésions carieuse.

Figure 13 : Gencive inflammatoire.

Figure 14 : Formation de la gingivite.

Figure 15 : Développement de la gingivite et la parodontite.

Figure 16 : Abcès parodontal.

Figure 17 : Aphte au niveau de la lèvre.

Figure 18 : Propolis.

Figure 19 : Vue de la face de l'établissement publique de santé de proximité de Medea**(Photo personnelle).**

Figure 20 : Protocole suivi pour l'étude du prélèvement de la cavité buccale et la carie dentaire.

Figure 21 : Isolement des souches sur gélose nutritive.

Figure 22 : Différents aspects des colonies sur les milieux des cultures.

Figure 23 : Différent type d'hémolyse (α, β, γ) sur gélose au sang frais.

Figure 24 : *Pseudomonas aerugenosa* lac^-.

Figure 25 : Coloration de gram pour quelque bactérie.

Figure 26 : Protocole d'identification des CGP et BGN.

Figure 27 : Culture sur la gélose Rouge Congo.

Figure 28 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques.

Figure 29 : Technique de formation de biofilm sur microplaque de Titration **(Photo personnelle).**

Figure 30 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP.

Figure 31 : Détection et lecture de biofilm par méthode TCP **(Photo personnelle).**

Figure 32 : Résultats de l'enrichissement présence de trouble) **(Photo personnelle).**

Figure 33 : Aspects macroscopiques des colonies isolés **(Photo personnelle).**

Figure 34 : Aspect de levure à l'état frais **(Photo personnelle).**

Figure 35 : Aspect de bacille à état frais **(Photo personnle).**

Figure 36 : Cocci en chainette Gram (+) **(Photo personnelle).**

Figure 37 : Cocci Gram (+) en grappe de raisin **(Photo personnelle).**

Figure 38 : Cocci Gram (-) **(Photo personnelle).**

Figure 39 : Aspect de levure **(Photo personnelle).**

Figure 40 : Les résultats de repiquages **(Photo personnelle).**

Figure 41 : Catalase (+) **(Photo personnelle).**

Figure 42 : Catalase (-).

Figure 43 : Représentent les tests coagulase **(Photo personnelle).**

Figure 44 : Coagulase (+).

Figure 45 : Oxydase (+) **(Photo personnelle).**

Figure 46 : Oxydase (-).

Figure 47: Aspect de Candida albicans sous microscope **(Photo personnelle).**

Figure 48 : Résultats macroscopique de galerie classique **(Photo personnelle).**

Figure 49 : Résultats de l'antibiogramme **(Photo personnelle).**

Figure 50 : Production de slime par manifestation des colonies noires sur le milieu Rouge Congo Agar **(Photo personnelle).**

Figure 51 : Non production de slime par manifestation des colonies rouge sur le milieu Rouge Congo Agar **(Photo personnelle).**

Figure 52 : Répartition des bactéries de la cavité buccale dans les différents milieux de culture (à l'état frais).

Figure 53 : Répartition des bactéries de la carie dentaire dans les différents milieux de culture (à l'état frais).

Figure 54 : Répartition des bactéries (Gram+, Gram-, levure) de la cavité buccale dans les différents milieux de culture.

Figure 55 : Répartition des bactéries (Gram+, Gram -, levure) de la carie dentaires dans les différents milieux de culture.

Figure 56: Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de S.aureus et Streptococcus.

Figure 57 : Effet de différente concentration en PB sur la formation de biofilm avant la coloration avec du cristal violet.

Figure 58 : Effet de différente concentration de PB sur la formation de biofilm après la coloration avec cristal violet.

Figure 59 : Les milieux de culture utilisée **(Photo personnelle).**

Figure 60 : Préparation de milieu de culture **(Photo personnelle).**

Figure 61 : Balences **(Photo personnelle).**

Figure 62 : Ecouvillon stérille **(Photo personnelle).**

Figure 63 : Flacons **(Photo personnelle).**

Figure 64 : Propolis **(Photo personnelle).**

Figure 65 : Microscope optique **(Photo personnelle).**

Figure 66 : Microplaque inoculé par suspension (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**

Figure 67 : La lecture de microplaque inoculée par suspension sous l'ELIZA (*Stapylococcus aureus*) **(Photo perspnnelle).**

Figure 68 : Microplaque inoculé par suspension(*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**

Figure 69 : La lecture de microplaque inoculée par a suspension sous l'ELIZA (*Streptococcus*) **(Photo perspnnelle).**

Figure 70 : Microplaque après coloration avec cristal violet (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**

Figure 71 : La lecture de microplaque sous l'ELIZA après coloration avec cristal violet (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**

Figure 72 : Microplaqueaprès coloration avec cristal violet (*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**

Figure 73 : La lecture de microplaque sous l'ELIZA après coloration avec cristal violet (*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**

Schéma 1: Les deux voies de l'infection dentaire.

Schéma 02 : Les principales étapes des maladies parodontales.

Liste d'abréviation :

% : Pourcentage.

Lac^- **:** Lactose négatif

°C : Degré Celsius.

µg : Microgramme.

AHL : Acylhomosérines lactones.

AI : Autoinducteurs.

ARNr : Acide riboNucléique ribosomaux.

AT : Azithromucine.

ATP : Antibiotique.

BGN : Bacille à$gram^-$.

BHIB : Bouilloncœur cervelle (Brain Heart infusion broth)

CB : La cavité buccale.

CD : Carié dentaire.

CGP : Cocci Gram Positive.

Chap : Gélose chapmane.

CV : Cristal violet.

DNase: DésoxyriboNucléase.

DO : Densité Optique.

E.coli : *Eshirichia coli*.

Eh : Le potentiel d'oxydo-réduction.

ELIZA: Enzyme linked immunosorbent assay.

EOS : Extremely sensitive oxygen.

EPH : Etablissement public hospitalie.

EPS : Exo polysaccharides.

EPS : Substance polymère extracellulaires.

EPSP: L'établissement Publique de Santé de proximité de Medea.

F : Femme.

FMAR : Flore mésophyle aérobie revivifiable.

g : Gramme.

g/l : Gramme/ litre.

GN : Gélose nutritif.

GS : Gélose au sang.

h : Heure.

H : Homme.

H2O2 : Peroxyde d'hydrogène.

H2S : Hydrogène sulfuré.

HEA : Hektoen entérique agar.

Hekt : Hektoen.

HLG : Gentamycine.

I : Intermédiaire.

L : Litre.

LE : Lévofloxacine.

MEB : Microscopie électronique de balayage.

mg : Milligramme.

MH : Muller-Hinton.

min : Minites.

ml : Millilitre.

mm : Millimètre.

NACl : Chlorure de Sodium.

nm : Nanomètre.

OMS : Organisation mondiale de santé.

P : Prélèvement.

P.aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*.

PAE : La pellicule acquise exogéne.

PB : Propolis Brute.

pH : Potentiel d'hdrogène.

PIA : Polysaccharide intercellulaire adhésion.

PKa : Constante d'équilibre.

QS : Quorum sensing.

R : Résistance.

RA : Rifampine.

RCA: Rouge Congo agar.

S: Seconde.

S : Sensible.

S. alactolyticus : *Streptococcus alactolyticus*.

S. aureus : *Staphylococcus aureus*.

S. bovis : *Streptococcus bovis*

S. equinus : *Streptococcus equinus*.

Sab : Gélose sabauroud.

SP : Espèce**s.**

Spp : Plusieurs espèces.

TCP : Méthode de plaque de culture de tissus.

TI: Ticarcilline.

TSI: Triple Sugar Iron agar.

Va : Vancomycine.

Résumé :

Etudier la microbiologie buccale s'avère donc extrêmement complexe. Rappelons en effet que la flore bucco-dentaire renferme plus de 50 milliards de bactéries, réparties sur plus de 500 espèces différentes, soit plus de 20 genres distincts, qui cohabitent au sein de l'écosystème buccale. Il faut donc distinguer dans la flore buccale les bactéries adhérentes fixées sur les différentes surfaces de la cavité buccale (surfaces dentaires). Le but de cette étude est de déterminer le profil microbiologique de la cavité buccale chez les individus dont l'intervalle d'âge est compris entre 10 et 58 ans et d'étudier le pouvoir de formation de biofilms bacteriens par ces germes isolés. Cette identification est basée sur les caractères morphologiques, culturaux, biochimiques et lestests de sensibilité aux antibiotiques. Cela nous a permis d'identifier 11 souches bactériennes de la cavité buccale qui peuvent devenir pathogènes en causant des infections buccales. Les résultats obtenus ont montré que *Streptococcus*, *Staphylococcus*, levure, *Lactobacillus* et *Enterococcus* sont les souches les plus dominantes dans la cavité buccale. Les tests de sensibilité aux antibiotiques appliqués à ces microorganismes ont montré que la plus part des souches sont sensibles aux antibiotiques utilisées sauf *Streptococcus*, *Staphylococcus* sont résistants à certains antibiotiques. Les résultats de l'étude de la formation de biofilm par la méthode RCA ont montré que *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus* sont les seules souches productrices de slime et de biofilm. Cette étude confirme que certaines bactéries sont résistantes aux antibiotiques donc il n'a aucune traitement n'est totalement efficace contre les maladies buccales et la prévention reste en effet le seul moyenne de lutte pour éviter la formation des plaques dentaires.

Mots clé : infection buccale, biofilm, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, antibiotiques.

Abstract:

Studying oral microbiology is therefore extremely complex. Let us remember that the oral flora contains more than the 50 billion bacteria, distributed over more than 500 different species, that is to say more than 20 distinct genera, which cohabit within the oral ecosystem. It is therefore necessary to distinguish in the oral flora the adherent bacteria fixed on the different surfaces of the oral cavity (dental surfaces). The aim of this study is to determine the microbiological profile of the oral cavity in individuals whose age interval is between 10 and 58 years and to study the power of formation of bacterial biofilms by these isolated germs. This identification is based on morphological, cultural, biochemical, characters and antibiotic sensitivity tests. This allowed us to identify 11 bacterial strains of the oral cavity that can become pathogenic by causing oral infections. The results obtained showed that the *Streptococcus*, *Staphylococcus*, yeast, *Lactobacillus* and *Enterococcus* are the most dominant strains in the oral cavity. Antibiotic sensitivity tests applied to these microorganisms have shown that the most of the strains are sensitive to antibiotics used except *Streptococcus*, *Staphylococcus* are resistant to certain antibiotics. The results of the study of biofilm formation by the RCA method showed that *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* are the only strains producing slime and biofilm. This study confirms that some bacteria are resistant to antibiotics so there is no treatment that is totally effective against oral diseases and prevention remains the only way to fight against the formation of dental plaque.

Key words: Oral infection, biofilm, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, antibiotics.

الملخص :

إن دراسة علم الأحياء الدقيقة عن طريق الفم معقدة للغاية ,دعونا نتذكر أن الفلورا الفموية تحتوي على أكثر من50 مليار بكتيريا , موزعة على أكثر من 500 نوع مختلف ,أي أكثر من 20 جنسا متميزا ,و التي تتعايش داخل النظام البيئي للفم . لذلك من الضروري التمييز في الفلورا الفموية البكتيريا اللاصقة المثبتة على الأسطح المختلفة لتجويف الفم (أسطح الأسنان)، الهدف من هذه الدراسة هو تحديد المظهر الميكروبيولوجي لتجويف الفم لدى الأفراد اللذين تتراوح أعمارهم بين 10 و 58 سنة و دراسة قوة التكوين الأغشية الحيوية البكتيرية بواسطة هذه الجراثيم المعزولة، يعتمد هذا التحديد على الخصائص المورفولوجية والزراعية و الكيميائية الحيوية و اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية . سمح لنا ذلك بتحديد 11 سلالة ببكتيرية في تجويف الفم, يمكن أن تصبح مسببة للأمراض عن طريق التسبب في التهابات الفم. وأظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن المكورات العقدية , و المكورات العنقودية , و الخميرة , والملبنة , والمكورات المعوية هي السلالات الأكثر انتشارا في تجويف الفم، أظهرت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية المطبقة على هذه الكائنات الدقيقة أن معظم السلالات حساسة للمضادات الحيوية المستخدمة باستثناء المكورات العنقودية و المكورات العقدية المقاومة لبعض المضادات الحيوية، أظهرت نتائج دراسة تكوين الأغشية الحيوية بطريقة جيلوز احمر الكونغو أن المكورات العنقودية الذهبية و المكورات العقدية هما السلالات الوحيدة المنتجة للوحل و الغشاء الحيوي .تأكد هذه الدراسة أن بعض أنواع البكتيريا تقاوم المضادات الحيوية لذلك لا يوجد علاج فعال بشكل كامل ضد أمراض الفم و تبقى الوقاية هي الطريقة الوحيدة لمحاربة تكون طبقة لبلاك.

الكلمات المفتاحية : عدوى الفم، الغشاء الحيوي الرقيق، المكورات العقدية، المكورات العنقودية، المضادات الحيوية.

Introduction :

Introduction :

La cavité buccale est un écosystème riche avec une myriade de micro-organismes multi-espèces dotés de relations complexes avec l'hôte humain. La plupart des organismes ne peuvent se maintenir dans la cavité buccale que lorsqu'ils adhèrent aux tissus durs ou mous où se forme un biofilm (**Zawadzki *et al.*, 2016 ; Takane *et al.*, 2018)**.

Les biofilms sont des consortiums de micro-organismes qui peuvent se former sur diverses surfaces, notamment les dents et les dispositifs médicaux oraux.Le biofilm le plus accessible se trouve dans la cavité buccale et il est appelé plaque dentaire **(Zijnge *et al.*, 2012; Petersilka, 2000).**

La plaque dentaire est un dépôt situé à la surface de la dent, constitué d'éléments bactériens, cellulaires et salivaires et de résidus alimentaires **(Garnier et Delamare, 2017).** C'est un biofilm c'est-à-dire un agrégat de bactéries et de leurs sécrétions adhérant à la surface de la dent ou de restaurations dans la cavité buccale.

La formation d'un biofilm est un processus réalisé en plusieurs étapes dans lequel les cellules microbiennes adhèrent de manière réversible à la surface, suivi de la production d'une matrice d'exopolysaccharide qui se traduit par un attachement irréversible (**Coenye *et al.*, 2008**). Il a déjà été confirmé qu'il existe des différences substantielles entre les bactéries planctoniques et celles vivants en biofilm qui joue un rôle important dans la santé bucco-dentaire.

En temps actuel, les infections bucco-dentaires présentent un problème majeur de santé publique et sont les maladies non transmissibles les plus courantes. Ce sont des maladies souvent invisibles et cachées, qui affectent les différentes catégories d'âge à travers le monde entier pouvant engendrer des douleurs de diverses intensités, des déformations et parfois même la mort **(OMS, 2018).**Un traitement endodontique est alors proposé par le dentiste **(Virtanen *et al.*, 2014).** Certaines espèces bactériennes ont été alors impliquées en tant qu'agents pathogènes dans les affections humaines telles que les caries dentaires et les parodontites.

La carie dentaire est une maladie infectieuse microbienne, transmissible post-éruptives des tissus durs de la dent (émail, dentine, cément) **(Galmiche Fanny, 2011).** C'est une infection complexe, d'origine multifactorielle dans laquelle le régime alimentaire, l'hôte et la flore microbienne interagit sur une période de temps de manière dynamique de façon à

encourager la déminéralisation de l'émail des dents avec la formation des caries qui en résultent, allant d'une simple perte de minéraux non détectable à l'oeil nu, à une destruction complète de la dent. La carie dentaire, le produit de progrès de l'homme vers la civilisation, a un potentiel de morbidité très élevée **(Ingle *et al.*, 2014).**

Comme la gingivite, la parodontite résulte souvent d'une hygiène bucco-dentaire médiocre favorisant le développement de plaque dentaire et de tartre. Cette affection va atteindre le parodonte profond et est caractérisée par une perte osseuse avec l'apparition d'une poche parodontale entre la gencive et la dent. Ces deux phénomènes vont concourir à l'apparition d'une mobilité dentaire **(Bercy P, Tenenbaum H. 2017).**

La propolis ou encore colle d'abeille, en effet, est une substance d'origine résineuse collectée par les abeilles sur les bourgeons et les écorces des arbres. Elle est très complexe en matière de composition chimique dont on trouve plus de 400 substances constituantes, mais globalement elle est composée de la résine, la cire, le pollen et les huiles essentielles **(Sambou *et al.*, 2020).**

Le propos de ce travail est donc d'évaluer la diffusionles bactéries dans la cavité buccale et la carie dentaire et d'étudier leurs sensibilités vis-à-vis aux antibiotiques. L'objectif de notre thème de recherche est l'isolement et l'identification des bactéries de la cavité buccale en relations avec l'âge et le sexe de patient.

Ce travail est divisé en deux parties interdépendantes ; une bibliographie et une autre pratique.

La partie bibliographique est composée de trois chapitres. Le premier relate des généralités sur la cavité buccale et le deuxième est dédié aux biofilms buccale, le troisième est parlé sur les infections bucco-dentaires et utilisation de la propolis pour favoriser la santé bucco-dentaire.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur : échantillonnage, enrichissement, isolement des microorganismes, identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques. Les résultats obtenus sont exposés avec leurs discussions.

Une conclusion et des perspectives clôturent ce travail.

Chapitre 01 :

Généralités sur la cavité buccale

Chapitre 01 : Généralités sur la cavité buccale.

1. La cavité buccale :

1.1. Définition de la cavité buccale

La cavité buccale est l'entrée du tube digestif. Le tube digestif est anatomiquement continu et abrite environ $1x10^{14}$ micro-organisme. Ce qui est plus que les quelque $6x10^{13}$ cellules qui constituent le corps humain tout entier. Sur les différents sites du corps, la cavité orale est l'une des plus densément peuplés et plus de 500 espèces de micro-organismes ont été isolés à partir de la cavité buccale en utilisent des méthodes de biologie moléculaire récemment développés. Ces micro-organisme colonisent les surfaces orales où ils forment un consortium microbien appelé plaque dentaire ou biofilm oral **(Takahashi, 2005) (Figure 01).**

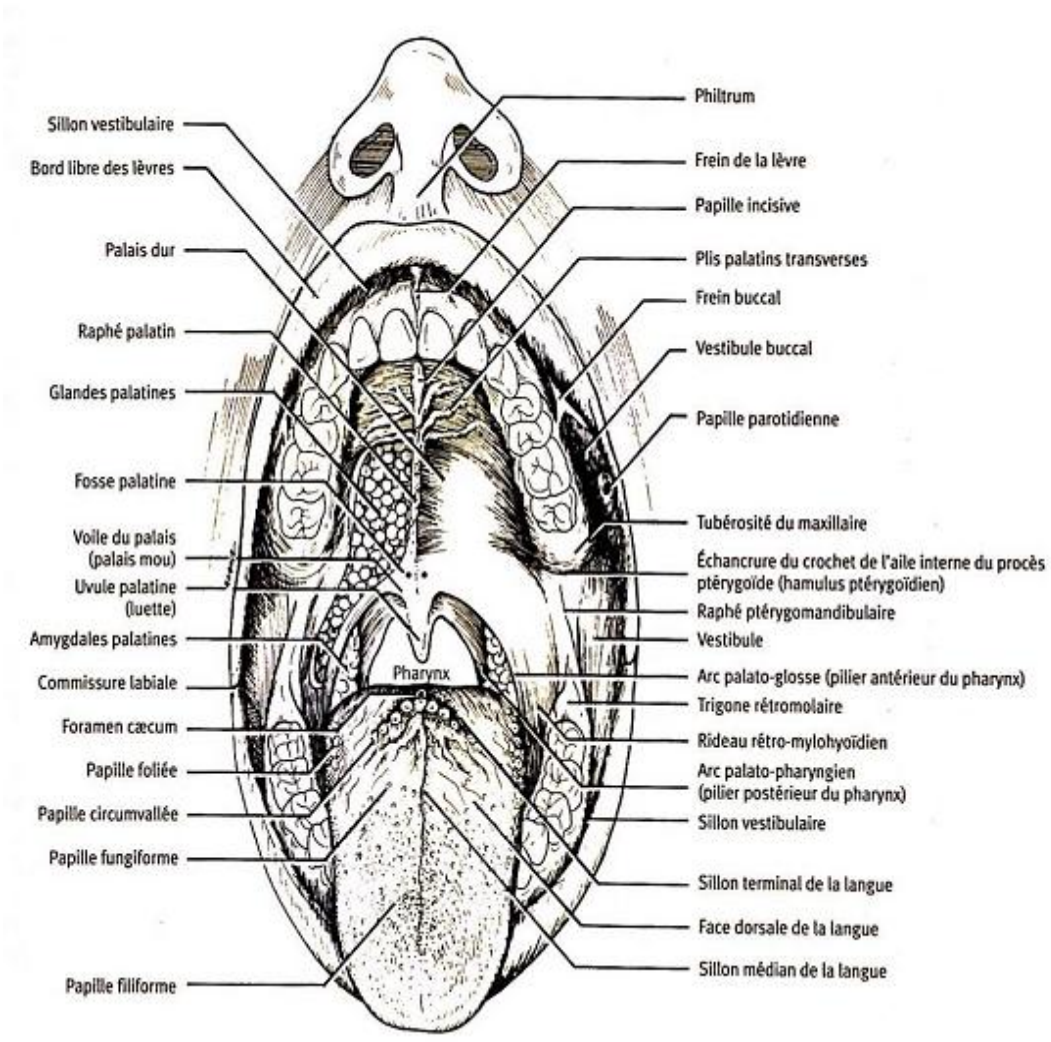


Figure 01 : Anatomie de la cavité buccale **(Nguyen H *et al.*, 1994).**

1.2. Le rôle de la cavité buccale :

La cavité buccale forme la première cavité du tube digestif en détient plusieurs fonctions qui sont : la phonation, la mastication, la déglutition, la respiration et l'esthétique. Toutes ces fonctions sont déterminantes pour la santé générale. Il est donc primordial de préserver la santé buccale afin de maintenir la qualité de vie de l'individu **(Secci, 2006).**

1.3. Anatomie de la cavité buccale :

1.3.1. La langue :

La langue joue un rôle majeur dans les différentes fonctions buccales. Elle est directement impliquée dans la perception des goûts et aussi dans le processus de phonation, de déglutition et de mastication.

Ce muscle est composé de deux parties principales :

- **La partie postérieure** : c'est la racine de la langue qui est fixée en arrière du plancher buccal ;
- **La partie mobile** : c'est le corps qui est formé d'une face inférieure qui est recouverte d'une fine muqueuse permettant l'apparition des veines sublinguales, de bords latéraux et une pointe (apex) et d'une face supérieure dorsale qui est traversée par un sillon médian.

La langue est aussi bien distinguée par quatre types de papilles localisées sur la muqueuse de la face dorsale **(Figure 2):**

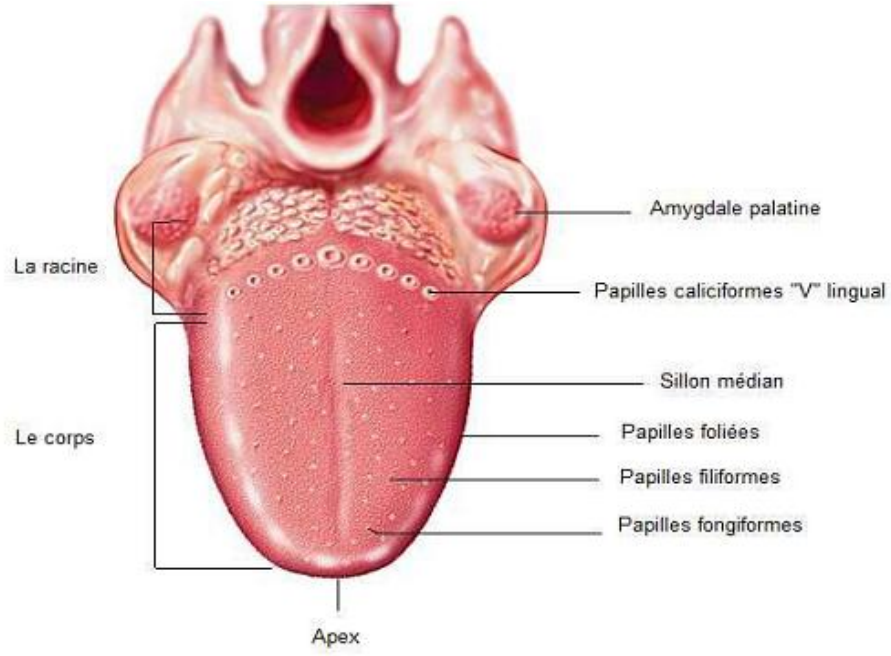


Figure 02 : Photo de la face dorsale d'une langue **(Jung C. 2018).**

- Les papilles filiformes : elles sont reparties sur toute la surface dorsale. Elles présentent une petite taille mais elles sont les plus nombreuses. Leur aspect est légèrement kératinisé conférant l'aspect râpeux à la langue. Cependant, elles ne possèdent aucun bourgeon du goût ;
- Les papilles fongiformes : impliquées dans la fonction de digestion. Elles sont peu nombreuses et réparties entre les papilles filiformes ;
- Les papilles caliciformes : participent à la fonction de gustation. Ce sont les papilles les plus volumineuses qui sont exclusivement réparties sur le << V>> lingual ;
- Les papilles foliées : peu nombreuses et situées sur les bords de la langue. Elles sont responsables de la perception de quatre goûts : le sucré, le salé, l'acide et l'amer. **(Jung C. 2018).**

1.3.2. Glandes salivaires et la salive :

La salivation est une fonction indispensable au bon fonctionnement de la cavité buccale. C'est un processus physiologique qui est assuré par deux grands types de glandes salivaires **(Lautrou A, 1998) (Vidailhet B. *et al.*, 2008) :**

- **Les glandes salivaires majeures** : qui secrètent plus de 90% de la sécrétion salivaire. Elles sont symétriques et présentes par paire. Chacune présentent un canal qui conduit la sécrétion vers la cavité buccale. On en distingue : les glandes parotides, les glandes submandibulaires ou sous-maxillaires et les glandes sublinguales **(Figure 3) (Vidailhet B. *et al.*, 2008).**
- **Les glandes salivaires mineures** : qui favorisent les 10% restants de la sécrétion. Elles sont présentes sur toute la surface de la muqueuse buccale (glandes linguales, labiales, jugales, palatines…) et sont impliquées dans la sécrétion permanente de la salive.

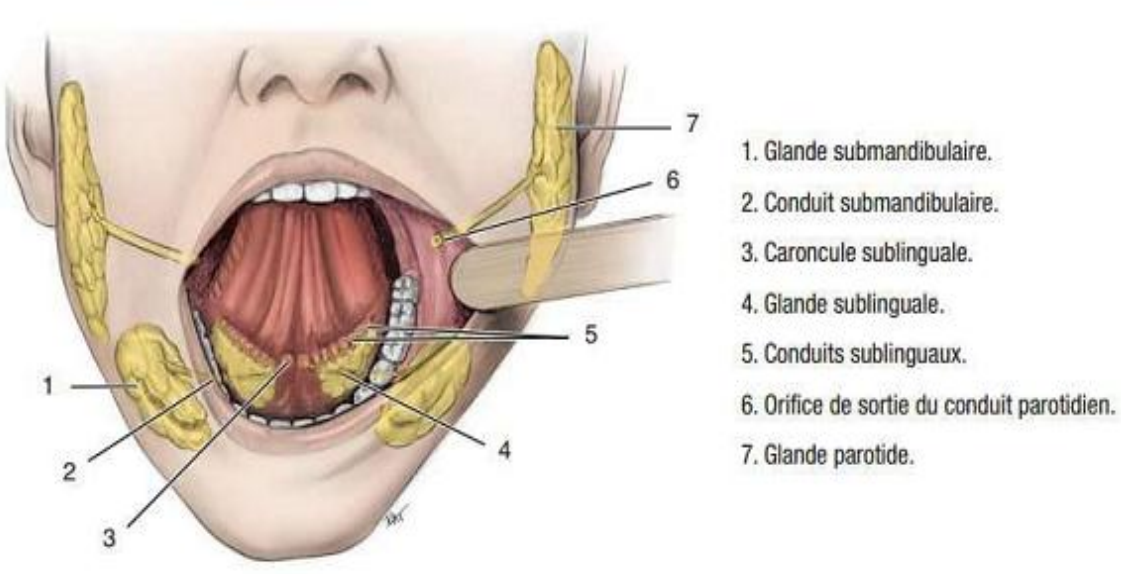


Figure 03 : Distribution buccale des glandes salivaires majeurs et leur respectifs canaux excréteur **(Vidailhet B, Robin *et al.*, 2008.)**

La salive présente donc à un mélange salivaire résultant des fonctions de tous les types des glandes salivaires. Toutefois, d'autres composés s'ajoutent à la salive totale, tels que le fluide gingival, des résidus alimentaires, des micro-organismes et aussi des cellules épithéliales. La salive est faite de 99% d'eau et de seulement 1% de composés organiques (protéines intrinsèques et protéines extrinsèques) et d'autres inorganiques. La pH de la salive se situe entre 6.5 et 7.4 mais peut prendre la valeur de 8.5 au moment de simulations salivaires. En moyenne, la sécrétion de salive est comprise entre 500 et 1200 ml/j selon les stimuli.

Ainsi, les sécrétions salivaires sont des réponses hormonales et nerveuses qui résultent de mécanismes biologiques bien compliqués et assurent deux principales fonctions : digestive et protectrice mais elles jouent également un rôle protecteur antibactérien **(Lautrou A, 1998) (Laison F, Gaudy J.-F. 1993).**

1.3.3. Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule :

Différents muscles interviennent dans le déplacement de la mandibule **(Figures 4 et 5).** En effet, son processus de l'élévation est assuré par la contraction bilatérale de trois paires de muscles et il conduit, à l'aide de la force appliquée par les masséters droit et gauche et les muscles ptérygoïdiens médicaux droit et gauche, à la fermeture de a cavité buccale. Pour le broyage des aliments et le positionnement de la mandibule, les muscles temporaux droit et gauche permettent de remonter le maxillaire inferieur alors que son abaissement est assuré par deux muscles ptérygoïdiens latéraux sous l'aide de muscles supra et infra-hyoïdiens ce qui permet l'ouverture de la cavité buccale. Quant à la rétrusion mandibulaire, elle est réalisée par des fibres postérieures des muscles temporaux alors que la Protrusion est assurée par des muscles ptérygoïdiens latéraux droit et gauche. Ainsi, la latéralité de la mandibule dépend de la contraction de l'un des muscles ptérygoïdiens latéraux **(Nguyen H. *et al.*, 1994).**

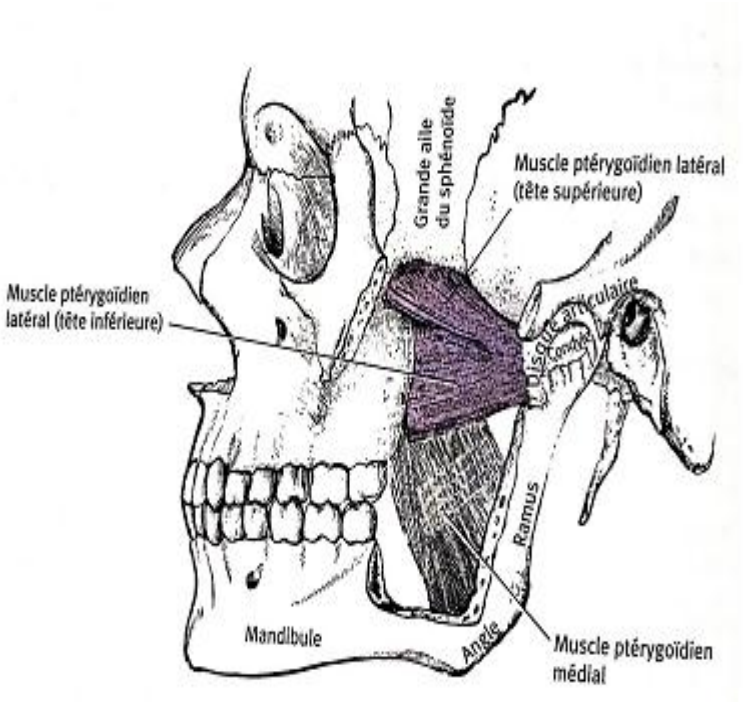


Figure 04 : Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule (1)**(Nguyen H *et al.*, 1994).**

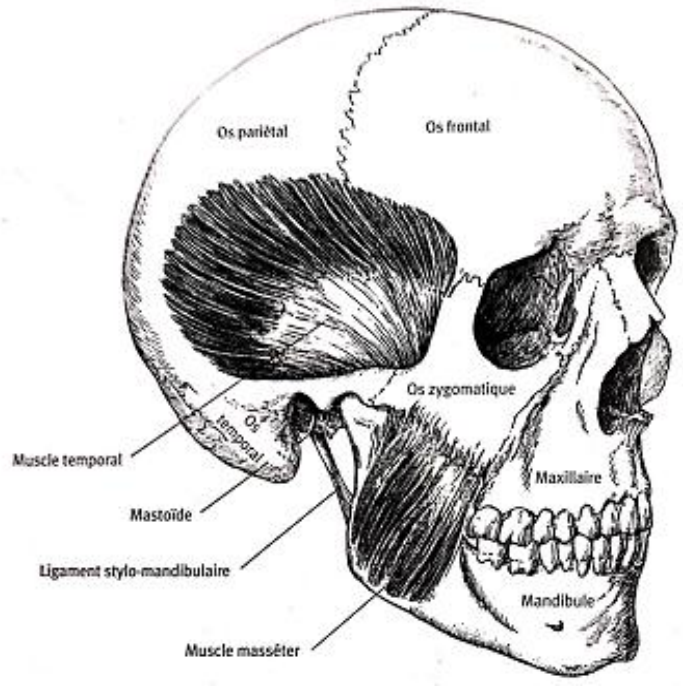


Figure 05 : Muscles de déplacement et de contrôle de la mandibule (2)**(Nguyen H *et al.*,1994).**

1.3.4. Dents :

Les dents ou odontes**,** représentent les principaux organes spécialisés dans la mastication. Elles ont la particularité anatomique qui permet leur connaissance et la différenciation de leurs caractéristiques **(Courson F. *et al.,* 1998) (Nguyen H. *et al.,* 1994).** Avec différents éléments constitutifs de la cavité buccale (Gencives, muqueuses…) et avec les organes qui l'entourent (Lèvres, joues…), les dents entretiennent différentes anatomies et de multiples pathologies **(Courson F. *et al.,* 1998). (Figure 06).**

La totalité des dents d'une personne est nommé denture et dépend de l'âge et du stade de développement des dents **(Organisation mondiale de la santé (OMS). 2012).**

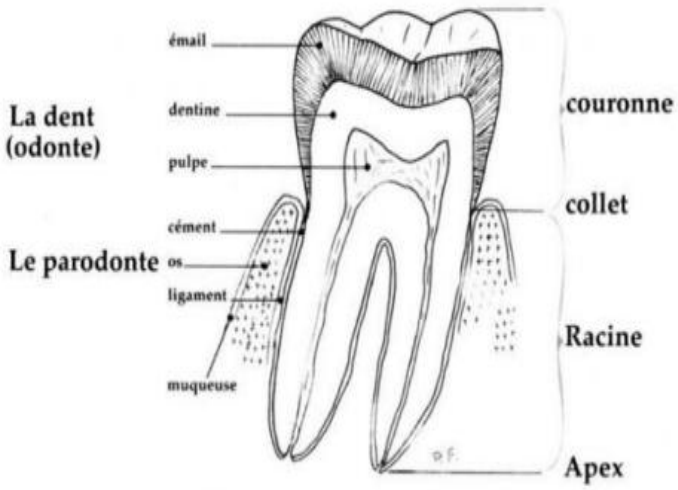


Figure 06 : Coupe schématique d'une dent **(Woelfel JB, Scheid RC. 2007).**

1.4. Anatomie dentaire :

L'anatomie dentaire définit deux parties majeures :

1.4.1. Partie coronaire :

C'est la partie visible dans la cavité buccale. La couronne se compose de :

- **L'émail :** c'est le tissu externe de la dent, il est acellulaire, avasculaire, dur et principalement formé de la matière minérale (cristaux d'hydroxyapatite : complexe de calcium et de phosphate). Il permet la protection de la couronne dentaire et les tissus sous-jacents et ne peut pas être régénéré en cas de son altération **(Cavézian R, 2006)**.

Sa couleur varie entre le blanc et le bleu léger, mais généralement, elle est influencée par l'aspect de la dentine **(Lignon G, *et al.*, 2015)**.

- **La dentine :** c'est le tissu essentiel de la dent. Il est formé d'une importante proportion de substances minérales mais bien perforé par rapport à l'email. Il est aussi avasculaire mais partiellement innervé. Sa couleur est jaunâtre et présente un aspect translucide et élastique suite à l'importante proportion de matière organique qui le constitue **(Faure S. 2010)**.

1.4.2. Partie radiculaire :

Représente les racines logées dans la partie osseuse qui se termine par une extrémité ouverte appelée Apex. Cette partie est aussi formée d'une couche interne nommée dentine et d'une autre externe nommée cément qui est un tissu bien cellulaire **(Courson F, 1998 ; Nguyen H, 1994)**.

Les deux partie sont liées par une zone anatomique appelée collet (**Courson F, 1998 ; Nguyen H, 1994 ; Piette E., 2001)**. La partie intérieure de la dent représente la pulpe dentaire qui est un tissu conjonctif riche en nerfs et en vaisseaux sanguins spécialisés dansl'innervation, la vascularisation, la réparation et la nutrition de la dent. Ce tissu referme deux parties : la partie coronaire (chambre pulpaire) et la partie radiculaire (canaux radiculaires)**(Nguyen H, 1994 ; Faure S, 2010).**

1.4.3. Parodonte :

Les gencives, le ligament alvéolo-dentaire ou le desmodonte, l'os alvéolaire et le cément représentent le parodonte qui est un appareil de soutien de la dent **(Fronty P *et al.*, 2005)**.

1.4.3.1. Gencives :

Les gencives : représentent la partie la plus visible du tissu parodontal au cours de l'examen initial de la bouche. Il s'agit d'une partie muqueuse masticatoire avec une couche de kératine qui permet le recouvrement des procès alvéolaires des mâchoires.

Plusieurs caractéristiques sont spécifiques aux gencives saines. Chez les sujets avec un teint clair, les gencives sont couleur corail alors qu'elles présentent une couleur foncée ou brune chez les personnes avec une couleur mate. Son aspect est donc l'un des éléments qui révèlent l'état du parodonte.

La gencive atteint ses limites au contour des dents en position parallèle à la ligne cervicale **(Fronty P *et al.,* 2005)** et elle est formée de différentes parties : la gencive libre ou marginale, la gencive attachée, la gencive interdentaire ou papille gingivale, etc. Ainsi, le sillon gingivo-dentaire, encore appelé sulcus ou sillon marginal, présente l'espace libre compris entre l'émail et la gencive libre **(Fronty P *et al.,* 2005)**.

1.4.3.2. Desmodonte :

Le desmodonte ou ligament alvéolo-dentaire, qui est appelé aussi péridonte ou ligament parodontale, est localisé entre la paroi alvéolaire et le cément en tant que tissu conjonctif fibreux très fin permettant d'assurer le bon ancrage de la dent par l'intermédiaire de fibres de sharpey. Ces dernières présentent une organisation en faisceaux qui peuvent prendre différentes orientations en fonctions de leur localisation au niveau de la dent et aussi en fonction de la force exercée par la racine dentaire **(Bercy P *et al.,* 1996)**.

1.4.3.3. Os alvéolaire :

L'os alvéolaire également appelé procès alvéolaire correspond à la partie osseuse des maxillaires supérieurs et inférieurs qui délimitent les racines dentaires.

L'os alvéolaire assure différentes fonctions.

- Le soutien de l'organe dentaire ;
- La fixation des fibres ligamentaires ;
- Le soutien pour le tissu gingival ;
- Et la rigidité (trame collagenique calcifiée) ainsi qu'une élasticité au support osseux (lignes de cémentations hypomineralisees) selon la structure de cet os **(Fronty P *et al.,* 2005)**.

Cet os présente des caractéristiques structurales particulières. Il est perforé de multiples pertuis au niveau de la paroi osseuse de l'alvéole. Ces pertuis correspondent à la partie d'insertion de fibres collagéniques telles que les fibres de sharpey qui assurent différents échanges **(Bercy P *et al.,* 1996)**.

1.4.3.4. Cément :

Le cément est présenté sous forme de tissu avasculaire, minéralisé et non innervé. Il est situé entre le ligament parodontal et la dentine radiculaire qu'il recouvre. Il se minéralise accroissement en allant de la jonction amélo-cémentaire vers l'apex **(Bercy P *et al.,* 1996)**.

Le cément présente un rôle majeur dans l'ancrage de la dent au niveau de l'alvéole osseuse comme il est impliqué dans la réparation des lésions radiculaires légères grâce à son dépôt continu **(Fronty P *et al.*, 2005)**.

Il existe deux types de cément :

- **Cément acellulaire ou fibrillaire ou primaire :** le type le plus minéralisé, en position ½ cervicale – bordé de cellules nommées cémentoblastes.
- **Cément cellulaire ou secondaire :** le type le moins minéralisé, en position ½ apicale – bordé de Cellules nommées cémentoblastes et inclut des bordés de cellules nommées cémentocytes. C'est un cément de réparation chez les adultes.

2. Description de la flore bactérienne :

La cavité buccale présente un habitat varié servant d'écosystème pour différentes souches bactériennes aussi bien de Gram positif que Gram négatif (plus de 700 espèces) **(Lignon G *et al.*, 2015).**

La flore varie selon différents facteurs tels que l'âge, le site de prélèvement et aussi selon la situation clinique. En effet, chez les sujets sains, ce sont les bactéries à Gram positif qui dominent la cavité bucco-dentaire, alors que chez les personnes présentant des infections parodontales, les bactéries à Gram négatif sont les plus préoccupantes, quantitativement que qualitativement, des différentes parties bucco-dentaires **(Aas J.A, *et al.*, 2005).**

La flore buccale évolue progressivement avant l'apparition de la denture définitive. Elle tire ses besoins nutritifs, indispensables à sa croissance, à partir de la salive et du fluide gingival. La modification de la flore buccale s'installe aussi lors de la disparition des dents **(OMS., 2012).**

Les premières bactéries qui colonisent la cavité buccale, qui sont dites pionnières, restent peu nombreuses et les plus dominantes sont *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus mitis*biovar 1**(OMS., 2012)** qui se répartissent différemment selon leur site de colonisation au niveau de la bouche.

Toutefois, l'épithélium de la bouche peut être sujet à une kératinisation, ce qui peut contribuer à une élimination bactérienne ou non.

Du fait du passage des aliments et de la morphologie de la langue, son dos constitue une réserve importante pour les bactéries aérobies et anaérobies ou elles atteignent le pic de leur

distribution au niveau de la cavité buccale (100/cellule). En moyenne, on trouve 10^8bactéries par ml de salive et 10^8bactéries par mg de tout biofilm nouvellement formé.

La charge bactérienne est sous l'action de différents facteurs qui définissent le site de préférence de chaque bactérie, on note alors :

- **Des facteurs physico-chimique :** la température, l'humidité, la concentration en ions hydrogène (pH), le potentiel d'oxydo-réduction (Eh), les gaz;
- **Des facteurs nutritionnels :** présence de ressources nutritionnelles nécessaires au métabolisme tels que les sucres, les protéines, les acides aminés, les vitamines et aussi les différents facteurs de croissance qui restent spécifiques pour chaque bactérie **(Paster B.J., 2001).**
- **Des facteurs d'inhibition :** qui influencent le développement des bactéries, on trouve par exemple : le lysozyme, le système lactoperoxydase-ions thiocyanate, la lactoferrine, les immunoglobulines.

3. La flore buccale :

3.1. Définition :

Comme toute surface corporelle, la cavité orale est colonisée par des micro-organismes qui constituent sa flore résidente commensale. En effet, le contact avec l'air extérieur, les aliments, donne accès à une grande variété de micro-organismes tels que bactéries, champignons, virus, protozoaires, différents types de surfaces, dures ou molles (dents, gencives, langue, gorge, muqueuse buccale) offrent autant d'habitats différents, hébergeant chacun des communautés bactériennes caractéristiques **(Philip *et al.*, 2009 ; Scannapieco et Frank, 2013).**

Ainsi la flore buccale varie d'un site à l'autre, et dans le temps.

3.2. Composition de la flore buccale :

La croissance des micro-organismes dans le milieu buccal dépend de plusieurs paramètres, et notamment l'humidité, la température, le pH, le potentiel redox, la disponibilité en nutriments, les surfaces à coloniser, le flux salivaire. Ces paramètres dépendront eux-mêmes de l'hôte, de son hygiène bucco-dentaire et de son alimentation. Pourtant, une fois équilibrée, la microflore résidente reste relativement stable au cours du temps. C'est une flore abondante, complexe et très hétérogène. Elle est constituée de :

- Coques Gram positif comme les *Streptocoques*, qui représentent plus de 20% de la flore buccale (parmi eux, *Streptococcus mutans* joue un rôle dans la carie, *Streptococcus mitis* est impliqué dans la plaque dentaire) ;
- Bacilles et filaments Gram positif comme *Actinomyces*, *Lactobacillus* ou *Eubactérium* ;
- Coques Gram négatif comme *Neisseria* et *Veillonella* ;
- Bacilles Gram négatif comme *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Porphyromonas*, *Fusobactérium*, ces bactéries peuvent être aérobies ou anaérobies, facultatives ou obligatoires. Spirochètes, Mycoplasmes, Champignons qui ne forment qu'une petite partie de la microflore et Quelques virus. **(Chardin *et al.*, 2006 ; Philip *et al.*, 2009).**

3.3. Flore bucco-dentaire :

La flore bucco-dentaire renferme plus de 50 milliards de bactéries, réparties sur plus de 500 espèces différentes, soit plus de 20genres distincts **(Gendron *et al.*, 2000 ; Afssaps, 2001)**. Ces bactéries représentent environ 20g dans la bouche de l'homme **(KERNER, 2005).**

Tableau 01: Les bactéries les plus fréquemment rencontrées dans la cavité buccale sont :

		Genre	**Espèce**
Bactéries anaérobies strictes	Bâtonnets à Gram-négatif	*Porphyromonas*	*P. gingivalis,* *P. endodontais,* *P. catoniae.*
		Prevotella	*P. oralis,* *P. oris,* *P. buccae,* *P. corporis,* *P. denticola,* *P. loescheii,* *P. intermedia,* *P. nigrescens,* *P. melaninogenica.*
		Fusobacterium	*F. nucleatum spp. Nucleatum, spp. Vincentii, spp. Polumorphum.*
		Mitsuokella	*M. dentalis*
		Selenomonas	*S. sputigena*
		Campylobacter	*C. sputorum,* *C. rectus,* *C. curvus*

		Treponema	*T. denticola,* *T. vincentii,* *T. socranskii*
		Bacteroides	*B. forsythus*
	Bâtonnets à Gram-positif	*Eubacterium*	*E. alactolyticum,* *E. lentum,* *E. yurii*
		Propionibacterium	*P. acnes,* *P. propionicus,* *P. jensenii,* *P. granulosum,* *P. avidum*
		Lactobacillus	*L. catenaforme,* *L. crispatus,* *L. oris,* *L. uli,* *L. grasseri*
		Actinomyces	*A. israeii,* *A. odontolyticus,* *A. meyeri*
		Arachnia	*A. propionica*
	Coques à Gram-négatif	*Veillonella*	*V. parvula,* *V. alcaescens*
	Coques à Gram-positif	*Peptostreptococcus*	*P. asaccharolyticus,* *P. magnus,* *P. micros,* *P. anaerobius,* *P. prevotii*
Bactéries anaérobies facultatives	Bâtonnets à Gram-négatif	*Eikenella*	*E. corrodens*
		Capnocytophaga	*C. ochracea,* *C. sputigena,* *C. gingivalis*
		Actinobacillus	*A. actinomycetemcomitans*
		Haemophilus	*H. aphrophilus,* *H. influenzae,* *H. parainfluenzae,* *H. paraphrophilus,* *H. segnis*

	Bâtonnets à Gram-positif	*Corynebacterium*	*C. xerosis,* *C. matruchotii*
		Actinomyces	*A. naeslundii,* *A. viscosus*
		Rothia	*R. dentocariosa*
		Lactobacillus	*L. acidophilus,* *L. brevis,* *L. buchneri,* *L. casei,* *L. salivarius,* *L. fermentum*
	Coques à Gram-négatif	*Neisseria*	*N. flavescens,* *N. mucosa,* *N. sicca,* *N. subflava*
		Branhamella	*B. catarrhalis*
	Coques à Gram-positif	*Streptococcus*	*S. mutans,* *S. sanguis,* *S. salivarius,* *S. sobrinus,* *S. rattus,* *S. downei,* *S. mitis,* *S. milleri,* *S. oralis,* *S. intermedius*
		Stapylococcus	*S. aureus,* *S. epidermidis*
		Enterococcus	*E. faecalis,* *E. faecium*

Tableau 1 d'après MOUTON et ROBERT, 1994a.

Chapitre 02 :

Généralités sur le biofim

Chapitre 02 : Généralités sur le biofim.

1. Historique :

La découverte des biofilms microbiens est attribuée à l'inventeur du microscope, Antoni Van Leeuwenhoek, le premier qui observa vers 1683 avec cet appareil des communautés microbiennes adhérées à la surface des dents **(Roux et Chigo, 2006).**

En 1978, Costerton et al.Ont proposé les premières hypothèses sur les mécanismes impliqués dans l'adhésion des microorganismes. Ils ont proposé pour la première fois la théorie de « biofilms », qui a expliqué les mécanismes par lesquels les microorganismes adhérent aux surfaces vivantes et inertes et les avantages accumulés par cette niche écologique **(Branger *et al.*, 2007 ; Chalvet de Rochemonteix, 2009 ; Kara Terki, 2014).**

Plus récemment, les études sur les biofilms étaient développées dans divers domaines industriel, environnementale et médicale. Beaucoup de travaux dans les deux dernières décennies ont compté sur les outils tels que : la microscopie électronique à balayage (MEB) ou les technique de cultures microbiologiques standards pour la caractérisation des biofilms **(Donlan, 2002).**

Le terme « biofilm » a été utilisé pour la première fois par **Zobell en 1943 (Figure 07):**

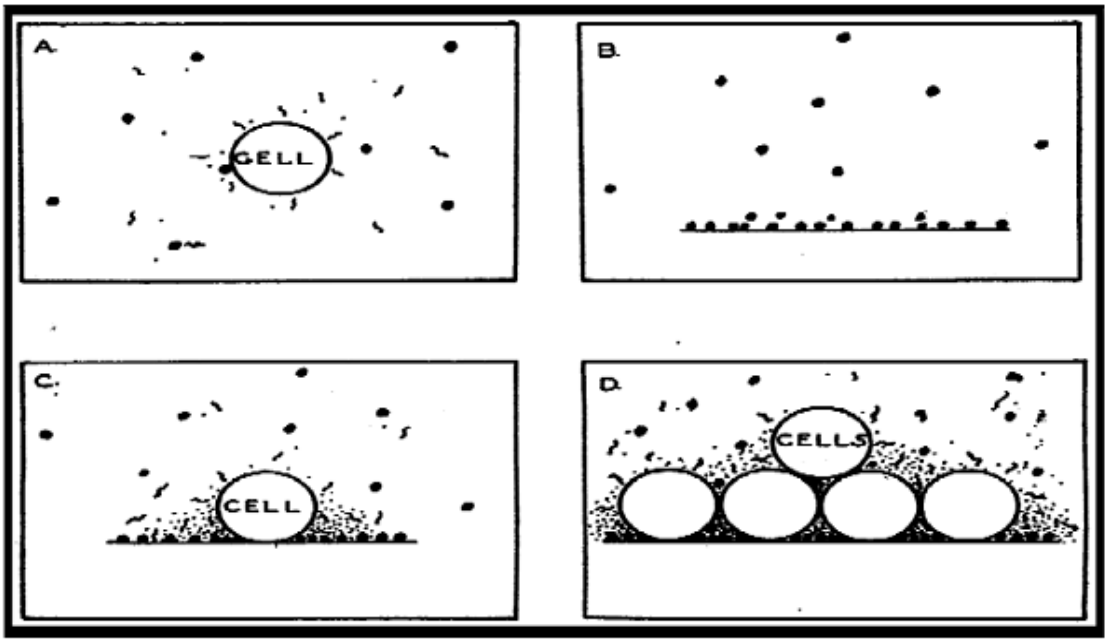


Figure 07 : Schématisation de biofilm par **Zobell, 1943.**

2. Définition :

Il est bien connu que le biofilm bactérien est un agrégat de micro-organismes dans lequel lescellules sont collées les unes aux autres et/ou à une surface. Ces cellules adhérentes sont souvent intégrées dans une matrice auto-produite de substance polymère extracellulaires (EPS) **(Hall Stoodley *et al.*, 2004).**

Dans la cavité buccale en particulier, les biofilms buccaux sont constitués de plus de 700 espèces de bactéries, empêtrées dans une matrice extracellulaire riche en polysaccharide **(Foster et Kolenbrander, 2004 ; Keijser, *et al.*, 2008 ; Paes Leme *et al.*, 2006).** Ces biofilms microbiens spécialisés ont évolué pour supporter l'environnement défavorable de la surface dentaire et de l'épithélium gingival **(Kolenbrander *et al.*, 2002 ; Marsh, 2004).** Pour cette raison, leur développement est le résultat de nombreuses interactions physico-chimiques complexes entre des substrats du tissu oral, des micro-organismes, et des macromolécules adsorbées **(Frias-Lopez et Duran-Pinedo, 2012 ; Socransky et Haffajee, 2002).**

La structure de biofilm améliore la communication bactérienne, l'échange d'éléments nutritifs et l'efficacité métabolique de la communauté. Ainsi, cette structure confère aux bactéries une résistance aux antibiotiques et aux attaques immunitaires de l'hôte **(Bauer *et al.*, 2002 ; Slinger *et al.*, 2006).**

3. Les étapes de formation du biofilm :

La formation de la plaque dentaire peut se décrire schématiquement selon une séquence d'évènements : l'adhésion des bactéries pionnières, la prolifération des bactéries buccales, la formation des microcolonies et le détachement **(Figure 08) (Hojo *et al.*, 2009).** Cependant, le biofilm dentaire est en constant remaniement. Il s'agit d'un processus dynamique dans lequel l'adhésion, la croissance, l'élimination et le rattachement sont continus **(Bouchard, 2015).**

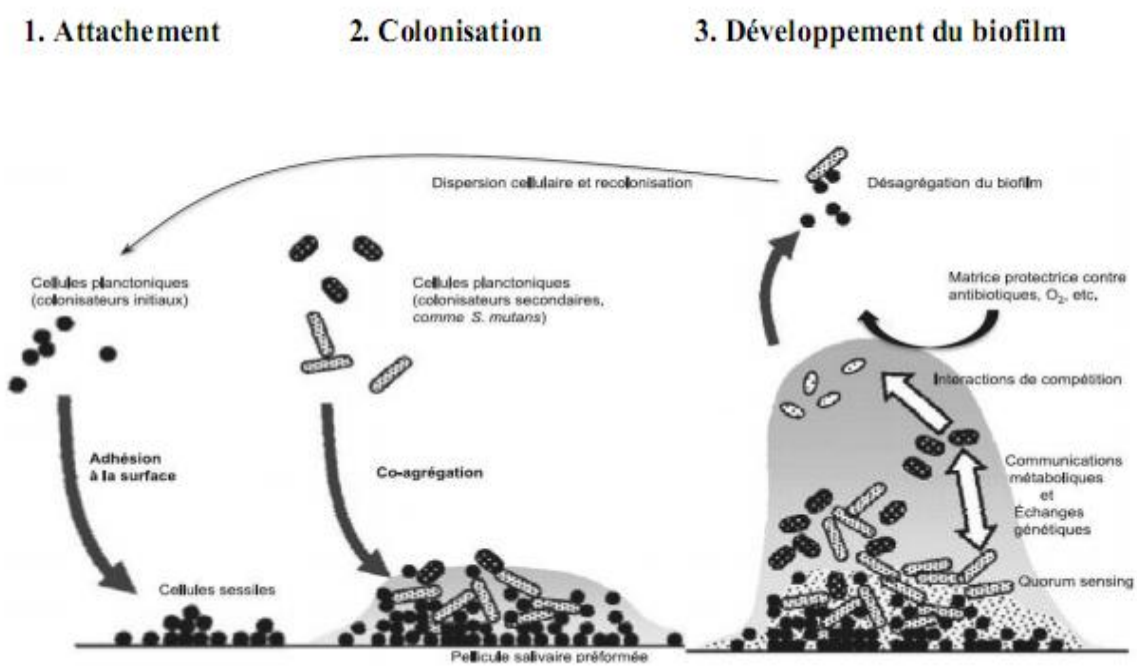


Figure 08: Formation du biofilm dentaire **(Nicolas *et al.*, 2011).**

3.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE) :

L'élaboration de la plaque dentaire dépend préalablement de la capacité des bactéries à adhérer aux surfaces dentaires. Cette colonisation se fait par l'intermédiaire d'un film organique d'origine salivaire recouvrant les surfaces dentaires : la pellicule acquise exogène (PAE). Celle-ci se forme spontanément dés l'éruption des dents et en quelques minutes après leur nettoyage prophylactique. La PAE est principalement composée de glycoprotéines et de protéines salivaires qui se lient à l'hydroxypatite de la surface minérale. Si son rôle est de protéger les dents des agressions mécaniques et acides, elle favorise néanmoins l'installation de la plaque dentaire **(Bouchard, 2015).**

3.2. Phase d'adhésion réversible :

Une adhésion réversible peut s'établir entre la PAE et les bactéries grâces à des interactions physicochimique non spécifique (forces de Van der Waals et forces de répulsion électrostatique). Les micro-organismes sont alors facilement détachables par rinçage **(Bouchard, 2015).**

3.3. Phase d'adhésion irréversible :

L'adhérence devient irréversible lorsque la liaison se fait par des interactions de plus courtes distances (liaison ionique, covalentes ou de ponts hydrogènes) et, surtout, par la

reconnaissance de molécules spécifiques. Différents motifs protéiques de la pellicule sont reconnus spécifiquement par les adhésions d'un nombre restreint de bactéries. Parmi ces colonisateurs précoces, également appelés bactéries pionnières, figurent principalement des cocci à Gram positif et des bâtonnets à Gram positif : *Streptococcus sanguis*, *gondonii*, *oralis* et *mitis*, *Actinomyces naeslundii* **(Li *et al.*, 2004).**

Les Streptococcus buccaux se lient aux protéines de la PAE telles que la stathérine, les mucines, les agglutinines, l'alpha-amylase et les protéines riches en proline, aux moyens de différentes adhésines de la famille des antigènes I/II. De la famille Lral et des protéines fixant l'amylase. De leur coté, les actinomycètes possèdent deux types majeurs d'adhésines portées par des fimbriae : le type 1 se lie aux protéines riches en proline et la stathérine de la PAE ; le type 2 est impliqué dans l'adhérence inter bactérienne permettant le recrutement de colonisateurs secondaires **(Bouchard, 2015).**

3.4. Phase de prolifération :

Une fois fixées sur la PAE, les bactéries pionnières contribuent rapidement à la croissance de la plaque dentaire par division cellulaire. C'est la phase de prolifération bactérienne. De nombreux streptocoques sécrètent une matrice extracellulaire (glycocalyx) composée de polysaccharides, laquelle participe à l'ancrage de la structure en assurant un rôle protecteur et nutritif. La division des cellules adhérentes produit des cellules files qui vont soit être incluses dans la matrice, soit être libérées dans le milieu environnant **(Boucharde, 2015).**

3.5. Phase de maturation :

Les bactéries pionnières vont ensuite permettre l'agrégation de nouvelles bactéries qui n'étaient par capables de se fixer directement à la PAE. Ces conglomérats bactériens s'organisent en microcolonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm dentaire.

Les colonisateurs secondaires ou tardifs sont essentiellement à Gram négatif : *Fusobacterium sp*., *Haemophilus sp*., *Prophyromonas sp*., *Lactobacillus sp*., *Veillonella sp*., et *Treponema sp*. Leur recrutement repose sur les propriétés de co-adhérence bactérienne, c'est-à-dire la capacité d'une bactérie libre de se lier à une bactérie fixée **(Bouchard, 2015) (Figure 09).**

Il fait intervenir des interactions de type ligand-récepteur (protéines de surface-adhésines). Chaque souche bactérienne présente une spécificité de partenaires. Par exemple, certains streptocoques sont capables de Co-agréger avec certains veillonella, tandis que

d'autres streptocoques en sont incapables. *F. nucleatum* peut, quant à lui, se lier à de multiples espèces de sorte qu'il joue le rôle de pont entre les premières bactéries colonisatrices et les colonisateurs tardifs. L'arrivée de nouvelles espèces bactériennes est favorisée par le microenvironnement crée par le métabolisme des bactéries pionnières. Progressivement, le taux d'oxygène du milieu diminue, permettant le développement des bactéries anaérobies. Au fur et à mesure de sa maturation, le biofilm bactérien voit sa composante cellulaire se modifier. La plaque dentaire peut contenir 10^9 bactéries par mg et recenser plus de 500 taxons différents. Le taux de croissance des bactéries durant la phase de maturation est plus lent que pendent la phase de colonisation de la PAE. Après 2 à 3 semaines, il existe un degré de stabilité entre les différents types d'espèces, en dépit des contraintes environnementales telles que le flux salivaire ou les défenses de l'hôte. Cette stabilité ou homéostasie microbienne est le résultat des nombreuses interactions synergiques ou compétitives entre les bactéries **(Bouchard, 2015) (Figure 09).**

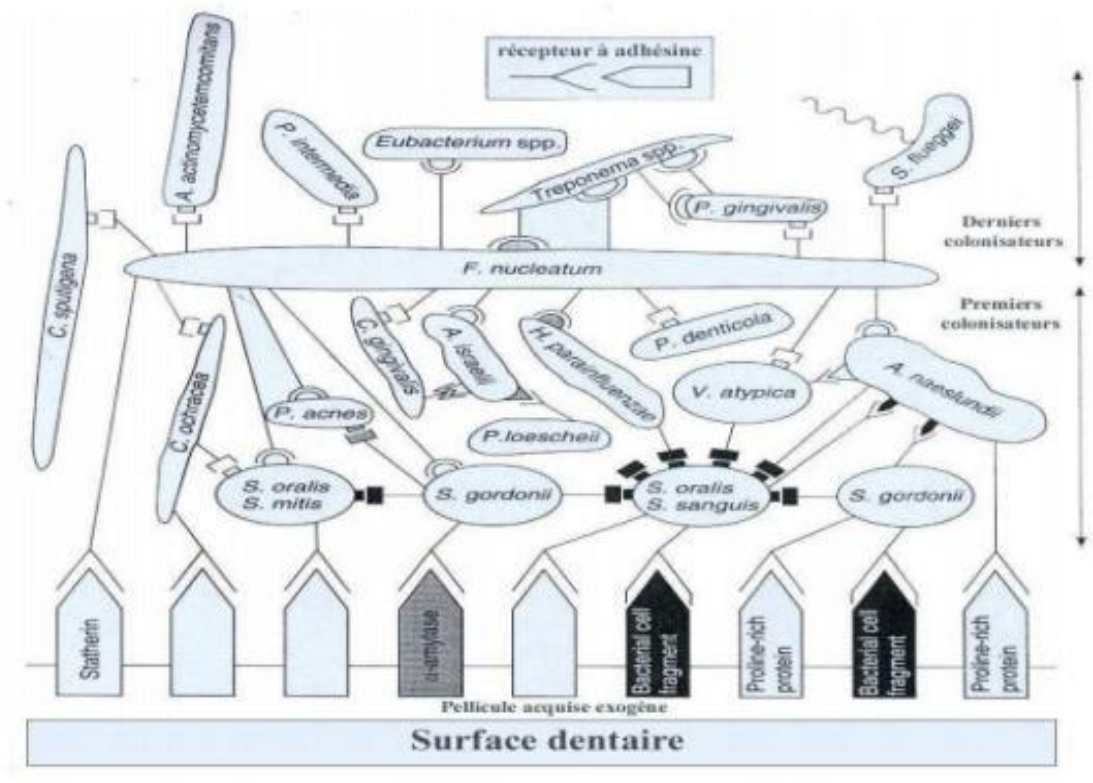


Figure 09 : Représentation de la coagrégation bactérienne dans la plaque dentaire humaine: Les colonisateurs précoces se lient à des récepteurs présents dans la pelliculeacquise à la surface dentaire. Par la suite, d'autres micro-organismes peuvent s'agréger à ce lit bactérien **(Marsh *et al.*, 1999).**

3.6. Phase de détachement :

Lorsque la plaque dentaire est épaisse, elle peut subir un phénomène de détachement bactérien. Sous l'effet de forces de cissaillement, comme celles exercées lors de la mastication ou de la phonation, des microcolonies peuvent se dissocier du biofilm. Par ailleurs, dans des conditions environnementales défavorables, certaines bactéries sont capables de se détacher elles-mêmes de la plaque dentaire. *Streptococcus mutans* peut synthétiser des enzymes qui hydrolysent ses liaisons avec les protéines de surface. Retournant à l'état planctonique dans la salive, les bactéries peuvent coloniser alors des milieux plus propices **(Bouchard, 2015).**

4. Composition et organisation :

4.1. Composition :

Le biofilm est constitué essentiellement de microorganismes et de la matrice qu'ils synthétisent. Les microorganismes représentent 2 à 5 % de la matrice du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire représente 50 à 90 % de la masse organique carbonée du biofilm (**Bellifa, 2014).**

4.1.1. Les microorganismes :

Seuls quelques biofilms sont composés d'un seul type de microorganisme. Ce phénomène est lié aux conditions environnantes, plus souvent qu'à la nature même des microorganismes. Alors que les biofilms naturels sont souvent composés de nombreux types de microorganismes : bactéries, protozoaires, algues, mycètes, chaque groupe exécutant des fonctions métaboliques spécialisées **(Branger *et al.*, 2007 ; Alnnasouri, 2010).**

4.1.2. La matrice :

Elle est composée principalement de :

- **L'eau :** demeure le principal composant du biofilm.
- **Des Exo polysaccharides (EPS) :** éléments structuraux majeurs de biofilm, représente jusqu'à 85% de la masse totale.
- Débris cellulaires (protéines, acides nucléiques).
- Déchets du métabolisme cellulaire.
- Débris issus des matières en contact avec les surfaces (produits alimentaires). **(Branger *et al.*, 2007 ; Bellifa, 2014).**

4.2. Organisation :

Le biofilm est composé d'agrégats de microorganismes séparés par des « canaux aqueux » assurant la circulation de fluides et permettent à la fois l'apport de nutriments à la bactérie et l'élimination de leurs produits de dégradation.

Le biofilm n'est pas un environnent homogène, car il présente des zones à teneurs variables en oxygène ou en nutriments, (qui présentent des valeurs de pH différents), les régions au centre des agrégats bactériens sont généralement anaérobies et pauvres en nutriments, alors que celles situées près des canaux ou de l'interface entre le biofilm et le liquide sont mieux oxygénées et plus riches en nutriments **(Roux et Ghigo., 2006).rad.**

5. Les facteurs favorisant la formation d'un biofilm :

La formation d'un biofilm est un phénomène complexe, sous l'influence de nombreux facteurs : caractéristiques du substrat sur lequel les bactéries vont se fixer, forces s'exerçant dans le milieu aqueux (hydrodynamique du fluide), caractéristiques du milieu et propriétés de la surface des cellules **(Donlan, 2002).**

5.1. Les caractéristiques de la surface :

N'importe quel matériau en contact avec un fluide contenant des bactéries est un support potentiel pour la formation d'un biofilm. La rugosité, les propriétés chimiques d'une surface et la présence préalable de films protéiques influent sur l'attachement des bactéries à cette surface et à la formation d'un biofilm **(De Chalvet et De Rochemonteix, 2009).**

5.1.1. Rugosité de la surface :

Plus une surface est rugueuse, plus la colonisation de cette surface par des microcolonies est importante **(Characklis, 1990).** Les surfaces rugueuses sont colonisées de façon préférentielle car les forces répulsives sont moindres et la surface de fixation est augmentée, grâce à la présence d'aspérités **(Donlan, 2002).** Néanmoins, certaines souches sauvages de bactéries colonisent aussi des surfaces lisses. Les biofilms auront ainsi tendance à se former au niveau des aspérités des matériaux, formant des recoins propices aux proliférations bactériennes et moins sensibles aux agents désinfectants ou antiseptiques **(Donlan et Costerton, 2002).**

5.1.2. Propriétés physico-chimiques de la surface :

Les propriétés physico-chimiques de la surface peuvent exercer une influence sur le taux d'attachement et sur son ampleur. Les micro-organismes se fixent plus facilement à des surfaces hydrophobes et non polarisées comme le Teflon ou d'autres matières plastiques, que sur des matériaux hydrophiles comme le verre ou les métaux **(Bendinger, 2003).**

5.1.3. Présence de films protéiques sur la surface :

La présence de polymères sur un matériau modifie les propriétés physico-chimiques de sa surface, et a une influence directe sur l'attachement de bactéries à cette dernière. En effet, la présence préalable sur un biomatériau d'un film protéique comme le sang, les larmes, l'urine, la salive, le liquide interstitiel et les sécrétions respiratoires influence l'attachement de bactéries à sa surface, et favorise la formation de biofilm **(Nobbs, 2009).**

5.2. Les caractéristiques du milieu :

Comprenant les conditions environnementales telles que : la disponibilité de nutriments (excès ou carence) et les différents stress physicochimiques (pH, température, présence de composés bactéricides, etc.)**(Marchal, 2010).**

A. **La température** : est importante non seulement parce qu'elle affecte l'activité métabolique et enzymatique des bactéries, mais aussi parce qu'elle influence certains paramètres physicochimiques (pH, activité ionique, agitation thermique et solubilité des gaz) ainsi que les propriétés de surface des microorganismes. La température de croissance peut avoir un effet significatif sur la mobilité cellulaire et la production de flagelles et, ainsi sur l'adhésion **(Dumas, 2007).**
B. **Le pH :** du milieu environnant modifie la charge de surface des microorganismes ainsi que celle des supports solides suite au déplacement des équilibres d'ionisation (protonation/déprotonation) des groupements fonctionnels exposés selon leur pKa **(Hamadi *et al.*,2004)** ce qui peut avoir comme conséquence une réduction ou une augmentation des interactions électrostatiques répulsives défavorables à l'adhésion **(Boutaleb, 2007).**
C. Concentration en oxygène, concentration en fer, osmolarité, présence d'ions spécifiques.
D. **Sources de carbone disponibles :** elles ont une influence sur la formation d'un biofilm et sur sa maturation **(Martinez, 2007).**

E. **Concentrations en nutriments :** dans un milieu statique, la concentration en nutriments doit être élevée pour qu'il puisse y avoir formation d'un biofilm ; ce n'est pas le cas pour un milieu hydrodynamique **(Spormann, 2008).**

F. **Hydrodynamique du fluide :** selon la position du matériau dans un fluide, il sera plus ou moins exposé à des turbulences. La zone de moindres turbulences, à l'écart des flux laminaires, est appelée zone de fixation. C'est précisément dans cette zone qu'il est plus facile pour les micro-organismes de se fixer sur une surface, puisqu'ils sont moins soumis aux forces exercées par le fluide **(Donlan, 2002).**

5.3. Caractéristiques des microorganismes :

La plupart des bactéries sont chargées négativement et présentent à leur surface des zones hydrophobes. Cette hydrophobicité influencent l'attachement des bactéries sur une surface; moins les surfaces sont polarisées plus les liaisons hydrophobes deviennent importantes. (**Liesse Iyamba, 2012 ; Bellifa, 2014)**, Cette association stable avec la surface s'établit grâce à des structures adhésives telles que des adhésines filamenteuses (fimbriae, pili) ou non (EPS, capsule,…) **(Perrin, 2009 ; Alyajouri, 2012).**

Toutes les souches bactériennes n'ont pas la même capacité à coloniser les surfaces et de grandes différences existent au sein d'une même espèce bactérienne **(Kukavica-Ibrulj, 2007).**

6. Propriétés d'un biofilm :

Les bactéries qui se développent dans les biofilms ont un certain nombre de propriétés qui les distinguer des populations planctoniques **(Tableau 02).** Dans les biofilms médicaux, il peut être plus approprié de décrit un biofilm par les propriétés phénotypiques et physiologiques microbiennes plutôt que par la structure, les biofilms se caractérisent par leurs populations microbiennes qui s'adapter rapidement à de nouveaux environnements et en présentant une large gamme de phénotypes **(Jass *et al.*, 2003).**

Tableau 02 : Caractéristiques de biofilm bactérien clinique **(Jass *et al.*, 2003).**

Fonctionnalité	La description
Protection	• De la défense de l'hôte et prédateurs • Des agents antimicrobiens (taux de croissance lent, mauvaise pénétration, phénotype modifié).
Acquisition des nutriments	• Dessiccation des nutriments (phénomène de surface, piégeage des nutriments). • Hétérogénéité microbienne et environnementale pour coopération métabolique. • Hétérogénéité spatiale à optimiser le transport de sous-produits et augmenter l'afflux de nutriments
Nouveaux traits	• Plasticité phénotypique (nouvelle expression génique et phénotype bactérien). • Transfert génétique entre les organismes. • Mutation due à la sélection.
Communication intercellulaire	• QS (communication dépendant de la densité) • Communication interspécifique

7. Le biofilm buccale (la plaque dentaire) :

7.1. Définition :

Au XVIIème siècle, Antoine Van Leeuwenhoek est le premier à mettre en évidence la présence d' « animalcules », c'est-à-dire de bactéries, dans la substance blanche qu'il avait récoltée sur ses dents, et qu'il a observée au microscope **(Kaqueler *et al.*, 1998).**

Cette substance est en réalité le biofilm ; que nous appelons aujourd'hui « plaque dentaire ». Celle-ci résulte de l'accumulation de diverses bactéries de la flore buccale (aérobies ou anaérobies), baignant dans une matrice d'origine salivaire et bactérienne, composée d'eau et d'une phase solide. La plaque dentaire est un dépôt mou, terne et de couleur blanc-jaunâtre, qui adhère à la surface des dents et des différents matériaux présents dans la cavité buccale **(Albert *et al.*, 1994 ; Mouton *et al.*, 1993). (Figure 10).**

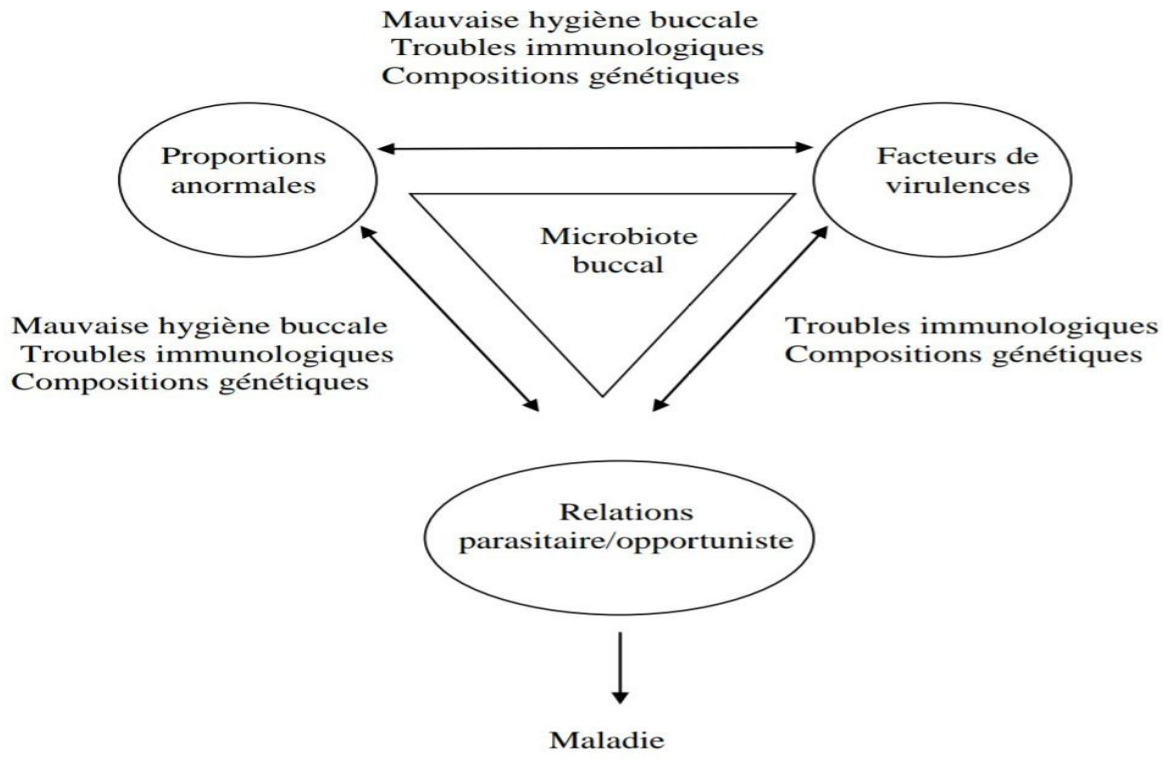


Figure 10 : Cycle des changements écologiques dans le microbiote buccal qui causent la maladie. Une mauvaise hygiène buccale, des troubles immunologiques et certaines compositions génétiques sont des facteurs majeurs qui contribuent au début de ce cycle. Une condition peut conduire les microbes à devenir anormaux ou à acquérir des facteurs de virulence, et à leur tour, activer le reste du cycle et éventuellement la maladie **(Zarco *et al.*, 2012).**

7.2. Rôle de la plaque dentaire dans les pathologies bucco dentaire :

La plaque dentaire est le facteur étiologique majeur des maladies bucco-dentaires **(Loe *et al.*, 1965 ; Walsh 2006; Tonetti *et al.*,2015; Sanz *et al.*,2017).**

Un enseignement à l'hygiène bucco dentaire (technique de brossage efficace, nettoyage inter dentaire) et la mise en œuvre de technique de prévention permet de réduire efficacement l'incidence des caries et des maladies parodontales chez nos patients **(Axelsson et Lindhe., 1981)**.

Dés lors la mise en évidence de la plaque dentaire intéresse l'ensemble des disciplines odontologiques et n'est pas seulement réservée à une pratique spécialisée (parodontologie exclusive) ou à la recherche scientifique.

7.3. Classification des plaques dentaires :

7.3.1. Selon l'habitat :

L'hétérogénéité des types de tissu dans la cavité buccale, tels que les dents, langue et la muqueuse, signifie que différents sites sont disponibles pour la colonisation par des microorganismes oraux. Chaque site possède des caractéristiques uniques et permet à ces microorganismes les mieux adaptés à l'environnement d'habiter le site. La fonction ou le rôle des micro-organismes dans un habitat est désigné comme une niche écologique et un certain nombre de niches écologiques existent dans la cavité buccale, y compris la plaque supra-gingivale, la plaque sous-gingivale et le revêtement de la langue. Ces niches écologiques peuvent être caractérisées par les facteurs environnementaux et les caractéristiques métaboliques de la flore microbienne qui occupent ces sites **(Takahashi, 2005).**

A. La plaque supra-gingivale :

N'est cliniquement détectable que lorsqu'il atteint une certaine épaisseur, il apparait alors comme un enduit blanc jaunâtre localisé tout d'abord le long du rebord gingival. Son identification se réalise soit à l'aide d'une sonde déplacée sur la surface dentaire soit par coloration.

La plaque débutante (moins de 7 jours) est caractérisée par de forte proportions d'espèces des complexes jaune, pourpre et orange, la plaque d'épaisseur modérée contient d'importantes proportions d'*Actinomyces* et d'espèces du complexe pourpre, tandis que les plaques épaisses, matures, contiennent de fortes proportions de complexes vert et orange **(Berceyet *et al.*, 1996 ; Ouhayoun *et al.*, 2012).** La plaque supra-gingivale est la première à se former. Elle se compose de bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif, cariogènes telles que les *Streptocoques mutans, S. salivarius* et *S. sanguis* (aujourd'hui *sanguinis*) **(Walker *et al.*, 2007)** et il est possible de trouver plus de 300 espèces bactériennes différentes dans un biofilm dentaire supra-gingivale **(Moore *et al.*, 2000).**

B. La plaque sous gingivale :

Dans les sites sous-gingivaux, les micro- organismes asaccharolytiques métabolisent les composés azotés provenant du fluide gingival (GCF) et créent un PH neutre et un environnement anaérobie riche en acides gras à chaine courte et en ammoniac **(Takahashi, 2005).**

Fusobacterium et *Prevotella* neutralisent le PH de l'environnement sous-gingival par un métabolisme azoté. Le PH neutre et l'environnement azoté augmente l'activité protéolytique de *Prevotella*et facilite la mise en place des bactéries intolérantes à l'acide, mais parodontopathogènes comme*Porphyromonas gingivalis*.

Beaucoup plus difficilement évaluable cliniquement et qui n'est pas accessible au patient. **(Zijnge *et al.*, 2010). (Figure 11).**

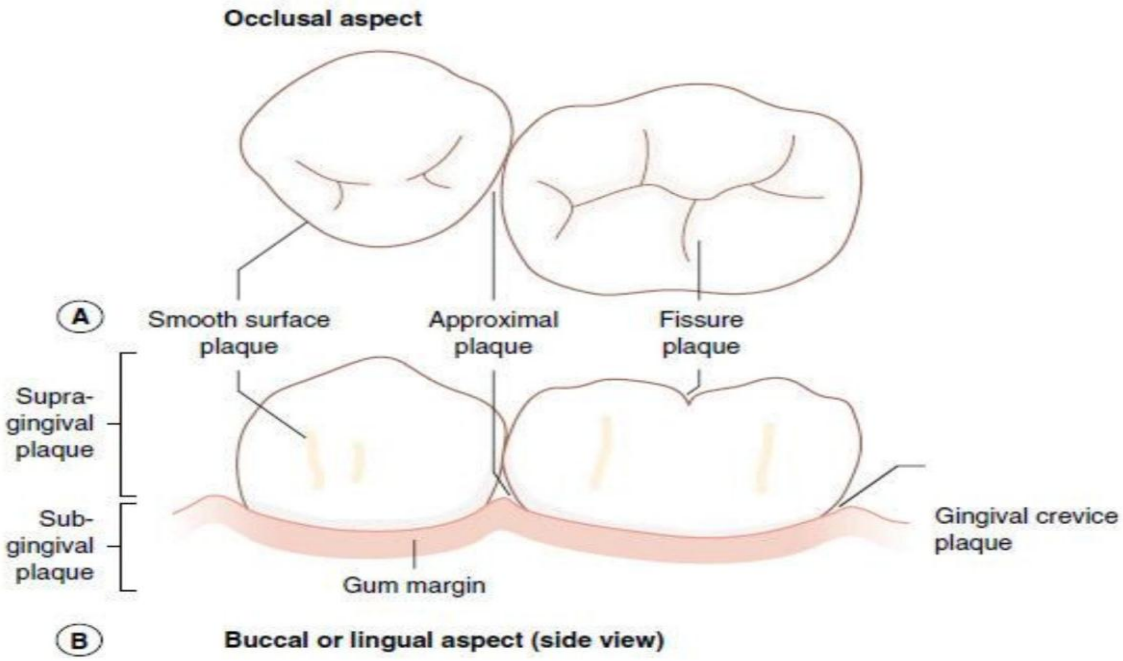


Figure 11 : Diagramme illustrant les différentes surfaces de la dent facilitant la colonisation microbienne **(Marsh *et al.*, 2009).**

C. Le revêtement de la langue :

Dans le revêtement de la langue, l'activité asaccharolytique à l'égard de la cystéine et la méthionine produit des composés de soufre, qui sont les principales causes de la mauvaise haleine.

7.3.2. Selon le pouvoir pathogène :

Loesch *et al.*,(1983) distinguent trois types de plaques dentaires en fonction de leur pouvoir pathogène :

A. Plaque non pathogène :

Compatible avec un état satisfaisant de santé dentaire et parodontale. Cette plaque n'entraine aucune pathologie .Elle comprend essentiellement des bactéries à gram positif appartenant aux genres *Streptococcus* et *Actinomyces*.

B. Plaque cariogène :

Qui se développe lors d'une consommation importante de sucres fermentescibles et qui se caractérise par une forte proportion de *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus* propices à l'acidification du milieu et à la déminéralisation de l'email.

C. Plaque paradontopathique :

Qui se développe dans l'espace gingivo-dentaire.Son contenu bactérienne évolue progressivement d'une flore aéro-anaérobie facultative, composée de cocci à gram positif vers une flore anaérobie stricte à gram négatif. Cette flore est à l'origine de nombreuses maladies parodontales telles que les gingivites et les parodontites.

7.4. La composition bactérienne de la plaque dentaire :

De nouvelles techniques comme l'analyse de la séquence nucléotidique du gène de la sous unité 16S des ARN ribosomaux ont permis d'identifier de nouvelles bactéries incapables de survivre avec les moyens de culture actuels. Ces bactéries représenteraient environ 50% de la totalité de la population bactérienne **(Jenkinson et Lamont, 2005).** Ces techniques ont permis de montrer que la flore sous-gingivale était très diversifiée, que la composition des plaques supra-gingivale et sous-gingivale était différente **(Marsh, 2005).** De même, la composition de la plaque dentaire varie en fonction de la pathologie **(Socransky et Haffajee, 2005).** La plaque dentaire est constituée de colonisateurs précoces représentés à 60% par des *Streptococcus*. Le reste est constitué par des *Actinomyces,* des *Veillonella* et des *Neisseria* **(Jenkinson et Lamont, 2005).** Cette première adhésion implique la liaison entre des composants de la salive adsorbés à la surface de la cavité buccale et les bactéries. Ces composants qui varient selon la composition de la surface (dent ou gencive) déterminentlacomposition du biofilm. La bactérie pionnière dépend donc de la nature des composants qui sont adsorbés à la surface de la dent **(Socranskyet Haffajee, 2005).**Ou, la structure de la plaque est elle-même dépendante de la bactérie pionnière car les associations entre les premières colonisatrices et les autres sont spécifiques. Ainsi, les bactéries du « complexe rouge » comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Treponema denticola*, indicateurs

cliniques des maladies parodontales sont rarement détectées en absence de bactéries d'autres complexes comme le complexe orange (*Fusobacterium*, *Prevotella*) **(Marsh, 2005)**. La composition de la plaque dentaire évolue avec l'état pathologique de la gencive (**Socransky et Haffajee, 2005).** Cela montre qu'avec la progression de la maladie, on observe une diminution du pourcentage des bactéries à Gram positif tels que les *Streptococcus* et *Actinomyces* au profit de bactéries à Gram négatif et plus particulièrement de bâtonnets à Gram négatif **(Lindhe, 1986).**

8. L'homéostasie :

L'homéostasie est un équilibre fragile qui se crée entre l'hôte et la microflore buccale. Elle est donc mise en place d'une part par l'hôte et d'autre part par les microorganismes. De nombreuses études ont été menées pour connaître la réponse cellulaire face à des bactéries pathogènes. Ou, les infections bactériennes sont relativement rares et opportunistes et la plupart du temps, l'épithélium est confronté à des microorganismes bénins ou commensaux **(Mazmanian et Kasper, 2006).** L'épithélium et les bactéries commensales ont évolué ensemble. Ceci signifie que contrairement aux microorganismes pathogènes, les commensaux ont un rôle dans le développement, la fonction physiologique et la santé de l'épithélium. Cette homéostasie met en jeu l'hôte et les microorganismes.

Dans la plaque dentaire, en plus de la production d'acide par des bactéries acidogènes, certaines bactéries peuvent augmenter le pH par la production d'ammoniac à partir de l'urée et de l'arginine **(Burne et Marquis, 2000)**, qui prévoit un mécanisme pour équilibrer la production d'acide à partir de sucres alimentaires par d'autres bactéries et ainsi maintenir l'homéostasie **(Burne *et al.*,2012).**La valeur du pH du biofilm se lèvera à nouveau et la reminéralisation de l'émail peut se produire **(Marquis, 1995).**

9. Régulation de la formation de biofilm :

9.1. Les molécules impliquées dans le quorum sensing :

Les molécules du quorum sensing sont différentes selon les types de bactéries **(Irie et Parsek, 2008).** En général, on trouve des acylhomosérines lactones (AHL) chez la plupart des bactéries Gram négatives. Lamajorité des bactéries Gram-positives utilisent des peptides autoinducteurs (AI), dont lataille est très variable (de 5 à 87 acides aminés). Les molécules du quorum sensingsont dégradées par des enzymes. On obtient par conséquent une ségrégation spatiale des molécules du quorum sensing au sein d'unbiofilm **(Irie et Parsek, 2008).**

9.2. Rôle du quorum sensing :

Le quorum sensing régule la physiologie du biofilm en modulant la taille de la population du biofilm. Il initie les phénomènes de dispersion des bactéries planctoniques à partir du biofilm **(Irie et Parsek, 2008).** Le quorum sensing aurait aussi un rôle dans la détermination de l'épaisseur du biofilm. Il peut réprimer ou stimuler l'expression de certains caractères, comme par exemple la motilité ou certains facteurs de virulence extracellulaires, comme les protéases **(Irie et Parsek, 2008).**

9.3. Altération du quorum sensing :

L'altération des mécanismes de quorum sensing peut aboutir à d'importantes modifications phénotypiques des micro-organismes du biofilm, par exemple une sensibilité augmentée à des antibiotiques ou à des antiseptiques, ou des anomalies dans le cycle de développement du biofilm, surtout lors des étapes de formation et de dispersion **(Irie et Parsek,2008).**

Chapitre 03 :

Les infections bucco-dentaires

Chapitre 03 : Les infections bucco-dentaires.

1. Infections dentaires :

Généralement, l'infection bactérienne peut se propager via deux principales voies : par une atteinte carieuse ou une atteinte sulculaire, parodontale dite aussi marginale **(Schéma 1) :**

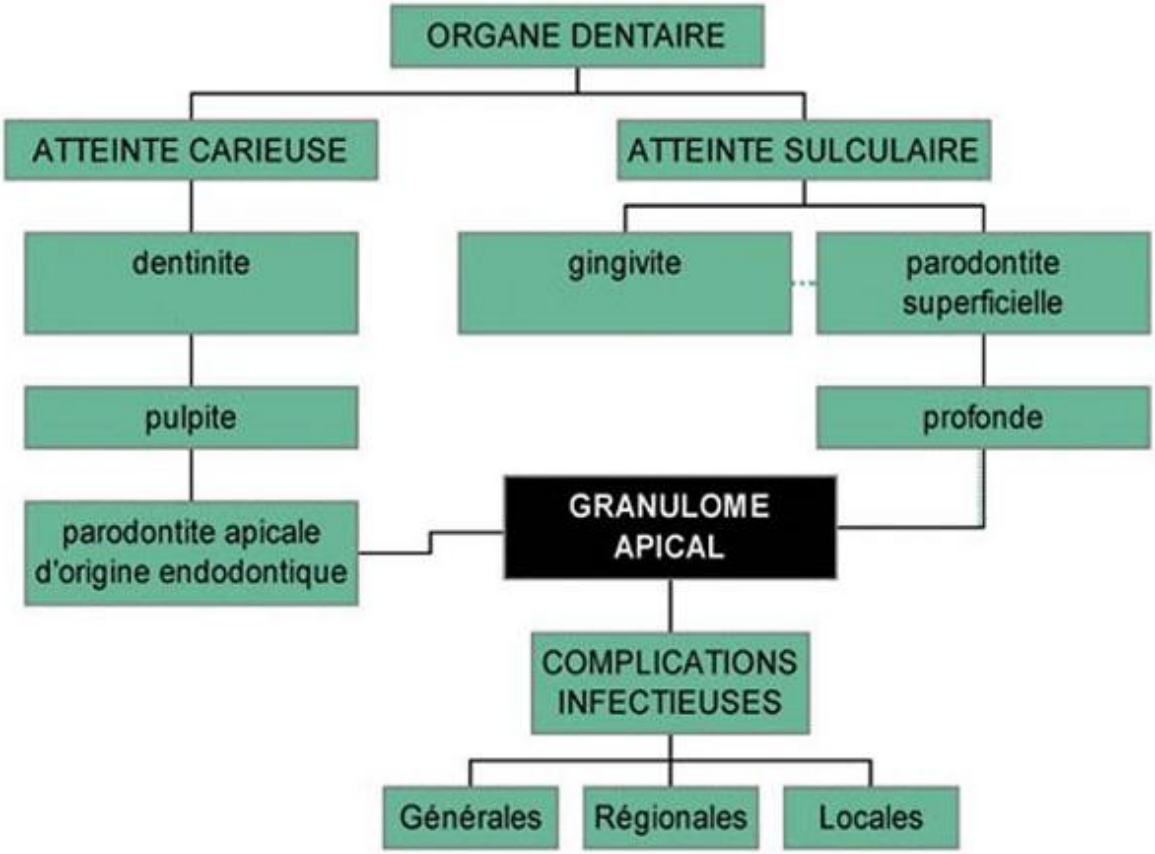


Schéma 1: Les deux voies de l'infection dentaire **(Vidailhet *et al.*, 2008).**

1.1. La carie :

1.2. Épidémiologie :

La carie dentaire est la maladie la plus courante dans le monde, elle touche plus de 95% de la population mondiale **(sixou et colon, 2004**) mais il existe de fortes disparités entre les pays. Selon 60 a90% des enfants scolarisés dans le monde et près de 100% des adultes ont des caries qui entrainent souvent des douleurs et une sensation de gêne. En dépit de l'amélioration de la situation buccodentaire dans les pays industrialisés, il existe de grandes disparités dans leur population. Ainsi, il est admis que 20% de la population regroupe 80% des lésions **(lasfargues et colon, 2009).**La maladie carieuse se concentre sur des sujets à risques. Si les lésions des surfaces lisses vestibulaires disparaissent de nos jours, les lisions des surfaces proximales et des puits et sillons restent fréquentes **(lasfargues et colon,**

2009). Met en avant la sous-estimation de l'état carieux réel, les besoins de prévention et la nécessité d'effectuer un diagnostic de qualité à travers sa métaphore de l'iceberg.En effet, pour cet auteur, les enquêtes épidémiologiques ne reflètent pas la réalité des « caries cachées » car l'examen épidémiologique conventionnel pratiqué de façon générale sans radiographie entraîne des retards de diagnostic **(pitts, 2001).** L'épidémiologie établit clairement que les dentistes devraient de plus en plus s'orienter vers des mesures de traitement Préventives et nom opératoires **(lasfargues et colon, 2009).**

1.3. Définition :

La maladie carieuse ou carie est une affection multifactorielle des tissus durs de la dent. Elle est considérée comme une maladie chronique qui menace tout au long de la vie. Le processus carieux sera le même sur une dent temporaire et définitive. Cette affection pourra avoir de nombreuses répercussions sur la santé générale de l'individu, enfant ou adulte. Considérée comme le troisième fléau de morbidité mondial par l'OMS, c'est une maladie infectieuse et transmissible, la plus courante de la région buccale **(Gagnon J).**

1.4. Localisation des carries :

La localisation des caries va varier en fonction de la denture de chaque individu. Elles se logent préférentiellement dans des espaces difficiles à nettoyer, où la plaque et la flore microbienne pourront se développer sans être perturbés par les moyens de préventions **(Lézy J-P, Prine G).**

Les sièges courant de carie sont :

- Les sillons, fissures et puits occlusaux.
- Le cingulum des incisives supérieures (petite dépression anatomique située sur la face interne).
- Les surfaces dentaires proximales et distales.
- Les collets.
- Les zones d'encombrement dentaire.
- Les zones en contact avec des prothèses amovibles.

1.5. Les facteurs de risque :

- une alimentation contenant des hydrates de carbone fermentescibles.
- un hôte susceptible.
- une microflore buccale spécifique et le temps durant lequel ces trois facteurs sont réunis en bouche pour interagir et provoque une baisse du pH sous le seuil de 5,5 auquel les cristaux d'hydroxyapatite commencent à se dissoudre.

La carie dentaire ne se manifeste que quand ces quatre sont réunis et peut être inactivée par l'absence de l'un d'entre eux. Selon un concept plus contemporain, d'autres facteurs tels les facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux, influenceraient également le développement de la carie dentaire **(selwith *et al.*, 2007).**

1.6. Mécanisme de développement :

Le développement des caries dentaires revient généralement aux habitudes alimentaires, mais les caries ne sont pas classées en tant que maladies nutritionnelles. En effet, la plaque dentaire est fortement affectée par les aliments consommés et précisément les aliments cariogènes qui sont le glucose, le fructose et aussi le saccharose qui présente le plus fort cariogène des sucres fermentés. Ainsi, la dégradation des acides et des sucres contenus dans les aliments agit sur l'environnement buccal en diminuant le pH à la surface des dents engendrant ainsi la déminéralisation de l'émail **(Muller-Bolla *et al.*, 2013).** Dans ce cadre, la richesse de l'environnement buccal par les *Streptococcus mutans* augmente la fréquence d'apparition des caries pour la capacité de ces dernières à produire des polysaccharides extracellulaires à partir du saccharose. En cas de forte déminéralisation, cette dernière devient irréversible favorisant la formation et le développement des caries qui peuvent être coronaires ou bien radiculaires. D'autres aliments sont classés protecteurs des caries, ce sont les protéines connus pour leur action anti-cariogènes et les lipides qui ne présentent aucun effet cariogène **(Haikel Y, 2001).**

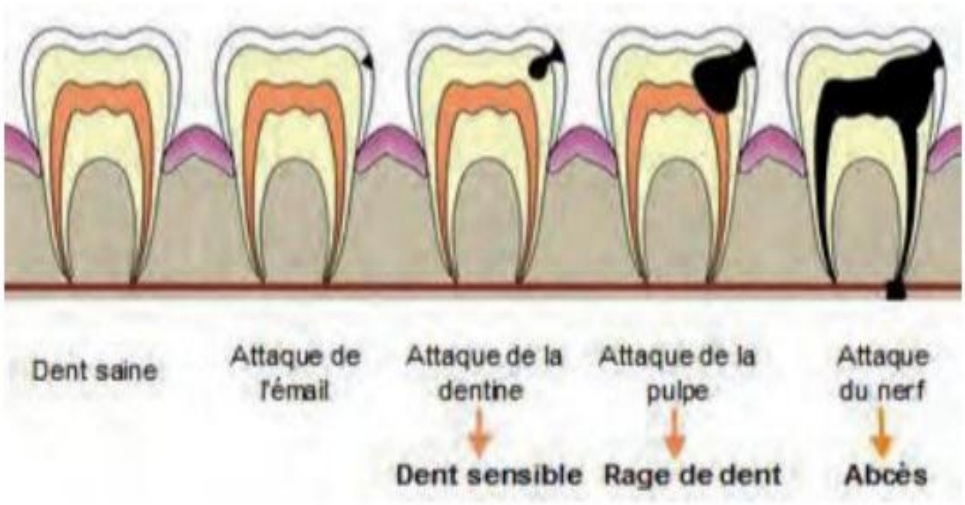


Figure 12 : Evolution de la lésion carieuse.

1.7. La prévention de la carie :

Aucun médicament n'existe qui prévient les caries dentaires, les stratégies de prévention comprennent une ingestion minimale de saccharose, le brossage quotidien, le rinçage de bouche et le nettoyage professionnel (deux fois par jour) pour enlever les plaques dentaires. L'addition de fluorures dans les pattes dentifrice, l'eau potable, les solutions de rinçage de bouche ou leur application protègent les dents contre les acides lactiques et acétiques, réduisant la cariogenèse **(GRARANEDJOUD, 2001/2002).**

2. Infections endodontiques :

Ces infections touchent l'endodonte et aussi le péri-apex ; ce sont des lésions pulpaires. Elles peuvent être primaires ou secondaires, chroniques ou aigue, avec des symptômes ou asymptomatique. Trois principales origines sont derrières ces infections : l'origine parodontale, l'origine traumatique et l'origine carieuse qui reste la plus répandue. Cette dernière intervient faute des toxines et des bactéries qui se développent dans la partie pulpaire. Dans ce cas, les souches les plus fréquentes sont : *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* et *Prevotella intermedia*. Sous l'action des bactéries salivaires, ces dernières atteignent les tissus endodontiques après péri-apicaux suite à un déséquilibre de la flore buccale anaérobique à Gram négatif **(Muller-Bolla *et al.*, 2013).** Dans le cas des inflammations péri-radiculaires aigüe ayant une origine endodontique, les micro-organismes anaérobies sont les plus dominantes, mais on peut trouver des *Streptocoques*, des *Staphylocoques*, des *Entérocoques* et des *Entérobactéries*.

La classification des infections endodontiques porte sur leur site anatomique et le temps de leur colonisation par les microorganismes. Les voies d'infection sont variables :

- **Par ouverture de la chambre pulpaire :** c'est la voie la plus fréquente souvent provoquée par les caries dentaires mais aussi à cause d'un traumatisme pulpaire ou une manœuvre iatrogène ;
- **Par ouverture des canalicules dentinaires :** qui peut être due à des caries, des fractures pulpaires, des restaurations défectueuses, des amalgames de mauvaise qualité, une dénudation radiculaire…
- **Par une infection de parodonte :** généralement sous forme de poches qui peuvent toucher même les canaux accessoires ;
- **Suite à des anomalies dentaires** ; des malformations, des fissures…

3. Microbiologie des maladies parodontales :

Les maladies parodontales ou parodontopathies peuvent être définies comme des affections infectieuses multifactorielles chroniques des tissus parodontaux **(Mankodi *et al.*, 2005). (Tableau 03).**

Tableau 03: Les différentes bactéries impliquées dans les maladies parodontales **(Cavézian *et al.*, 2006).**

Gingivite chronique	**Gingivite ulcéro-nécrotique**	**Péricoronarite**
Streptococcus mitis. Streptococcus sanguinis Actinomyces naeslundii Actinomyces viscosus Canocytophaga sp. Eikenella corrodens Lactobacillus casei Spirochètes (Treponema) Campylobacter rectus Fusobacterium nuc!eatum Neisseria sp. Prevotella intermedia Veilionelta sp.	*Fusobacterium sp Spirochètes (Treponema) Prevotella intermedia Selenomonas sp. Campylobacter rectus Veillonelle sp.*	*Actinomyces naeslundii Actinomyces viscosus Bifidobacterium sp. Eubacterium sp. Fusobacterium nucleatum Micromonas micros Peptostreptococcus anaerobius Prevotella intermedia Prevotella melaninogenica Prevotella oralis Streptococcus mitis Streptococcus sanguinis Veilonella sp.*

Ce type d'infection se déclenche selon différentes étapes qui se résument dans le schéma suivant **(Schéma 02):**

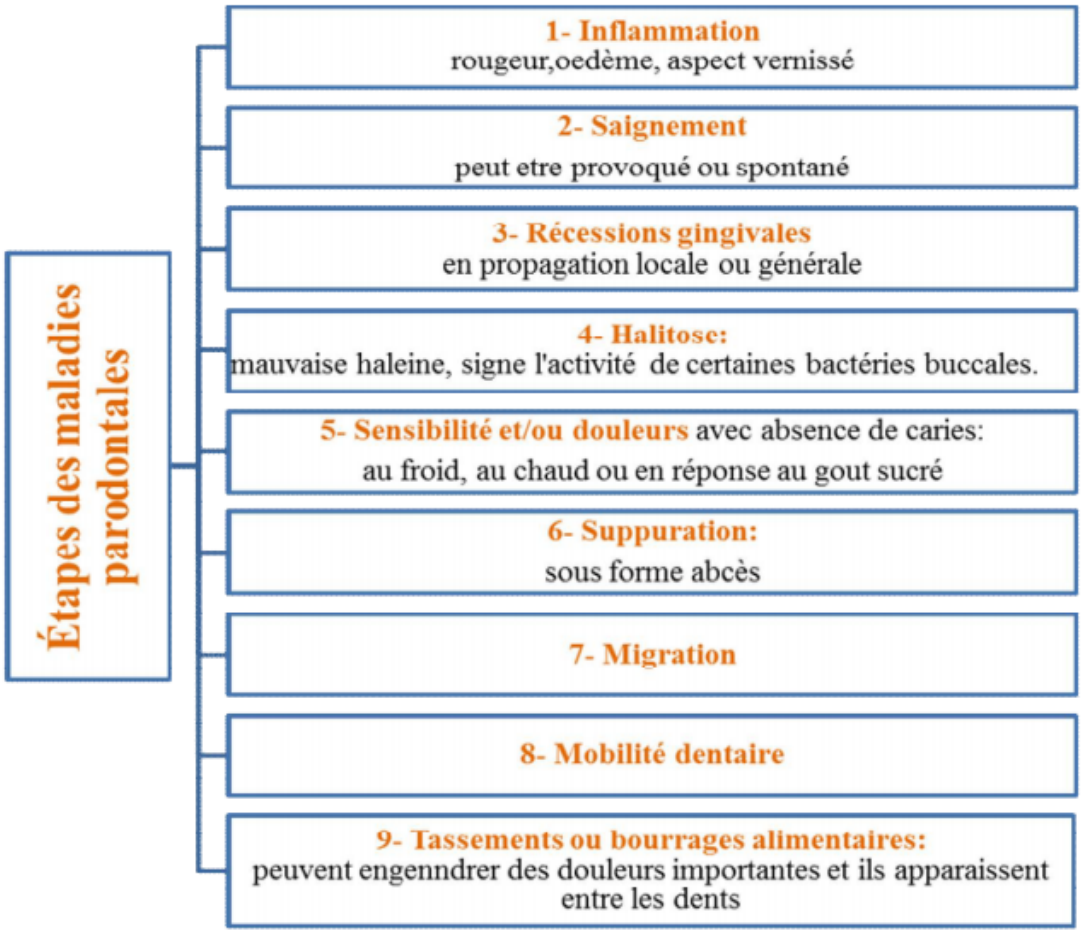


Schéma 02: Principales étapes des maladies parodontales **(Cavézian R *et al.*, 2006).**

Selon l'intensité de l'infection on distingue deux types de maladies parodontales : Les gingivites et les parodontites.

3.1. Les gingivites :

3.1.1. Définition et étiologie :

Ces maladies affectent la partie superficielle du parodonte : la surface épithéliale et le tissu conjonctif. Il s'agit de lésions inflammatoires et réversibles de la gencive. Dans la plupart des cas, les gingivites se localisent entre deux dents mais elles peuvent affecter l'ensemble des dents. Elles sont souvent engendrées d'un excès de tartre **(Figure 13)** qui présente, à côté de la plaque dentaire, une bonne condition et un milieu adéquat pour le développement des bactéries d'ou l'infection de la gencive.

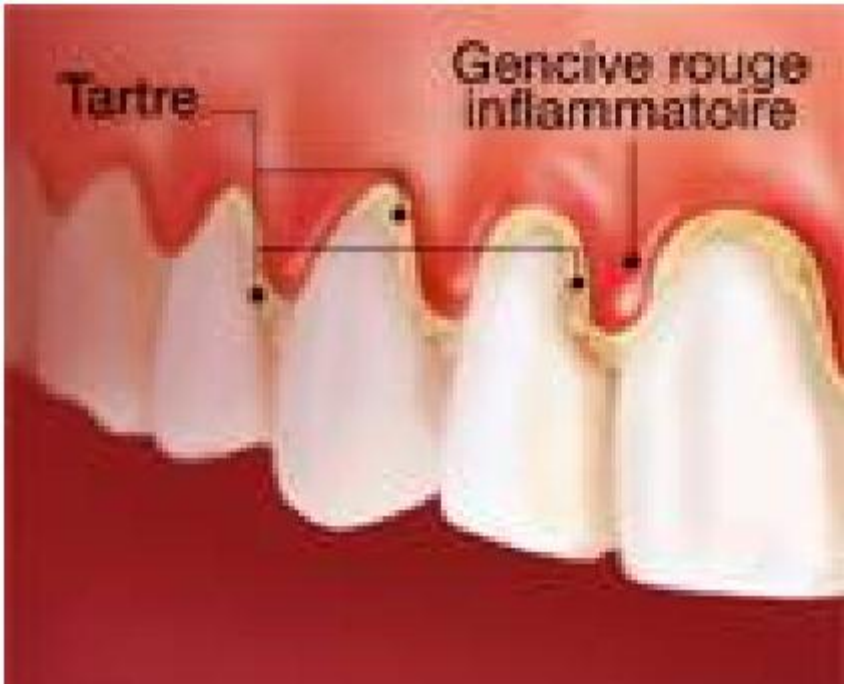


Figure 13 : Gencive inflammatoire **(Lingstrom P *et al.*, 2003).**

En effet, une réaction inflammatoire, de la flore microbienne de la plaque, se développe lorsque cette dernière s'accumule ou produit du tartre faute d'une mauvaise hygiène buccodentaire **(Lingstrom P *et al.*, 2003).** Les bactéries majoritairement responsables de la gingivite sont anaérobies, des spirochètes et des bactéries de type Gram-négatif **(OMS, 2012).**

Ainsi, différents facteurs sont impliqués dans l'apparition de la gingivite :

- Tabagisme ;
- Diabète ;
- Pathologies dermatologiques, pathologies auto-immunes, infectieuses, inflammatoires… ;
- Variations hormonales : ménopause, grossesse, cycle menstruel, puberté… ;
- Prise de certains médicaments ;
- Positionnement de la denture ; - Caries dentaires… **(Lingstrom P *et al.*, 2003).**

3.1.2. Mécanisme de formation :

L'installation d'une gingivite **(Figure 14)** s'effectue en différentes étapes :

- L'apparition d'une lésion initiale dans l'épithélium de jonction suite à l'accumulation de la plaque dentaire au niveau du sulcus;
- La vasodilatation et la migration des lymphocytes vers l'épithélium de jonction atteint;
- L'Aggravation de la lésion en cas de non élimination de la plaque;
- L'accroissement de la vasodilatation et l'augmentation de l'infiltrat inflammatoire;

- L'accentuation de la lyse collagénique;
- La prolifération des épithéliums sulculaire et de jonction;
- L'enfoncement de digitations dans le chorion gingival atteint;
- Et la séparation de la partie épithéliale de la dent et le sulcus devient concret

(Fronty P, 2005).

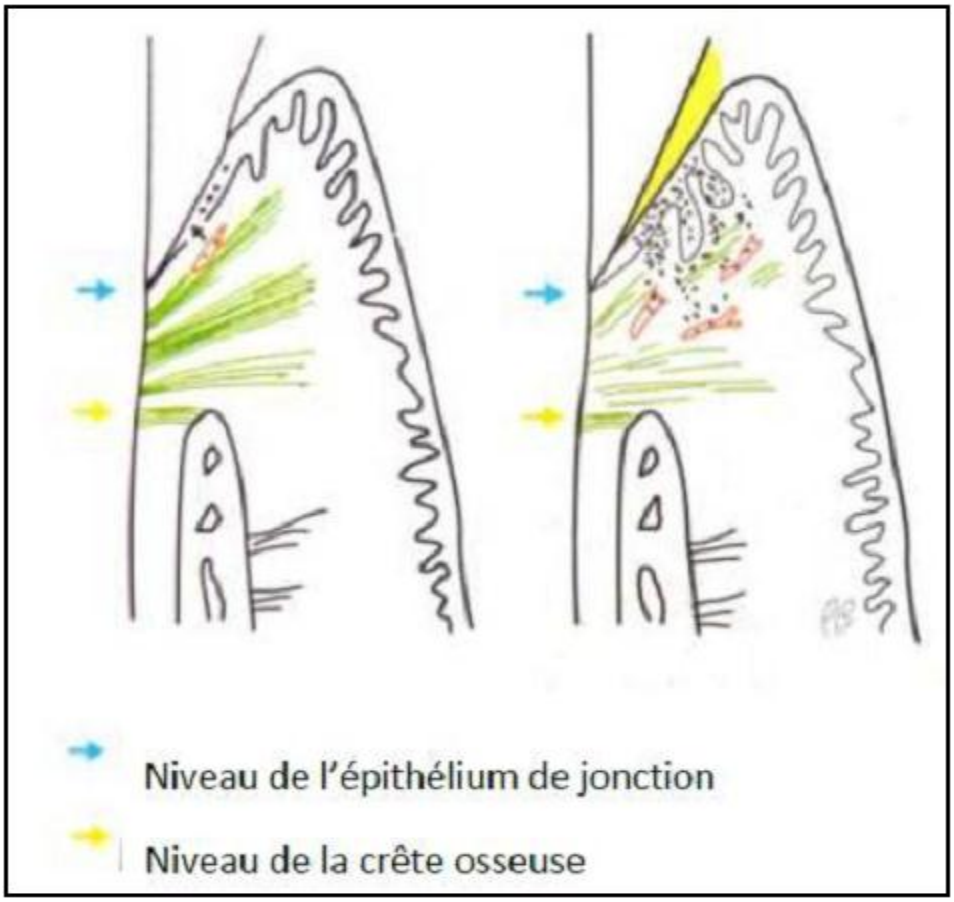


Figure 14 : Formation de la gingivite **(Fronty P, 2005).**

Schéma à gauche : parondonte sain.

Schéma à droite : présence d'une gingivite.

Ainsi, les différences entre gencive saine et une gingivite portent sur un ensemble de caractéristiques : la forme, la couleur, la consistance, la texture, la présence ou l'absence de saignements, et le taux du fluide gingival **(Tableau 04).**

Tableau 04 : Comparaison entre gencive sain et gingivite **(Loe H, Theilade E, & Jensen B, 1965).**

Gencive saine	Gingivite
En forme de couteau, vue de profil	Gonflée et épaissie, vue de profil
Couleur rose pâle	Couleur rouge violacée à lie-de-vin
Consistance ferme	Consistance molle
/	Texture lisse et luisante due à l'œdème (papilles émergeant des espaces inter-dentaires)
Absence de saignement	Saignement spontané et/ou provoqué
Production de fluide gingival réduit	Texture piquetée et mate : « peau d'orange » Augmentation du fluide gingival en fonction de l'inflammation

3.2. Les parodontites :

3.2.1. Définition :

Si la gingivite n'est pas traitée, elle peut évoluer en parodontite, la plaque et sa population bactérienne descendent de plus en plus profondément sous la zone du sulcus (le sillon situé entre le bord de la gencive et la dent). La réponse inflammatoire du corps provoque une rétraction des gencives et ainsi une séparation de la dent. Des espaces qui s'appellent des poches, se forment entre les gencives et les dents. Le contrôle de la plaque dentaire et de la gingivite est efficace pour prévenir la parodontite **(Ciancie, 2003 ; Meurman *et al.*, 2006).**

La plupart des microorganismes intervenant dans ces pathologies sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies stricts (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tanarella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Treponema denticola*) ou capnophiles (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga ochracea* **(sixo *et al.*, 1994). (Figure 15).**

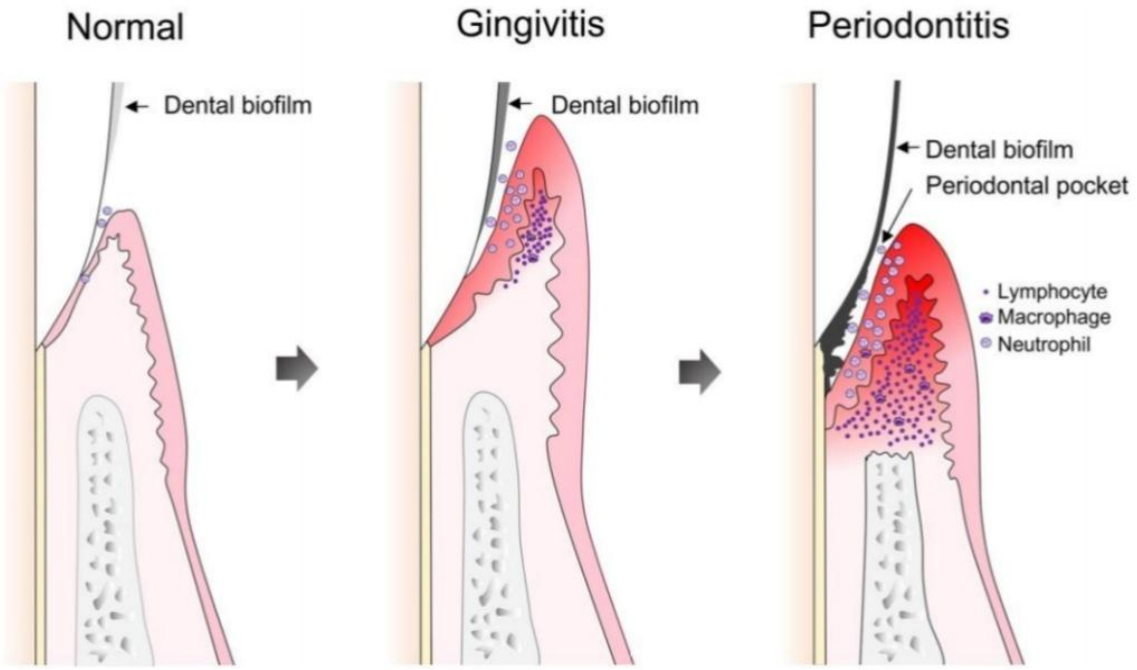


Figure 15 : Développement de la gingivite et de la parodontite **(Kriebel *et al.*, 2018).**

3.2.2. Mécanisme de formation :

Après l'installation d'une gingivite, un parodonte peut avoir lieu. En effet, la plaque dentaire continue à s'accumuler favorisant un environnement adéquat pour une réaction inflammatoire inadéquate, ce qui entraine la pénétration des bactéries parodontopathogènes dans le tissu gingival qui produisent ainsi des enzymes protéolytiques et des métabolites toxiques. Une réaction immunitaire s'installe également participant à la destruction du tissu gingival et par la suite à la migration de l'épithélium de jonction vers l'apex et ainsi la formation d'une poche parodontale qui présente un réservoir de bactéries pouvant donner naissance à un abcès **(Righetti S, 2007).**

4. Abcès parodontal :

L'abcès parodontal est une infection qui s'observe en cas d'une parodontite. Il s'agit d'une poche gingivale œdémateuse **(Figure 16)** pouvant conduire à la destruction du tissu de soutien de la dent en causant des sensations de douleur et un rougissement de la table osseuse **(Abe.S,2006).** Ainsi, le collet de la dent infectée peut se suppurer causant une mobilité ou une extrusion dentaire et dans certains cas une halitose.

L'abcès parodontal peut se localiser soit à la périphérie de la dent en cause, c'est un abcès pericoronaire ou se placer au niveau de la gencive, il s'agit d'un abcès gingival **(Meng**

H, 1999). Son diagnostic reste peu évident selon son aspect clinique qui dépend de différents facteurs tels que la consommation de l'alcool, de tabac, etc. (**Duyninh T, Jame O et coll, 2005).**



Figure 16 : Abcès parodontal **(Abe. S *et al.*, 2006).**

Le traitement des abcès parodontaux reposant sur différentes interventions :

- le drainage via une incision ou une poche ;
- le débridement ;
- La chirurgie pour une extraction dentaire **(Hiam Wehbé *et al.*, 2011).**
- L'administration d'antibiotiques et de médicaments tels que la tétracycline **(JaramilloA *et al.*, 2005).** Lemétronidazole **(Hafstrom C *et al.*, 1954),** les pénicillines **(Smith R &Davies R, 1986).** l'amoxilline ou acide clavulanique et l'azithromycine **(Genco R).**

5. Stomatites :

Les stomatites présentent l'ensemble des inflammations qui s'installent dans la cavité buccale en allant de la lèvre jusqu'à l'oropharynx. Selon son site d'installation, on distingue différents types de stomatites :

- Stomatite des muqueuses buccale ;
- **Chélites :** concernent l'inflammation des lèvres ;
- **Gingivites :** pour l'atteinte des gencives ;
- **Glossite :** inflammation au niveau de la lange ;

- **Ouraline :** pour le palais ;
- **Pharunite :** inflammation du pharynx **(OMS, 2012).**

Généralement, il existe deux types de stomatites :

- **Les stomatites bactériennes non spécifiques :** ce sont les plus fréquentes qui apparaissent suite à une mauvaise hygiène de la denture, d'où la prolifération de la flore buccale commensale conduisant à l'agression de la gencive. Ainsi, ce type de stomatite peut être installé à cause d'une malposition dentaire, des prothèses mal ajustées et du non traitement des caries dentaires.
- **Les stomatites bactériennes spécifiques :** ces stomatites n'apparaissent que rarement. Elles sont originaires d'une infection par une bactérie exogène ne faisant pas partie de la flore buccale. Les lésions qu'engendre cette infection sont soit uniques soit multiples et n'atteignent pas la partie gingivale marginale. On en trouve différents types de ces stomatites et qui sont causées par différentes bactéries :
  - **Scarlatine et érysipèle :** causées par *Streptococcus* pyogenesdu groupes A ;
  - **Stomatite gonococcique** : due à *Neisseriagonorrhoeae* ;
  - **Diphtérie :** stomatite contagieuse causée par *Corynebacteriumdiphtheriae* ;
  - **Fièvre typhoïde** : stomatite engendrée par *Salmonella* typhi.

6. Aphtes :

Un aphte est une infection qui touche fréquemment la cavité buccale et qui due à une nécrose tissulaire. Elle se manifeste sous forme de lésion ulcéreuse, douloureuse et qui engendre une perte qui dépasse la membrane basale des muqueuses atteignant l'épithélium et le chorion.

La taille d'un aphte varie entre 1mm et 1cm et sa forme est souvent ronde ou ovalaire avec des bords nets. Les aphtes ne sont pas contagieux et se caractérisent par un fond recouvert d'un enduit de fibres avec un aspect blanc jaunâtre et d'une base rougeâtre à l'hyperhémie sous-jacente.

Des signes prodromiques peuvent aussi avoir lieu, il s'agit de picotements ou d'une sensation de brûlure qui s'installe généralement avant la survenue d'une tache rouge et puis une ulcération **(Dechaume M, 1960).**

La formation des aphtes passe, donc, par différentes étapes :

- **La phase prodromique :** apparition d'un œdème au niveau du chorion et autour d'un vaisseau sanguin, siège d'infiltration par des globules blancs ;
- **La phase pré-ulcérative :** nécrose de l'épithélium et apparition d'un point jaunâtre au centre d'une macule érythémateuse ;
- **La phase ulcérative :** élimination de la partie superficielle de la nécrose engendrant un fond en forme de cupule ;
- Et **la phase de guérison :** régénération de l'épithélium et disparition de l'ulcération **(Vaillant L *et al.*, 2016).**

Les aphtes peuvent se localiser au niveau de la langue, sur la face ventrale ou latérale, au niveau de la gencive, sous forme d'une petite ulcération, et au niveau de la lèvre, à la surface de la muqueuse interne humide **(Figure 17) (http://aphtes.spondylarthrite-ankylosante.org/aphte-epidemiologie-etiologieetcontextes-dapparitions/).**

Les aphtes peuvent apparaitre suite à :

- **Une infection bactérienne :** causée par une espèce de Streptocoque (*Streptococcus oralis*) ;
- **Une atteinte virale :** différentes virus peuvent être à l'origine des aphtes buccaux. Il s'agit principalement du papillomavirus, du virus herpès simplex, du virus Epstein-Barr, du cytomégalovirus, de l'herpès virus 8 et du virus de l'immunodéficience humaine ;
- **Une inflammation** : un aphte peut se développer suite à une réaction immunologique contre la muqueuse buccale.

Ainsi différents facteurs sont responsables du développement des aphtes, il s'agit notamment de :

- Facteurs génétique ;
- Facteurs environnementaux : stress, perturbations de sommeil,…
- Facteurs traumatiques ;
- Facteurs pathologique ou physiologiques : état hormonal, hypersensibilité alimentaire, carence nutritionnelle…
- Prise de certains médicaments **(https://www.laboratoire-medident.fr/blog/aphtes-comment-soigner-un-aphte-n110;)**.



Figure 17 : Aphte au niveau de la lèvre **(http://aphtes.spondylarthrite-ankylosante.org/aphte-epidemiologie-etiologieetcontextes-dapparitions/).**

7. Prévention et traitement des maladies bucco-dentaires :

La prévention des différentes maladies carieuses et parodontales est basée sur l'élimination de la plaque dentaire portant sur une hygiène buccale conditionnée par apport local de fluor.

Pour la carie dentaire, un brossage efficace depuis le jeune âge d'une première nécessité. Ceci doit forcément être accompagné d'une très bonne hygiène buccodentaire qui porte sur :

- le respect des trois repas journaliers dans des temps bien de tout grignotage ;
- l'apport limité des produits trop sucrés ;
- l'apport équilibré des produits carioprotecteurs :
- la mastication du chewing-gum non sucré en cas de difficulté de brossage.

Dans le cas des gingivites, à côté du brossage efficace et bien respecté, il est apprécié d'utiliser des produits pré-brossage qui favorisent le décollement et la désagrégation de la plaque dentaire. Ainsi, il est préférable d'utiliser des dentifrices anti-inflammatoires et des compléments anti-brossage tels que les bossettes, les filets, etc.

Différentes solutions servant de bain bouche sont recommandées en utilisant des brosses afin d'atteindre les parties difficiles de la bouche et des dents.

L'application des gels et des sprays au niveau de la gencive est aussi conseillée permettant ainsi une antisepsie locale et une réduction de la plaque dentaire.

En outre, l'usage régulier et adéquat du fluor est l'un des éléments nécessaires pour garantir l'efficacité des stratégies de prévention en santé dentaire. L'utilisation des fluors reste sans danger s'ils sont appliqués en doses recommandées. Ainsi, le fluorure de sodium présent dans de nombreux dentifrices est pris par l'OMS comme médicament essentiel inséré dans la liste modèle **(SFCO, 2012).** En effet, les fluorures jouent deux grand rôles préventifs, d'une part, ils favorisent la reminéralisation et limitent la déminéralisation et d'autres part, ils inhibent le métabolisme bactérien **(OMS, 2006).**

8. La propolis et les infections bucco-dentaires :

8.1. Généralités sur la propolis :

8.1.1. Un peu d'histoire sur la propolis :

Par sa biodiversité, elle se révèle aseptisante pour le logis des abeilles. Un corps étranger introduit dans la ruche est tué par le venin, et enduit de propolis. Elle servait autrefois comme anti-infectieux externe, contre les tuméfactions, les indurations et les plaies qui cicatrisent mal **(K. Ghedira*et al.*, 2009).**

8.2. Définition :

La propolis est une substance produite par les abeilles qui constitue un mélange de cire et de matériel botanique comme les bourgeons, les résines végétales. Elle est utilisée par les ouvrières pour colmater les trous et les fissures de leur ruche pour la protéger contre les conditions météorologiques défavorables et comme c'est une substance antiseptique, elle protège ainsi la ruche contre les contaminations bactériennes ainsi que les invasions étrangères **(Philippe 1999 ; Andelkovi B *et al.*, 2016). (Figure 18).**



Figure 18 : Propolis **(Duqueyroix, 2015).**

8.3. La récolte :

8.3.1. La récolte par les abeilles :

La propolis est le nom donné à la substance résineuse qui est collectée par les abeilles à partir de différentes parties des plantes (branches, fleurs, pollen, bourgeons) **(A. dos Santos Pereire *et al.*, 1998)** tout dépendant de la localisation géographique **(G. A. Burdock, 1998)(AS. Pereira *et al.*, 2000)**. Sa couleur varie du jaune pâle au brun foncé dépendant de la source et de son âge. Les abeilles ouvrières collectent cette résine dans les bourgeons d'arbres tels que le bouleau, le peuplier, le pin l'aune, le saule et le palmier. Elle peut aussi provenir des substances sécrétées par les plantes, des substances lipophiles sur les feuilles, des mucilages, des gommes, des résines et des treillages.

Après avoir collecté cette résine des fissures dans les écorces des arbres et bourgeons, les abeilles la mastiquent, des enzymes salivaires sont ajoutées et le produit partiellement digéré est mélangé avec de la cire et utilisé dans la ruche **(G. A. Burdock, 1998)(S. Castaldo *et al.*,2002).**

Cette récolte ne répond pas à des règles bien définies et constantes, elle dépend de nombreux facteurs, parmi lesquels nous pouvons dégager et analyser les notables **(Eric Debuyser., 1984; Docteur Yves Donadieu, 1981).**

8.3.2. La récolte par les apiculteurs :

La propolis peut être récoltée selon des techniques diverses : Par raclage et grattage des cadres ou des parois de la ruche, de préférence à une température assez basse, la propolis, alors dure et friable, se détachant mieux ; Par des grilles spécialement conçues à cet effet. Ce procédé donne une propolis de meilleure qualité **(Debuyser, 1984).** On élimine les déchets les plus grossiers et elle est ensuite dissoute à froid dans l'alcool éthylique à 70 % ce qui permet l'élimination de la cire **(Donadieu, 1981).**

8.4. Composition :

La composition chimique de la propolis varie selon la région, la saison de récolte, les espèces d'abeilles et l'environnement **(Sambou *et al.*, 2020).** La propolis contient plus de 400 substances actives, telles que les acides aromatiques, les esters, les acides aminés, les oligo-éléments et les vitamines. De plus, la propolis contient des composés phénoliques, qui jouent un rôle important dans ses propriétés antibactériennes **(Pobiega *et al.*, 2020).**

La composition globale de la propolis est : 45% à55% de résine végétale et de baume, 25% à 35% de cire d'abeilles, 5% à 10% des huiles essentielles, et 5% de pollen. En outre, la propolis contient divers types d'autres métabolites végétaux secondaires, dont la concentration dépend de la saison, de l'origine de la collection et de la proximité de la ruche avec la source végétale spécifique **(AL aniIssam *et al.*, 2018).**

8.4.1. Résine végétale :

La résine est un constituant majeur de la propolis qui représente 55% de l'ensemble de ses composants, elle est constituée de flavonoides (flavones, flavonols, flavonones et flavononols), et d'acide phénolique (acides caféique, cinnamique, férulique, isofirolique et p-flavononols), qui sont à la base des propriétés anti oxydantes caractérisés par leur capacité à piéger les radicaux libres en utilisant les groupes phénol présents dans leur structure contrant le stress oxydatif commun à de nombreuses pathologies **(Sambou *et al.*,2020).**

8.4.2. Cire :

La cire est un produit pur des abeilles qui peut être synthétisée dans leur abdomen. Pour les colonies, la fonction principale de la cire est de créer des cellules où elles peuvent stocker de la nourriture (miel, pollen) et faire croitre les larves. Les abeilles peuvent également l'utiliser comme adjuvant pour d'autres produits notamment la propolis **(Cardon-Nomblot, 2016).**

8.5. Utilisation de la propolis :

8.5.1. Utilisation de la propolis par les abeilles :

Dans les ruches, la propolis est employée comme mortier de ciment ou baume. Les abeilles utilisent pour **(Ferhoum, 2010) :**

- Remplir les fissures.
- Réduire l'ouverture des trous volants dans les climats froids, et fournir une meilleure isolation thermique.
- Couvrir les corps étrangers qui ne peuvent pas être évacués (souris, cétones, bourdons,etc.).
- Renforcer les parois minces des alvéoles en incorporant la propolis à la cire sécrétée par les abeilles.
- Désinfecter les alvéoles avant la ponte.

8.5.2. Utilisation traditionnelle :

La propolis est utilisée comme médicament depuis l'Antiquité. Elle a été employée en médecine populaire dès 300 av. J.-C. pour la cosmétologie, les inflammations et la cicatrisation des plaies **(Moulin, 2020).**

8.5.3. Utilisation commerciale :

Les apiculteurs collectent et vendent de la propolis brute aux laboratoires pour en faire les différents extraits, qui seront utilisés pour fabriquer divers produits **(Abbad et Ouldamer, 2016).**

8.5.4. Utilisation de la propolis contre les infections bucco-dentaires :

Parmi les nombreux bienfaits de la propolis, son action sur la santé bucco-dentaire est l'un des plus remarquables. Utilisée sous forme de spray, elle vous permet de vous protéger contre les caries dentaires. Vous pouvez aussi vous en servir pour éliminer les aphtes. Grâce à sa composition vertueuse, la propolis peut soigner les petites ulcères et limite le risque de récidive. Cette substance peut aussi lutter contre diverses inflammations touchant la partie buccale : la gingivite (inflammation de la gencive) et la parodontite (inflammation du parodonte).

En optant pour la propolis verte sous forme de spray, vous prévenez ou soignez également les problèmes de sensibilité dentaire. Il s'agit des inconforts que subissent vos dents quand elles sont en contact avec des éléments chauds ou froids. Le médicament agira sur vos gencives en comblant les petits canaux sous l'émail, qui sont à la source de cette sensibilité.

Il faut toutefois savoir que pour bénéficier de ces bienfaits, vous pouvez aussi opter pour d'autres formes que le spray. Vous pouvez par exemple utiliser des bains de bouche, des dentifrices ou des chewing-gums conçus à partir de la propolis. On recommande cependant d'utiliser les produits à bases de propolis bio pour profiter pleinement de ces atouts **(https://www.pharmashopi.com/propolis-spray-pxl-178_720_728.html).**

8.6. Effet indésirable de la propolis :

Le problème avec la propolis est qu'au fur et à mesure que le temps de traitement augmente, le risque d'allergies augmente. De nombreux essais cliniques ont montré que la consommation à long terme peut provoquer des effets secondaires et des réactions allergiques. C'est pourquoi les recommandations des médecins et des chercheurs s'appuient sur l'interdiction de la prendre en continu pendant plus de deux à trois semaines. En effet, les dangers de la propolis peuvent être très désagréables. Jusqu'à présent, il y'a eu plus de 20 effets secondaires, tels que : l'œdème et les allergies cutanées et muqueuses. Tous ces risques sont de nature allergique, mais dans de rares cas, elles peuvent entraîner une insuffisance

rénale (en particulier chez les jeunes enfants ou les personnes ayant des antécédents de maladie) **(Juliette, 2019 ; Shahali *et al.*, 2020).**

8.7. Conservation :

Avant extraction, la propolis est généralement conservée au congélateur (-18°C) avant d'être pulvérisée ou simplement conservée à température ambiante à l'obscurité **(Bonvehi, J. ; Gut iérrez, A. 2011).**

Après l'extraction, les échantillons sont conservés secs, soit à température ambiante et à l'abri de la lumière, soit au réfrigérateur (4°C) ou soit encore au congélateur (-20°C) **(Ahn, M.-R *et al.*, 2007).**

Les extraits sont parfois conservés à l'état liquide, après traitement, en attendant d'être analysés **(Popova, M *et al.*, 2004).**

Comme pour le miel, la propolis devra être conservée à l'abri de la lumière, de l'humidité et de la chaleur afin qu'elle conserve toutes ses propriétés le plus longtemps possible. Sa consommation se fera aussi fraiche que possible.

Chapitre 04 :
Matériel et méthodes

Chapitre 04 : Matériel et méthodes.

1. Objectif d'étude :

L'objectif de notre étude est l'isolement, l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées de la cavité buccale. Notre travail a basé aussi sur l'étude du pouvoir de formation des biofilms bactériens par ces souches isolées.

2. Cadre d'étude :

Ce travail a été réalisé au niveau de deux laboratoires : laboratoire de microbiologie de l'Université Dr Yahia Farés De Médéa et laboratoire d'Etablissement Public De santé De Proximité De Médéa durant 3 mois (de février à avril 2022). Les prélèvements ont été effectués dans un cabinet dentaire privé (clinique Dentaire Bassma) et dans une polyclinique, Chez des patients âgés entre 10 et 58 ans Homme et Femme. Notre travail a porté sur 17 prélèvements des dents caries et de la cavité buccale.

3. Matériel :

Le matériel et les réactifs utilisés dans la partie expérimentale sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 05: Matériel utilisé dans notre travail.

Appareillages	Les milieux de culture	Les réactifs et les colorons utilisés	Autres matériels
- Autoclave - Etuve à 37° C - Réfrigérateur - Microscope optique. - ELIZA. - Spectrophotomètre.	- Gélose nutritive. - Gélose Hektoen. - Gélose Chapman. - Gélose au sang. - Milieu Saboraud. - Bouillon nutritifs. - Milieu TSI. - Citrate de Simmons. - Mannitol mobilité. - Muller Hinton (MH). - BHIB. - Rouge Congo.	- L'alcool. - Violet de Gentiane. - Lugol. - Fuchsine. - Huile d'émersions. - Eau distillé. - Disques d'antibiotiques • **LE 5.** • **VA 30.** • **HLG 120.** • **AT 30.** • **TI 75.** • **P G 10.** • CD^2. • **NIT.** • **AZM.** - Cristal violet.	- Portoir - Marqueur - Etiquettes - Anse de platine - Bec Bunsen - Boites de pétri stériles - Ecouvillons stirilles. - Micro pipette - Tubes à hémolys - Disque d'oxydase. - Sérum humain. - Pince. - Microplaque. **Verrerie :** - Lames et lamelles - Pipettes Pasteur - Tubes à essai stériles



Figure 19 : Vue de la face de l'établissement publique de santé de proximité de Medea.

4. Echantillonnage et technique de prélèvement :

Les prélèvements ont été effectués à l'aide des écouvillons stériles ; ensuite chaque prélèvement est identifié par la fiche de renseignement suivante :

Fiche de renseignement pour un prélèvement bucco-dentaire	
Le numéro :	**la Date :**
Age :	**Le Service :**
Sexe :	
Nature du prélèvement :	
Heure de prélèvement :	**les maladies antécédentes :**

La répartition des prélèvements selon leur origine, le sexe et l'âge despatients est rapportée dans le **(Tableau 06).**

Deux règles importantes sont à respecter :

- Il ne faut pas contaminer l'échantillon prélevé.
- Il faut réduire au maximum le contact avec l'oxygène de l'air.

Les prélèvements concernent des sujets présentant des dents cariées et sujet indemnes de carie dentaire. Un autre prélèvement a été effectué au niveau de lacavité buccale (la langue, la gencive), ces prélèvements ont été soigneusement effectués dans des conditions d'asepsie.

Le prélèvement se fait à l'aide d'un écouvillon stérile pour chaque sujet. Ce dernier doit être frotté sur les surfaces dentaires et inter-dentaires et la cavité buccale.

Tableau 06: Nature et période de prélèvement :

P	**âge**	**Sexe**	**Site de prélèvement**	**Date et l'heure**	**Lieu de prélèvement**
01	10	**E(F)**	Carie dentaire. Cavité buccale.	15.02.2022 à 10 :30.	Polyclinique de Medea.
02	17	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	15.02.2022 à 10 :55.	Polyclinique de Medea.
03	46	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	15.02.2022 à 11 :05.	Polyclinique de Medea.
04	23	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	15.02.2022 à 11 :15	Polyclinique de Medea.
05	58	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 10 :00.	Polyclinique de Medea.
06	21	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 10 :15.	Polyclinique de Medea.
07	58	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 10 :45.	Polyclinique de Medea.
08	16	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 11 :00.	Polyclinique de Medea.
09	52	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 11 :50.	Polyclinique de Medea.
10	10	**E(G)**	Carie dentaire. Cavité buccale.	20.02.2022 à 12 :30.	Polyclinique de Medea.
11	25	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	23.02.2022 à 12 :20.	Cabinet dentaire.
12	43	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	23.02.2022 à 12 :52.	Cabinet dentaire.
13	42	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	27.02.2022 à 10 :20.	Cabinet dentaire.
14	28	**F**	Carie dentaire. Cavité buccale.	27.02.2022 à 10 :41.	Cabinet dentaire.
15	25	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	28.02.2022 à 12 :08.	Cabinet dentaire.
16	25	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	01.03.2022 à 10 :40.	Cabinet dentaire.
17	22	**H**	Carie dentaire. Cavité buccale.	02.03.2022 à 09 :45.	Cabinet dentaire.

E(f) : Enfant fiellete. **H :** Homme. **P :** Prélèvement.

E(G) : Enfant garçon. **F :** Femme.

5. Protocole expérimentale suivi:

Le protocole suivi dans le laboratoire d'EPSP de Médéa est résumé comme suit **(Figure 20):**

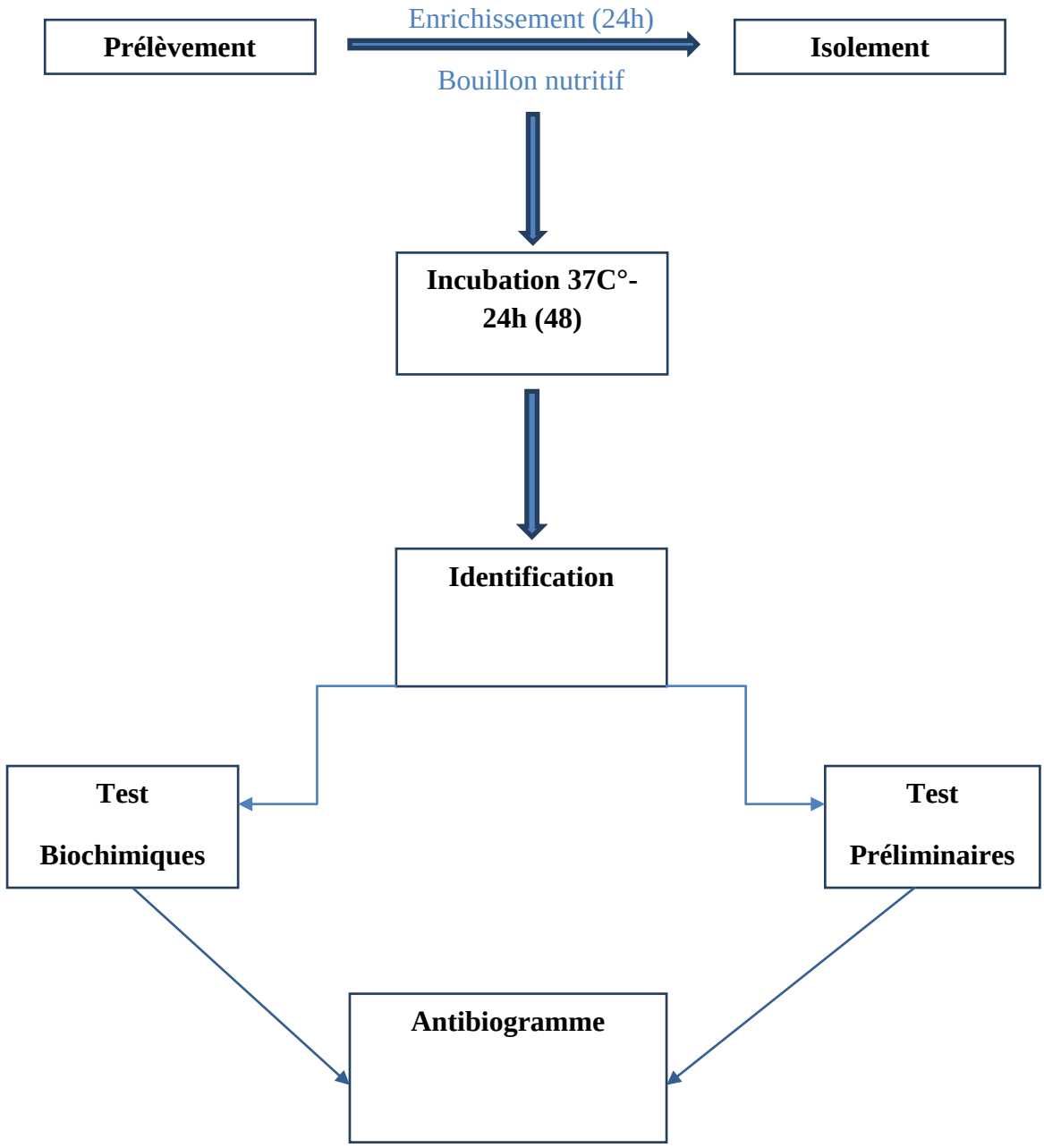


Figure 20 : Protocole suivi pour l'étude du prélèvement de la carie dentaire et la cavité buccale.

6. Isolement des bactéries de la cavité buccale :

6.1. Préparation des milieux de culture :

Les milieux de culture **(liquide et solide)** servent de support pour la croissance des microorganismes en leur apportant les éléments essentiels à leur bon développement. Ils sont

utilisés dans plusieurs domaines notamment l'environnement et médical. Il existe de nombreux types dans lesquels ils diffèrent en compositions et en propriétés tels que milieu de culture empirique, sélectif, enrichi et différentiel. Dans cette étude, ont été choisis les milieux de culture appropriés suivants **:**

6.1.1. Milieux de culture liquide :

6.1.1.1. Bouillon cœur cervelle :

Le bouillon cœur cervelle (BHIB) est un milieu culture liquide, polyvalent riche en produits d'origine naturelle (empirique) utilisé pour la culture des germes exigeants et la recherche de la coagulase libre et la DNAse thermostable des *Staphylococcus*. Il peut aussi servir dans la recherche d'*Enteroccocus*. Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25 °C **(Connie et Donald, 2019).** On utilise se milieu dans cette étude pour évaluation de biofilm sur les 96 puits de microplaque et pour préparer le milieu RCA.

6.1.1.2. Bouillon nutritif :

C'est un milieu de culture liquide largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants et pour conservation des souches. Le milieu en flacons ou tubes se conserve entre 15 et 25 °C. Ce milieu se caractérise par la survie des bactéries par une période plus longue par rapport au milieu solide.

6.1.2. Milieux de culture solide :

6.1.2.1. Gélose Nutritive :

Une gélose nutritive ou gélose ordinaire est un milieu gélosé d'isolement qui permet la culture de toutes les espèces bactériennes de pouvoir pousser, à condition qu'elles soient non exigeantes, autrement dit que les souches peuvent pousser sur un milieu minimum, qui n'apporte que les éléments essentiels à leur développement **(Guillaume, 2004).** Milieu d'isolement utilisé pour la recherche de FMAR (flore mésophyle aérobie revivifiable). **(Vincent, 2008).**

6.1.2.2. Milieux Chapman :

C'est un milieu d'isolement sélectif, différentiel et semi-synthétique des bactéries du genre *Staphylococcus* (bactéries halophiles) cultivant en milieu hypersalé avec la présence de chlorure de sodium et le rouge de phénol **(Connie et Donald, 2019).**

6.1.2.3. Milieu Hektoen :

Un milieu d'isolement de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur ce milieu différentiel. L'identification d'Entérobactéries pathogènes repose sur le non utilisation des glucides (salicine, saccharose et le lactose) présents dans le milieu. Deux indicateurs sont présents dans le milieu, l'indicateur de pH le bleu de bromothymol et la fuschine acide qui se colore en présence d'aldéhyde **(Connie et Donald, 2019).** On observe alors une teinte saumonée si la souche utilise un ou plusieurs des glucides présents.

6.1.2.4. Gélose au sang frais :

L'hémolysine est une toxine qui joue un rôle important dans la pathogénicité. La gélose au sang frais est un milieu riche non sélectif pour l'isolement des bactéries exigeantes quel que soit leur métabolisme. C'est une gélose contenant des globules rouges du sang de mouton, l'hémolyse est un critère d'orientation, notamment pour des différentes espèces de *Streptocoques* et d'*Enterococcus* **(Leboffe et Pierce, 2011).**

6.1.2.5. Gélose Sabouraud :

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes. Dans le cas de prélèvements fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose Sabouraud + chloramphénicol **(Guillaume, 2004).**

6.1.2.6. Gélose Muller-Hinton :

C'est une gélose non sélectif et riche pour la réalisation d'antibiogramme standard, il permet de tester l'action des antibiotiques sur les bactéries non exigeantes par l'ensemencement en nappe **(Gillespie et Hawkey, 2006).**

7. Méthodes d'isolement des souches bactériennes :

Les échantillons prélevés contiennent de nombreux micro-organismes, nous le mélangeons par vortex pour homogénéiser l'inoculum et nous passons par des étapes pour isoler les bactéries que nous recherchons, et toutes leurs conditions doivent être respectées pour obtenir des isolats purs, nous appliquons une série de techniques suivantes:

7.1. Enrichissement :

L'enrichissement a pour but de faciliter la détermination de la présence des microorganismes dans les échantillons prélevés et les développer pour obtenir le plus grand nombre afin d'assurer leur présence et de faciliter leur étude **(Leboffe et Pierce, 2011).** Pour cela, nous réalisons en plaçant chaque écouvillon dans un tube contenant le bouillon nutritif et en le laissant dans l'incubateur pendant 24 h à 37 °C. Tous les échantillons sont numérotés, un code est établi vers l'endroit d'où l'échantillon a été prélevé.

7.2. Mise en culture:

Après la dilution en séries, l'isolement permet de séparer une ou plusieurs souches contenues dans un mélange. On ensemencer la suspension diluée de 1: 100 à la surface d'un milieu solide la gélose nutritive de manière suivent **(Leboffe et Pierce, 2011):**

- Stérilisez une anse en platine ou une pipette Pasteur par la flamme de bec benzène et prenez une suspension bactérienne à partir d'un bouillon nutritif enrichi après 24 h.
- Ouvrir la boîte de pétri et déposer la pointe de l'anse ou de la pipette au point de départ.
- Nous déplaçons l'anse de platine de point de départ, on formant des stries serrées sans rayer la gélose, faisant tourner la boîte à chaque fois pour trouver des endroits ensemençons où les micro-organismes sont répartis différemment.
- Stériliser l'anse ou jeter la pipette, refermer la boîte et la déposer dans l'étuve chez lequel le couvercle est au bas.
- Pendant l'incubation 24 h à 37 °C, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les micro-organismes sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie **(Figure 21).**

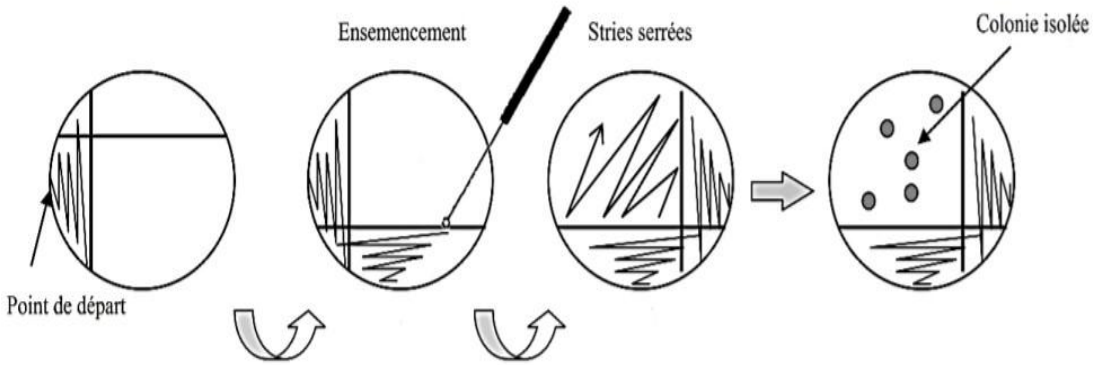


Figure 21 : Isolement des souches sur gélose nutritive.

7.3. Purification :

La purification consiste à effectuer des repiquages successifs sur gélose nutritive, Chapman, Hektoen, Sabouraud, gélose au sang jusqu'à l'obtention de colonies pures bien distinctes et homogènes.

La technique consiste à prélever quelques colonies à partir des géloses utilisées, à l'aide d'une anse de platine préalablement flambée et refroidie, qu'on dispose à la surface de la gélose et on ensemence par la méthode des stries. Les boites de Pétri et les tubes sont mis en incubation durant 37°C pendant 24 à 48 heures **(Bousseboua, 2003).**

7.4. Conservation des souches :

Nous conservons des souches pendant toute la durée de cette étude. Les souches sont cultivées dans des tubes contenant la gélose nutritive pendant 24 h 37 °C, puis ils sont conservés au réfrigérateur à 4 °C pour que nous puissions réutiliser plus tard.

8. Méthode d'identification des souches bactériennes :

Pour déterminerles souches bactériennes, nous passons plusieurs examens à travers les changements qui se produisent dans le milieu de culture et l'observation en microscope optique, ainsi que les résultats de leur interaction avec un groupe de réactifs. Nous classons ces examens en:

8.1. Tests préliminaires :

8.1.1. Examen macroscopique :

L'identification des germes débute par l'observation de l'aspect macroscopique des colonies obtenues à partir des différents milieux d'isolement. Cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie **(Bousseboua, 2003).**

La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

- La taille.
- La forme: bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé, irréguliers.
- L'aspect de la surface: lisse, rugueux.
- L'opacité : opaque, translucide, transparent.
- La consistance : grasse, crémeuse, sèche, muqueuse.
- La couleur et/ou Pigmentation **(Rouaiguia, 2010)(Figure 22).**

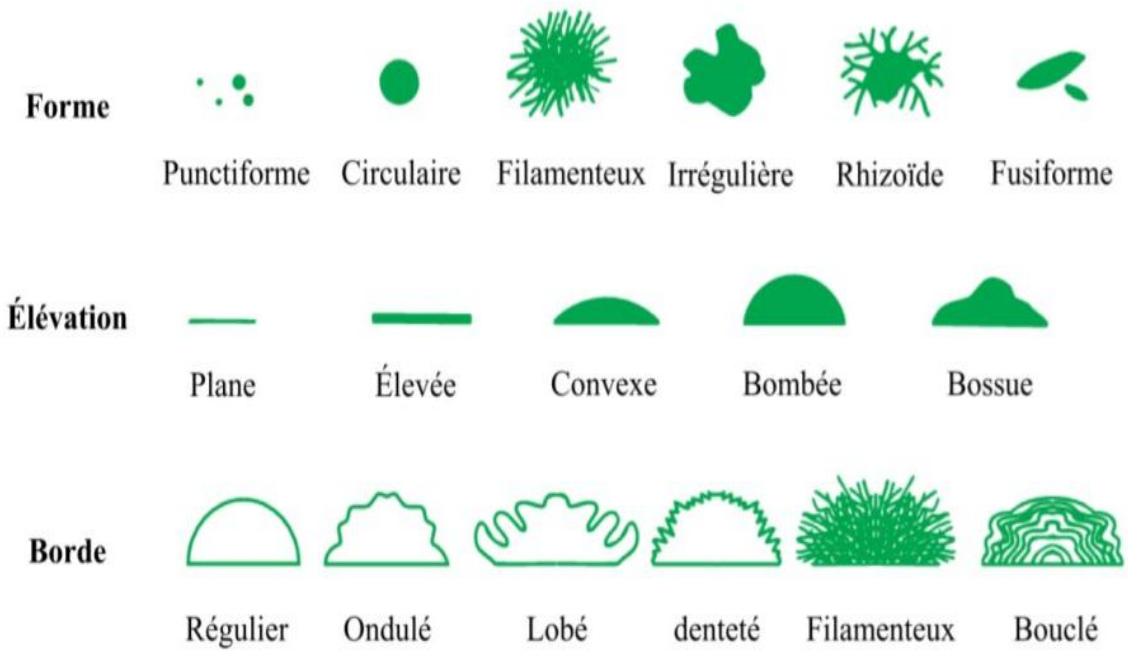


Figure 22 : Différents aspect des colonies sur les milieux des cultures **(Willey *et al.*, 2008).**

A. Aspects macroscopiques clé pour les CGP (cocci gram +) :

Il existe de nombreux milieux de culture différents pour identifier les isolats de *Staphylococcus* et de *Streptococcus* à travers plusieurs propriétés macroscopiques dans le boite de pétri permis laquelle:

a. Mannitol-Sel :

Le milieu Chapman ou (mannitol-sel) contient le chlorure de sodium qui rend cela milieu sélectif pour les Staphylocoques puisque la plupart des autres bactéries ne peut survivre à ce niveau de salinité. Le halo jaune autour des colonies de *S. aureus* est dû à la fermentation du mannitol avec des produits acides finaux **(Leboffe et Pierce, 2011).** La fermentation du mannitol révélé grâce au virage de l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol).

b. Test d'hémolyse :

Le test d'hémolyse sur gélose au sang frais est un critère de sélection très important en milieu clinique **(Figure 23).** Il est utilisé pour différentier les souches de *Streptococcus* et d'*Enterococcus* et la recherche de l'activité hémolytique **(Leboffe et Pierce, 2011).** Après une incubation de 24 h à 37°C, on trouve trois types d'hémolyse **(Gillespie et Hawkey, 2006):**

a. Hémolyse α: en cas d'hémolyse partielle, qui distingue la souche *Streptococcuspnomoniae* le plus abondant et *S. viridans*, *S. mutans*, *S. sanguin*.

b. Hémolyse β: en cas d'hémolyse complète, qui distingue la souche *Streptococcus agalactiae* de group B le plus courant et *S. pyogenes* de group A.

c. Hémolyse γ: qui se caractérise par l'absence d'hémolyse, qui distingue deux souches soit *Enterococcus faecalis* de group D ou bien *Enterococcus faecium*. La confirmation des souches a été réalisée par galerie api 20 Strep.

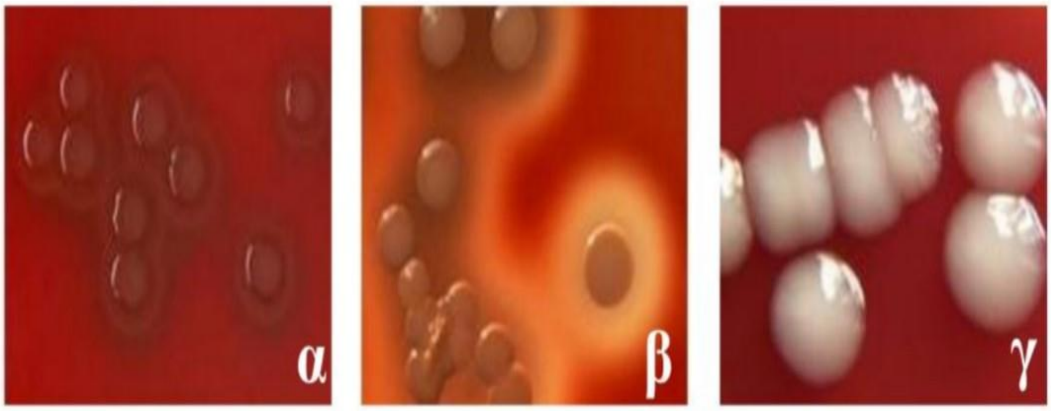


Figure 23 : Différents types d'hémolyse (α, β et γ) sur gélose au sang frais.

B. Aspects macroscopiques clés pour les BGN (Bacille à gram -) :

Il existe des milieux de culture pour les bactéries Gram négatives contient des inhibiteurs pour empêcher la croissance des bactéries Gram positives, qui ont des caractéristiques qui nous permettent de les différencier macroscopiquement:

a. Fermentation de lactose :

Nous avons utilisé des milieux implantaire permettent de différencier les isolats en fermentant le lactose. Les milieux de culture diffèrent en lisant les résultats de la fermentation du lactose sur eux, mais ils donnent plus de validation du résultat, parmi ces milieu : Hektoen.

- **Lactose sur Hektoen:**

La gélose entérique Hektoen (HEA) a un couleur vert et contient des indicateurs de la fermentation du lactose, des colonies jaune saumon chez *E. coli* et des colonies vert a bleuâtre avec oxydase positive chez *Pseudomonase aeruginosa* par exemple **(Bailey et Scott's, 2014).**

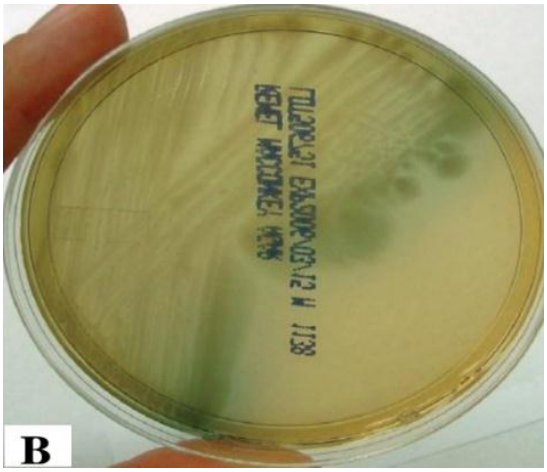


Figure 24 : *P. aeruginosa* lac^- **(Bailey et Scott's, 2014)**

8.1.2. Examen microscopique :

Permet de faire une étude morphologique des cellules d'une espèce microbienne elle comprend :

- Examen a l'état frais,
- Examen après coloration de Gram.

A. Examen à l'état frais :

L'étalement entre lame et lamelle d'une goutte de prélèvement permet de visualiser la présence éventuelle de bactéries, leur forme, leur mode de regroupement et leur mobilité, Il est difficile de s'engager plus sur un résultat uniquement sur cet examen.

B. Examen après coloration de Gram :

La coloration de Gram est un outil de diagnostic précieux utilisé en milieu clinique et de recherche. Bien que plus récent des techniques moléculaires ont été développées, la coloration de Gram est encore une méthode largement utilisée pour l'identification des bactéries inconnues et dans certains cas, il peut fournir une identification présomptive de l'organisme. Il est possible de faire la différence entre les bactéries à Gram positives et à Gram négatives **(Figure 25)**, car il est considéré comme un moyen principal de classer les bactéries **(Brown et Smith, 2015).** Les étapes de coloration de Gram :

- **Coloration primaire:** couvrir un frottis fixé à la chaleur avec violet de Gentiene et laisser reposer 1min.
- Laver brièvement la tâche à l'aide d'une pissette de lavage d'eau distillée et égoutter l'excès d'eau.

- **Mordançage:** couvrir le frottis avec la solution lugol et laisser reposer 45 S.
- Laver le lugol par l'eau distillée.
- **Décoloration:** ajouté l'alcool pendant 15 secondes, mais peut augmenter la période, en notant la dissolution de la couleur de tache sur la lame.
- Arrêter la décoloration en lavant la lame avec l'eau distillée.
- **Contre coloration:** Couvrir le frottis par fuschine pendant 1 minute.
- Laver pendant quelques secondes, sécher avec du papier absorbant et laissé à l'air.
- Examinez la lame avec une goutte d'huile à immersion sous l'objectif x100. Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères :
  - Leur forme (bacille, cocci,…etc.),
  - leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif. Avec cette coloration double, les bactéries Gram-positif apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries Gram-négatif sont colorées en rose.

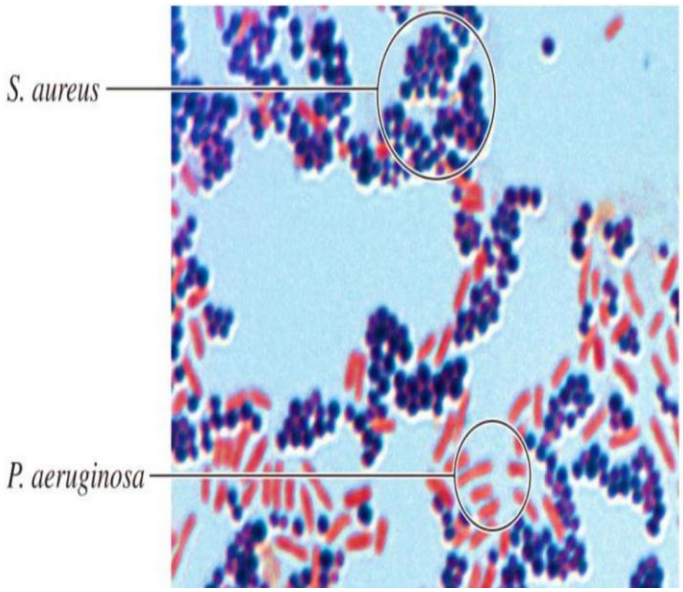


Figure 25 : Coloration de Gram pour quelques bactéries **(Brown et Smith, 2015).**

8.1.3. Analyse microbiologique des bactéries pathogènes :

L'inoculum est prélevé directement à partir de bouillon nutritif est déposé sur un point périphérique de la gélose puis disséminé par stries sur toute la surface. Les boites sont codées puis incubées à 37°C pendant 24 - 48 heures.

A. Recherche des Staphylocoques :

On entend par Staphylocoques à coagulase positive, les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase. Ils sont capables de se développer en 24 à 48 heures à 36 ± 2°C sur un milieu

sélectif Chapman au mannitol qui contient un inhibiteur: fortes concentrations en chlorure de sodium (75g/l) (**Pechère *et al.*, 1982 ; Carbonnelle., 1988 ; Labres *et al.*, 2008).**

Le milieu de Chapman ce qui permet un isolement sélectif des Staphylocoques. La fermentation du mannitol est indiquée par le virage au jaune de l'indicateur coloré, « le rouge de phénol », autour des colonies **(Rodier, 2009).**

➢ Mode opératoire :

On prépare les boites pétries avec le milieu Chapman **(Rodier., 1996).** A partir de la solution mère, on porte aseptiquement 0. 1ml (2 gouttes) dans les boites de Pétri qu'on étale à l'aide d'une anse de platine stérile. L'incubation se fait à 37°C pendant 48 heures **(Ait Kaci *et al.*, 2008).**

➢ Lecture et interprétation :

Après la période d'incubation spécifiée, les Staphylocoques à coagulase positive ou plus particulièrement *Staphylococcus aureus*, apparaissent sous forme de petites colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune (fermentation du mannitol) ou en blanc **(Ait Kaci *et al.*, 2008 ; Rodier., 2009).**

Le tableau suivant résume quelques caractères biochimiques de différentes espèces de staphylocoques **(Tableau 07).**

Tableau 07: Les principaux staphylocoques isolés en microbiologie in **(Sayad, 2008).**

Staphylococcus	*aureus*	*Intermedius*	*saprophyticus*	*epidermitis*
Catalase	+	+	+	+
Coagulase	+	+	-	-
Mannitol en aérobiose	+	-	+	-

B. Recherche des Streptocoques :

La famille des Streptococcaceae comprend sept genres. Parmi eux, *Streptococcus* et *Enterococcus* regroupent la plupart des espèces responsables d'infections humaines. Les caractéristiques communes à toutes ces espèces sont : cocci à Gram positif, non sporulés, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase, ne réduisant pas les nitrates et résistants aux aminosides **(Decoster, 2008).**

➢ Les Streptocoques du groupe D :

Ce groupe est caractérisé par la présence de l'antigène D, qui n'est pas un polyoside mais qui est constitué par l'acide teichoïque de la paroi. Cet antigène D est également présent chez les entérocoques mais des études génétiques ont conduit à séparer le genre *Enterococcus* des streptocoques. Dans le groupe D des streptocoques, il reste *S. bovis*, *S. equinus* et *S.alactolyticus*, qui sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux **(Decoster, 2008).**

Tableau 08 : Les principaux Streptocoques du groupe D isolées en microbiologie In **(Decoster, 2008).**

	Enterococcus			*Streptococcus (D)*	
	faecalis	*faecium*	*durans*	*bovis*	*equinus*
NACL (6.5)	+	+	+	-	-
Maninitol	+	+	-	+	-
Raffinose	-	-	-	+	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Culture à 45°	+	+	+	+	+

C. Recherche de *Pseudomonas aeruginosa* :

On entend par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie qui se présente sous forme de bacille à Gram négatif possédant l'enzyme oxydase. Elle est également une bactérie hautement pathogène et résistante à plusieurs antibiotiques **(Pechère *et al.*, 1982; Pilet, 1987; Labres *et al.*, 2008).**

L'isolement se fait par ensemencement d'un solide sur milieu sélectif King A et King B. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 à 48 heures **(in Rouaiguia, 2010).**

Recherche de la pyocyanine : pigment bleu caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue intense des milieux de culture: sa production est favorisée sur milieu de King A.

Recherche de la pyoverdine : présente une teinte vert fluorescent est souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de King B **(Labres *et al.*, 2008).**

8.1.4. Analyse biochimique :

8.1.4.1. Galeries classiques :

L'identification et la classification des espèces, sont basées essentiellement sur l'étude des caractères suivants:

- recherche de l'oxydase, milieu TSI (Triple Sugar Iron Agar), milieu Mannitol-Mobilité, milieu au Citrate de Simmons **(Lebres, 2004).**

L'identification des souches est réalisée par l'étude de plusieurs tests biochimiques et métaboliques, nous utilisons trois milieux solide qui sont : milieu TSI, milieu mannitol-mobilité et milieu Citrate de Simmons qui regroupent dans le tableau 09.

➢ Préparation de l'inoculum :

Une colonie bactérienne est prélevée, à partir d'une culture jeune de 18-24 h.

➢ Inoculation de la galerie :

A l'aide d'une pipette pasteur, les tubes sont remplis par la suspension bactérienne déjà préparés en évitant d'introduire les bulles d'air.

La série des milieux utilisés est motionnée dans le tableau avec leurs modes d'ensemencement, les caractères recherchés et les résultats attendus. L'incubation se fait à 37° C pendant 24 h.

Tableau 09 : Indentification biochimique à l'aide de la galerie classique.

Tests	Milieux de culture	Mode d'ensemencement	Caractère recherché	Résultat attendu
Test TSI Formation d'acide et gaz à partir d'hydrate de carbone	Le milieu TSI (Triple-Sugar-Iron.).	Ensemencement par piqûre profonde du culot au fil droit et la pente par des stries serrées à l'aide de pipette pasteur. Incubation à 37° pendant 24 h.	Fermentation du glucose. fermentation du lactose. fermentation du saccharose Production d'H2S et de Gaz **(Lebres, 2004).**	- pente jaune : lactose/ saccharose (+). - pente rouge : lactose et saccharose (-). - Culôt jaune : glucose(+). -l'apparition des bulles dans le culot : Gaz (+). -présence de précipiténoir : H2S (+).

Test de citrate de Simmons	Le milieu Citrate de Simmons.	Ensemencement par stries le longitudinale de la pente à l'aide de la pipette pasteur à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile. Mettre à l'étuve24 h à 37°c **(Regam, 2010).**	Utilisation du citrate comme seule source de carbone.	Une culture avec une alcalinisation du milieu : virage de l'indicateur de pH au bleu. -Bleu : citrate (+). -Absence de couleur : citrate (-) **(Carbonnelle, 1988).**
Test de mannitol-mobilité	Milieu le mannitol mobilité	Ensemencement par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur, chargé de culture en milieu solide, nous incubons 24 h à 37°c.	Fermentation de mannitol. mobilité de la bactérie.	- mannitol : Rouge : pas de fermentation de mannitol (-). Jaune : fermentation de mannitol (+). - mobilité : -diffusion : bactérie mobile développe le long de la piqure. -pas de diffusion : bactérie immobile développe seulement dans la trace de la piqure qui demeure fine et nette **(Carbonnelle, 1988 ; Sayad, 2008).**

8.1.4.2. Test complémentaire :

A. Test catalase :

La catalase est une enzyme appartenant à la catégorie des oxydoréductases qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H2O2) en oxygène et en eau. Cette enzyme utilise les groupes hème et manganèse comme cofacteur **(Leboffe et Pierce, 2011).**

$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

Placer une goutte de H2O2 sur une lame propre, puis la mettre en contact avec une colonie isolée, prise directement avec une pipette pasteur ou une anse de platine.

- Si on observe la formation des bulles d'air, les bactéries ont un enzyme catalase.
- Si n'est rien observation, la bactérie n'a pas d'enzyme catalase.

Ce test a pour but de différencier les bactéries à Gram positive, Les bactéries des genres *Staphylococcus* ont un catalase positif tandis que les bactéries des genres *Enterococcus*, *Streptococcus*, possèdes un catalase négatif. La plupart des bactéries à Gram négatif ont une catalase positif et la recherche de catalase sur ce type de bactérie est donc sans intérêt.

B. Test Coagulase :

Le fait que 97 % des souches de *S. aureus* sont coagulase positive et que les autres espèces sont toujours coagulase négative rend le test de coagulase un excellent test définitif pour confirmer l'identification de *S. aureus* **(Brown et Smith, 2015).**

Le test de la coagulase consiste à inoculer un petit tube de plasma avec plusieurs boucles de l'organisme et l'incuber à 37 °C pendant plusieurs heures. Si le plasma se coagule (forme un caillot), l'organisme est coagulase positive. La coagulation peut se produire en 30 minutes ou plusieurs heures plus tard. Tout degré de coagulation, d'un caillot meuble en suspension dans le plasma à un caillot solide et inamovible, est considéré comme un résultat positif, même si cela prend 24 h. La méthode comme suit **(Brown et Smith, 2015) :**

- Etiqueter les tubes à plasma en fonction des boites contenant des colonies ressemblant à des staphylocoques.
- Avec une anse de platine, ensemencer le tube approprié de plasma avec desorganismes des colonies.
- Fermer les tubes et placer dans un bain marie à 37 °C.
- Vérifier la solidification du plasma tous les 30 minutes pour le reste de la période.

Ce test est valable uniquement pour les bactéries à Gram positives ressemblant à des staphylocoques car certains bacilles à Gram négatifs, tels que*Pseudomonas,* peuvent provoquer une réaction faussement positive. Le mécanisme de coagulation dans ces organismes n'est pas dû à coagulase.

C. Test oxydase :

Une oxydase est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydoréduction. Le test de l'oxydase est un test de détection de l'enzyme cytochrome oxydase chez les bactéries à Gram négative qui produisent cette enzyme. Les Disques oxydase sont des disques de papier absorbant imprégnés de N'-tetraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride. En présence de cytochrome oxydase, le N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (incolore) forme un composé coloré en bleu **(Bailey et Scott's, 2014).**

- Placer un disque d'oxydase sur une lame à l'aide un pince stérile.
- Choisir une colonie bien isolée et représentative de la culture fraiche à tester.
- Prélever la colonie choisie à l'aide d'une anse de platine stérile.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration.

Si la réaction est positive, la coloration bleu foncé à violet apparaissant dans une 30 secondes tandis qu'en la réaction négatif n'observe aucun changement de coloration.

D. Tests d'identification de *Candida albicans* :

Ce test est utilisé pour distinguer *Candida albicans* des autres levures. Ceci est le protocole expérimental suivi **(Procop *et al.*, 2017)**:

À l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie de levure est prélevée et émulsionnée dans 0,5 ml de sérum humain. Le tube est incubé à 37 °C pendant 2 h. Ensuite, une goutte de sérum est transférée sur une lame. Cette dernière est recouverte avec une lamelle puis examinée au microscope sous l'objectif ×40. Enfin, on note la filamentation des levures.

9. Antibiogramme :

L'antibiogramme est une technique de laboratoire qui vise à tester la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis de plusieurs antibiotiques. L'antibiogramme permet au médecin de choisir le meilleur traitement antibiotiqueindividualisé contre la souche bactérienne responsable de l'infection. Il est notamment réalisé en cas **(Nauciel et Vildé, 2007):**

- Des infections graves, récidivantes.
- En cas d'échec thérapeutique avec un premier antibiotique.
- Infection chez une personne immunodéprimée ou d'infection nosocomiale.

L'antibiogramme est également utilisé pour connaître l'épidémiologie des résistances (surveillance faite par les autorités de santé) et pour lutter contre les infections nosocomiales.

9.1. Réalisation d'antibiogramme :

A partir d'une culture pure de 24 h à 37 °C sur milieu d'isolement approprie, prenez à l'aide d'une anse de platine stérile quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, placez-les dans un tube à essai contenant de l'eau physiologique stérile de 5 ml et homogénéiser par le vortex. On place la culture de bactéries isolées sur gélose de Muller-Hinton par ensemencement en nappe avec un râteau de pipette pasteur et laissez-le quelques minutes, puis on décanté l'excès de solution à la boite si il est présentes.

Appliquer les disques imprégnés par des antibiotiques à dose connue **(Tableau 10)** à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement, les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boite, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Incuber les boites pendant 24 h à 37 °C, le couvercle toujours en bas.

Tableau 10 : Liste des antibiotiques testés.

Streptococcus		***Staplylococcus***		***Pseudomonas aeruginosa***	
Antibiotique testé	**Charge des disques**	**Antibiotique testé**	**Charge des disques**	**Antibiotique testé**	**Charge des disques**
Lévofloxacine (LE)	5 µg	Pinicilline	10µg	Ticacilline (TIC)	75µg
Vancomycine (VA)	30 µg	Vancomycine		Aztreonam (AZM)	30µg
Gentamicine(HLG)	500µg	Clindamycine	2µg	Gentamicine (HLG)	120µg
Penicilin (P)	10 Ul	Oxacilline	1µg	Tobramycin (TOB)	10µg
Clindamycine (CD)	2µg			Lévofloxacine (LE)	5µg
Rifampine (RA)	5µg			Rifampin(RA)	5µg

Après l'incubation 24 h à 37 °C, on observe des conséquences sur le développement et la survie des souches. De manière générale si l'antibiotique est inefficace, les bactéries pourront tout de même croitre. Au contraire, si l'antibiotique est efficace, on apercevra autour du disque une forme des cercles « zones d'inhibition », où la croissance bactérienne a été inhibée. Il existe ensuite trois interprétions différentes d'antibiogramme par diffusion sur milieu gélosé. Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, puis ils sont comparés aux diamètres critiques rassemblés dans les abaques de lecture. Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée " sensible, intermédiaire ou résistante" après consultation des abaques de lecture, on a **(Walsh et Wencewicz, 2016):**

A. **Bactérie sensible à l'antibiotique (S):** il suffit d'une faible concentration de l'antibiotique en question pour tuer les bactéries et la dose nécessaire est administrable chez l'homme.
B. **Bactérie résistante à l'antibiotique (R):** la dose nécessaire pour tuer les bactéries est beaucoup trop élevée pour être supportée chez l'homme sans effets secondaires majeurs. Un tel antibiotique ne peut donc être utilisé pour traiter l'infection.

C. **Bactérie intermédiaire à l'antibiotique (I):** la dose nécessaire pour tuer les bactéries est tantôt administrable chez l'homme, tantôt dangereuse. Il faut donc considérer que la bactérie est résistante in vivo, c'est-à-dire dans l'organisme.

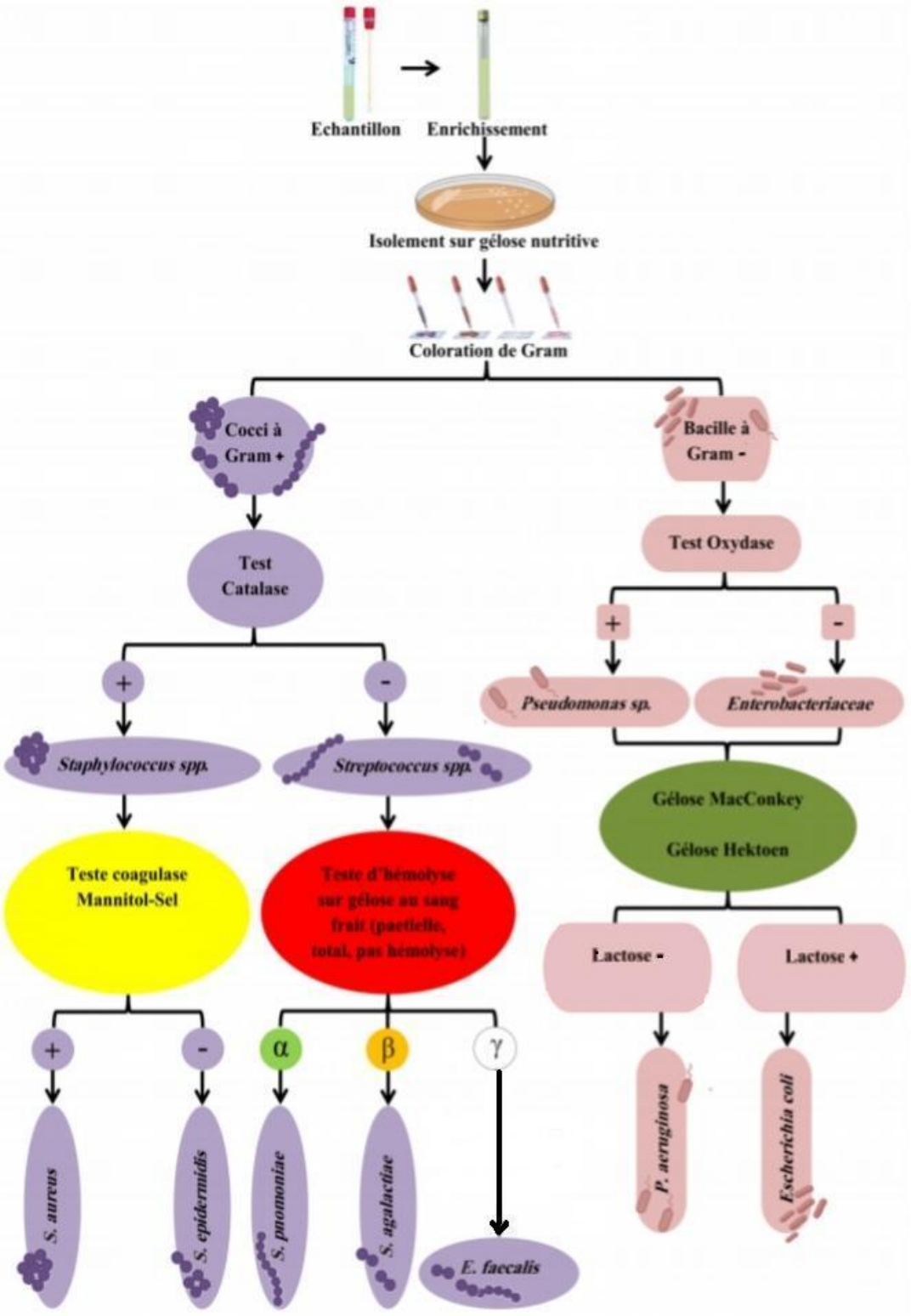


Figure 26 : Protocole d'identification des CGP et BGN.

10. Les techniques d'évaluation de la formation de biofilm in vitro :

10.1. La méthode du Rouge Congo Agar :

La gélose Rouge Congo Agar est un milieu très convenable pour la détection des souches productrices de slime. Sur ce milieu les souches exprimant le PIA (Polysaccharide Intercellulair Adhesion) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatives **(Ziebuhr *et al.*, 2001).**

➢ Technique :

La formation de biofilm a été recherchée sur le milieu Rouge Congo. Ce milieu a été préparé en :

- additionnant 0,8 g de Rouge Congo et 25g de glucose et 37 g de gélose cœur cervelle, 15 g agar à I L d'eau distillé puis autoclavé à 115°C pendant 10 minutes.

Le milieu est ensemencé avec une anse d'une suspension de notre souche (une colonie dans 20 ml d'eau distillée). La lecture a été faite après une nuit d'incubation à 37°C et 24 heures supplémentaires à température ambiante **(Touati *et al.*, 2007).**

➢ Lecture :

Les souches productrices de slime donnaient des colonies noires à surface rugueuse contre **(Figure 27)** des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices. Les souches de phénotype variables donnaient des colonies à centre noir et à contour rouge ou à centre rouge et à contour noir **(Nasr *et al.*, 2012).**

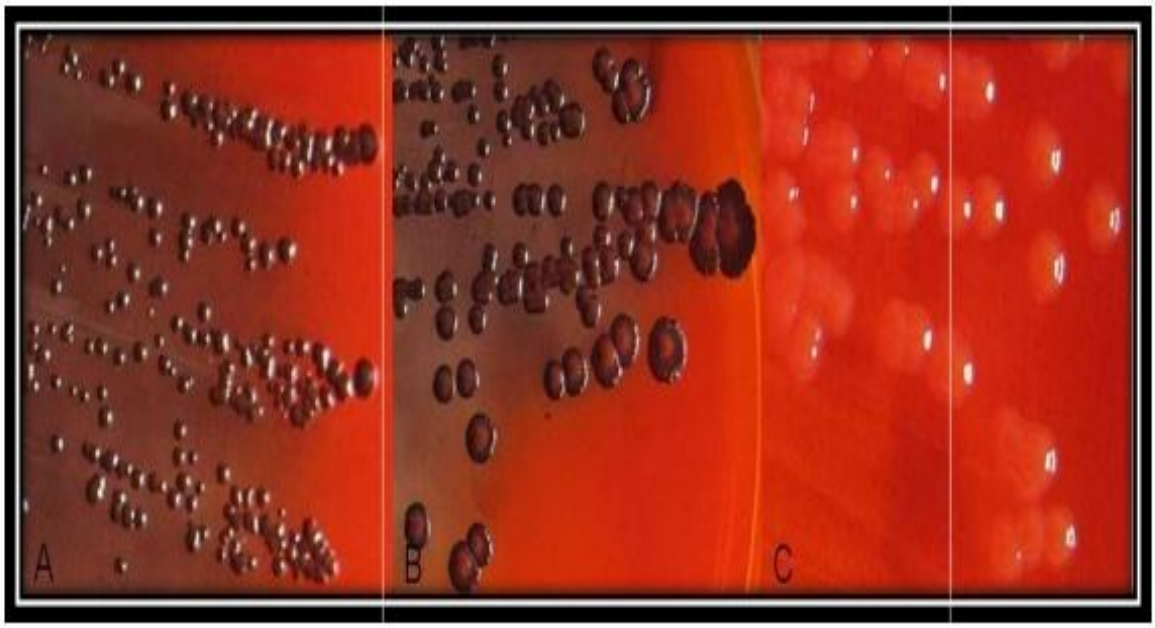


Figure 27 : Culture sur la gélose Rouge Congo **(Hou *et al.*, 2012).**

(A) CRA-positive souche de S.epidermidis (colonies noires).

(B) CRA-positive souche de S.aureus (colonies noires).

(C) CRA-négative souche de P.aeruginosa (colonies rouge).

10.2. Effet de la propolis brute sur la formation du biofilm :

Une gamme de concentrations graduelles de ce produit a été testée pour l'étude de l'effet de la propolis brute (PB) (sous forme d'une poudre commercialisée de wilaya d'Oran) **(Annexe 03 ; Figure 64)** sur la formation du biofilm de *Streptococcus* et *S. aureus.* La poudre de propolis a été aseptiquement ajoutée au Bouillon Cœur-Cervelle (BHIB) aux concentrations de : 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 1.5 et 2% (masse/volume).

10.2.1. Préparation des suspensions bactériennes initiales :

Afin de réaliser ce test, chaque souche bactérienne a été antérieurement ensemencée sur Bouillon Cœur-Cervelle (BHIB) **(Annexe 01).** Les flacons ont été incubés à 37°C pendant 1 heure.

Quelques colonies sont alors suspendues dans le milieu BHIB liquide ; exempte de propolis (BHIB Témoin) ou additionné de différentes concentrations de la PB (BHIB Test). Les densités optiques (DO) des suspensions résultantes sont ajustées à la valeur de 0.20 à une longueur d'onde de 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

10.3. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP) :

Les problèmes de santé publique provoqués par les biofilms sont maintenant clairement définis. Pour prévenir et lutter contre ces biofilms, une meilleure compréhension de leurs mécanismes de formation est nécessaire. De nombreuses méthode d'étude de la formation et du développement des biofilms ont été utilisées au cours des dernières années : des méthodes d'observation par microscopie (microscope à fluorescence, microscope confotal à balayage laser, microscope électronique à balayage) ou des méthodes de numération de bactéries après détachement des biofilms par sonication, frottement ou vortex des surfaces. Ces techniques permettent d'obtenir des informations détaillées mais sont difficiles et longues à réaliser. C'est pourquoi des modèles d'étude in vitro en microplaques ont été développés. Ces tests ont l'avantage d'être relativement rapides et peu couteux. Ils permettent de réaliser de nombreux tests simultanément, notamment pour tester l'effet de plusieurs facteurs influençant la formation de biofilm, comparer la capacité de formation de biofilm de souches sauvages et de souches mutantes, ou encore tester la sensibilité des bactéries au sein du biofilm aux agents antimicrobiens **(Peeters *et al.*,2008).**

➢ Technique

Elle a été décrite en **1985** par le groupe de recherche de **Christensen**, qui a pour but d'évaluer semi quantitativement la formation de biofilm.

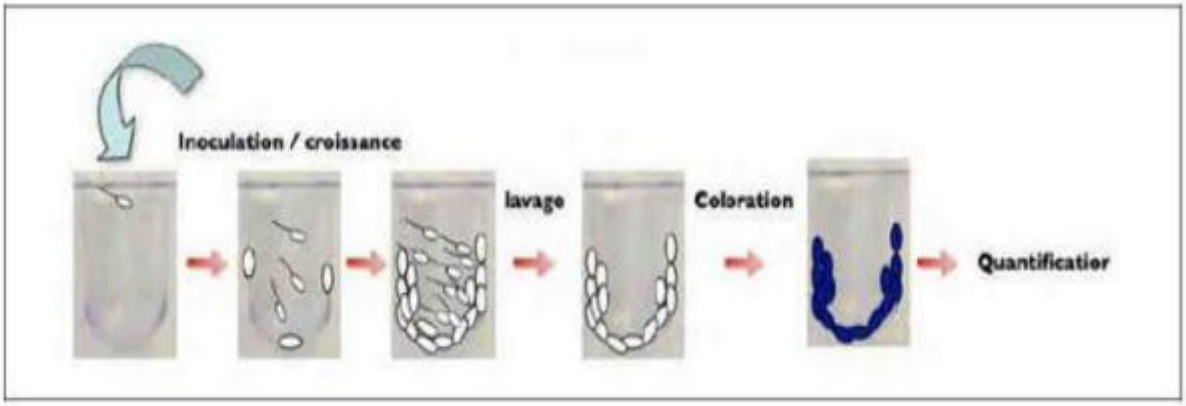
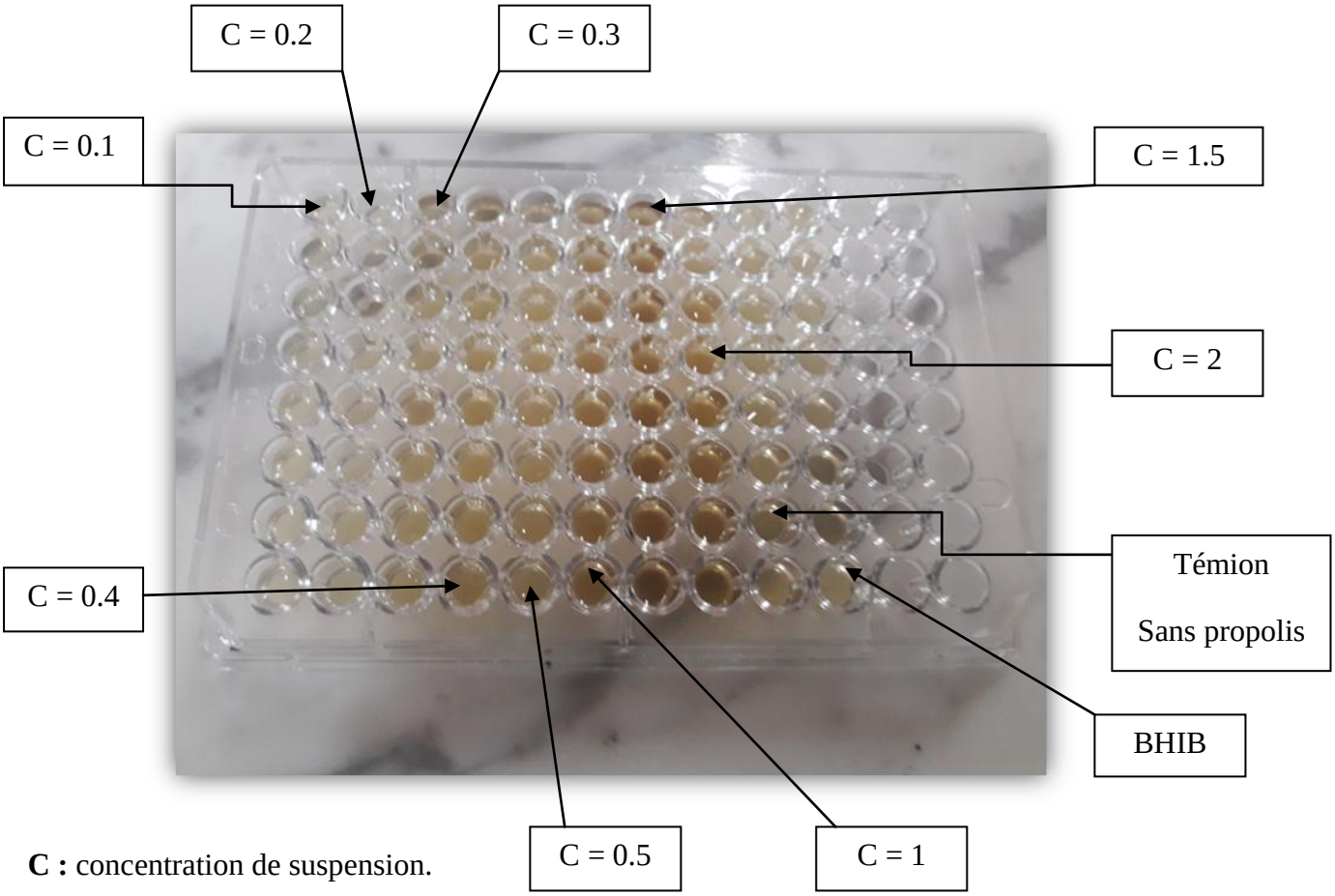


Figure 28 : Principe des techniques de quantification des biofilms en microplaques **(Laurent, 2011).**

A partir d'une culture d'une heure cultivée dans le milieu BHIB (Bouillon Cœur cervelle) aditionée de Propolis brute de différentes concentrations (0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.4 ; 0.5 ; 1 ; 1.5 et 2% m/v) des deux bactéries etudiées, les puits d'une microplaque de 96 puits

(polystyrène) ont été inoculés avec 200 µl de chaque suspension bactérienne. Des puits contenant des suspensions bactériennes sans propolis ont été utilisés comme témoin positif, et des puits contenant le milieu BHIB seul non inoculé et sans propolis ont été utilisés comme témoin négatif.



C : concentration de suspension.

Figure 29 : Technique de formation de biofilm sur microplaque de Titration **(Photo personnelle).**

Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37C°. Les puits sont lavés trois fois avec 0,2 ml de l'eau physiologique stérile afin d'éliminer les bactéries libres (planctoniques). Les biofilms formés par l'adhérence des organismes sessiles sont colorés avec du cristal violet (0,1%) pendant 10 min (le cristal violet est une petite molécule qui diffuse à travers les membranes bactériennes et pénètre à l'intérieur des bactéries pour se complexer aux molécules chargées négativement) L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée stérile et les plaques sont laissées à température ambiante pour séchage **(Stepanovic *et al.*, 2000).**

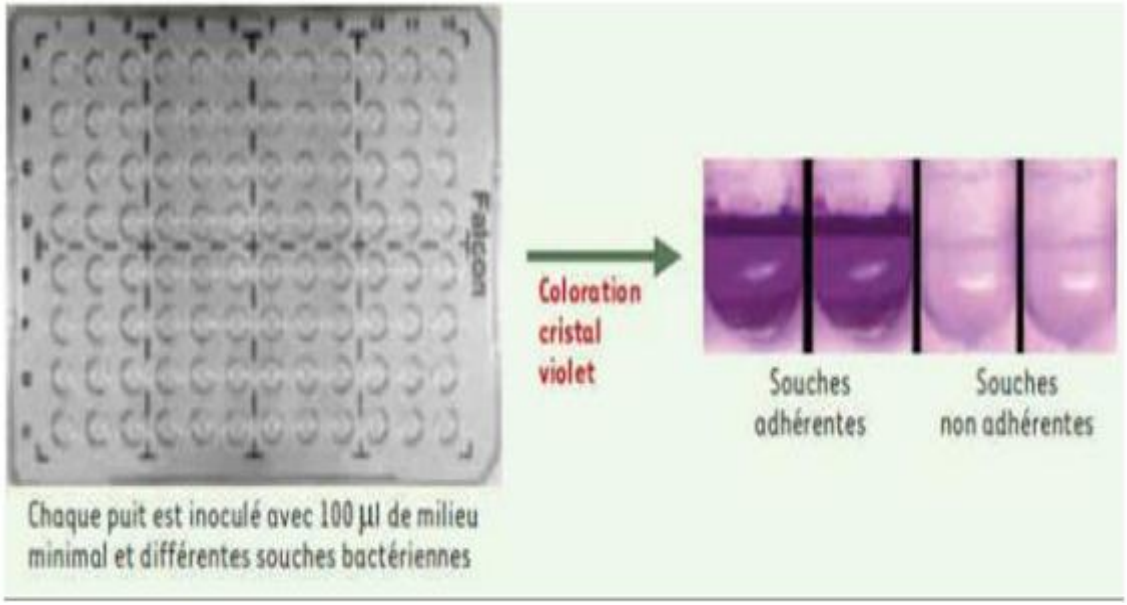


Figure 30 : Principe de la mesure de la biomasse par la méthode de TCP **(Filloux et Vallet, 2003).**

L'excès de colorant est ensuite rincé par un lavage en profondeur avec de l'eau distillée et les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm en mesurant la densité optique au moyen d'un lecteur ELIZA a une longueur d'onde 590 nm **(Hola et Ruzicka, 2011).**

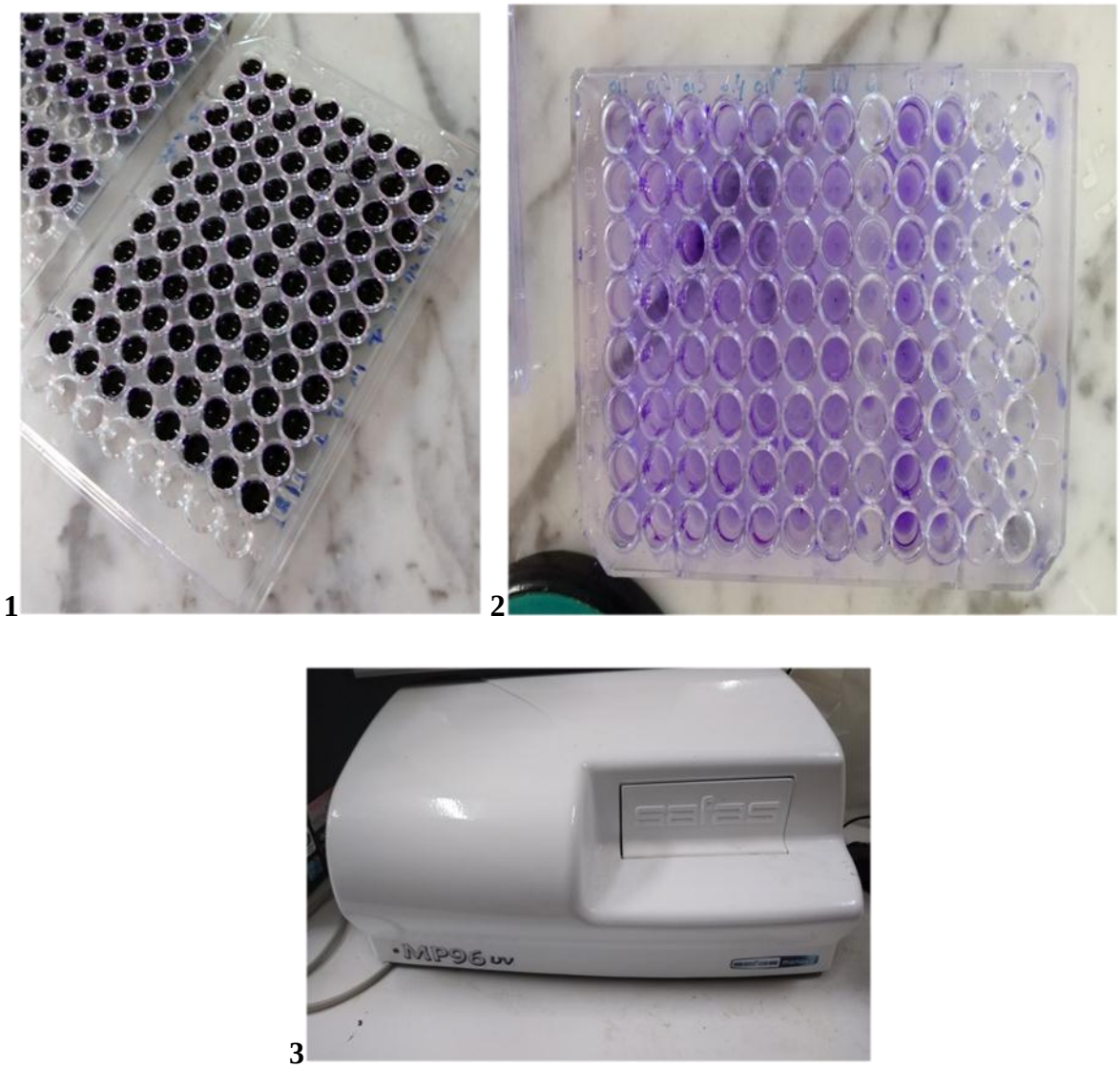


Figure 31 : Détection et lecture de biofilm par méthode TCP **(Photo personnelle).**

1 : coloration par CV.

2 : Rinçage par l'eau physiologique stérile.

3 : Lecture de microplaque par un lecteur ELIZA (mesurer la DO).

- **Lecture :**

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin **(Hola et Ruzicka, 2011).** Les souches ont été classées comme suite **(Stepanovic *et al.*, 2000) :**

DO ≤ DOt (Témoin) : non formatrice du biofilm ;

DO x 2 ≤ DO ≤ DOt x 4: Modérée ;

DOt x 4 ≤ DO : Fortement formatrice du biofilm **(Christensen *et al.*, 1985) .**

Chapitre 05 :
Résultats et discussion

Chapitre 05 : Résultats et discussion.

1. Résultat de l'enrichissement :

Après incubation pendent 24 h, un trouble a été observé dans les tubes inoculés **(Figure 32).**



Figure 32 : résultat de l'enrichissement (présence de troubles) **(Photo personnelle).**

2. Aspect macroscopique après l'isolement :

La bactérie lors de l'ensemencement est invisible à l'œil nu. Toutefois, elle se divise à un rythme assez important pour former une colonie qui est visible à l'œil nu. Chacune de ces colonies est formée par des millions bactéries identiques. Ces colonies possèdent des caractéristiques propres à l'espèce bactérienne.

Après isolement et purification des souches bactériennes sur les différents milieux utilisées, les principaux caractères culturaux sont résumés dans le **(Tableau 11)** suivant :

Tableau 11 : Résultat de l'isolement des différents prélèvements effectués.

La carie dentaire					
Prélèvement	**Gélose nutritif**	**Gélose Hektoen**	**Gélose Sabouraud**	**Gélose Chapman**	**Gélose au sang**
01	Colonie jaune de petite taille, lisse, bombé, présentant une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de différentes tailles, bombées, présentant une forme régulière.	Petite colonie, blanche, lisse, présentant une forme régulière et irrégulière.	Absence de colonie
02	Colonie jaune, de petites tailles, lisse, sèche, présentant une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
03	Absence de colonie.	Colonie blanche, de petites tailles, bombées, présentant une forme régulière.	Colonie blanche, de grandes tailles, bombées, opaque, présentant une forme irrégulière.	Colonie blanche, de différentes tailles, lisse, présentant une forme régulière et/ou irrégulière.	Absence de colonie
04	Colonie beige, de différente taille, lisse, bombé, présentant une forme régulière et/ou irrégulière.	Absence de colonie.	Absence de colonie.	Absence de colonie.	Absence de colonie
05	Colonie jaunâtres, de taille moyenne, rond, lisse,	Absence de colonie	Absence de colonie.	Absence de colonie.	Colonie gris, de petite taille, rond, plat, lisse, présent une

	bombé, présentant une forme régulière.				forme régulière.
06	Colonie jaunâtre, de différente taille, rond, plat, lisse, présente une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de taille moyenne, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de différent taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
07	Colonie blanche, de différent taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie gris, très petite taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.
08	Colonie orange, de différent taille, rond, plat lisse, présent une forme régulière.	Colonie blanche, de taille moyenne, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Colonie blanche, de grande taille, rond, bombé, lisse, présent une forme régulière.	Colonie blanche, de taille différent, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Colonie gris, de très petites taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.
09	Colonie jaunâtre, de différent taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de différent taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Colonie jaune, de grande taille, lisse, rond, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie
10	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
11	Colonie blanche, de	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie

	différente taille, lisse, rond, plat, présent une forme régulière.				
12	Colonie banche, ponctiforme, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie gris, de petite taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.
13	Colonie jaunâtre, de différente taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de très petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie jaunâtre (gris), de différente taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
14	Colonie jaunâtre, de différent taille, rond, lisse, plate, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de très petite taille, rond, lisse, plate, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de différentes tailles, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
15	Colonie blanche, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de grande taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
16	Colonie jaunâtre, de taille moyenne, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie blanche, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.

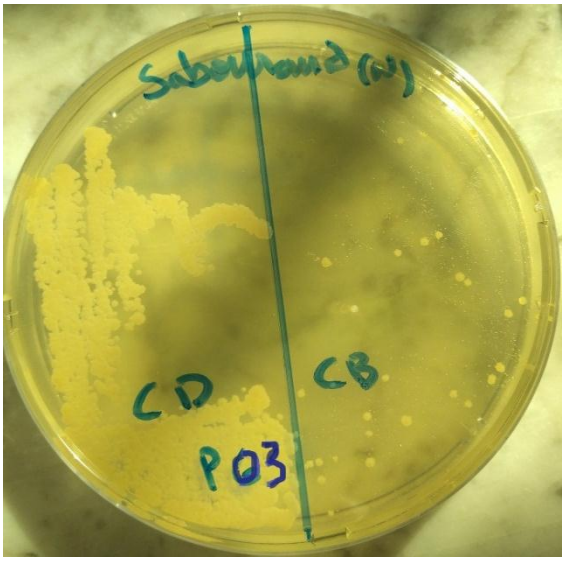
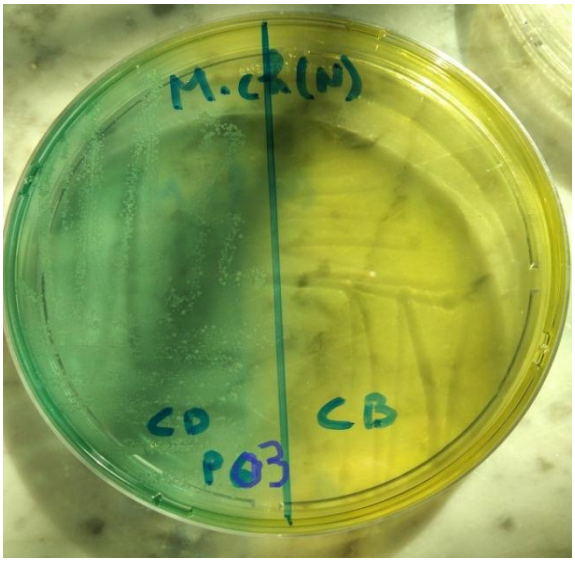
17	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de grande taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
La cavité buccale					
prélèvement	**Gélose nutritif**	**Hektoen**	**Sabouraud**	**Chapman**	**Gélose au sang**
01	Colonie jaune de petite taille, lisse, bombé, présentant une forme régulière.	Petite colonie, transparente, lisse, présentant une forme régulière.	Colonie blanche, de tailles différentes, bombé, présentant une forme régulière.	Petite colonie, blanche, lisse, présentant une forme régulière et irrégulière.	Absence de colonie
02	Colonie jaune, de petites tailles, lisse, sèche, présentant une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
03	Colonie beige, de différentes tailles, lisse, bombé, présentant une forme régulière et/ou irrégulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de grandes tailles, bombées, opaque, présentant une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie
04	Absence de colonie.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
05	Colonie jaunâtre, de différente taille, rond, lisse, bombé,	Colonie blanche, de taille moyenne, rond, lisse,	Colonie blanche, de grande taille, rond, lisse, bombé,	Colonie jaune, de différentes tailles, rondes, lisses	Colonie gris, de différentes tailles, rond, plat, lisse, présente une

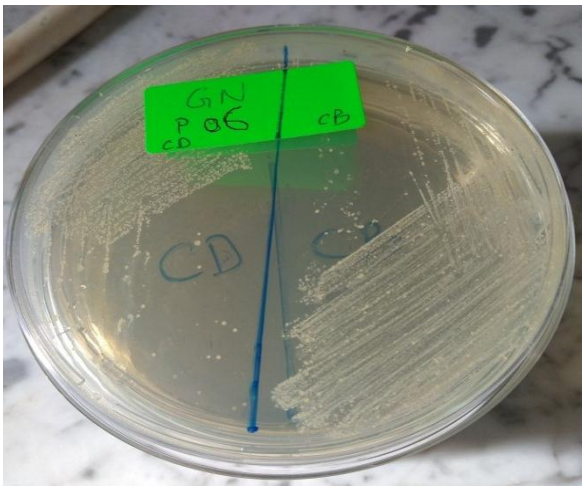
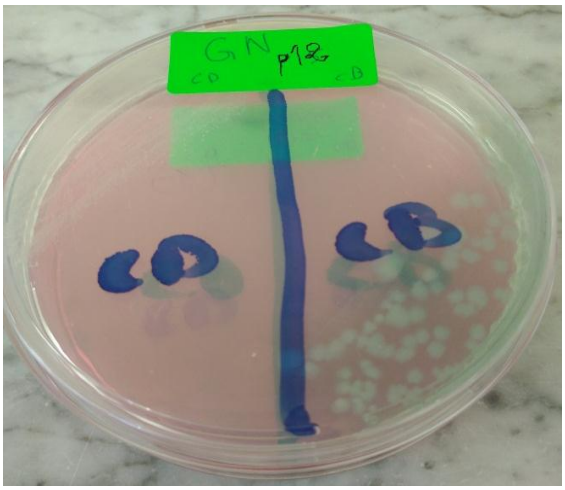
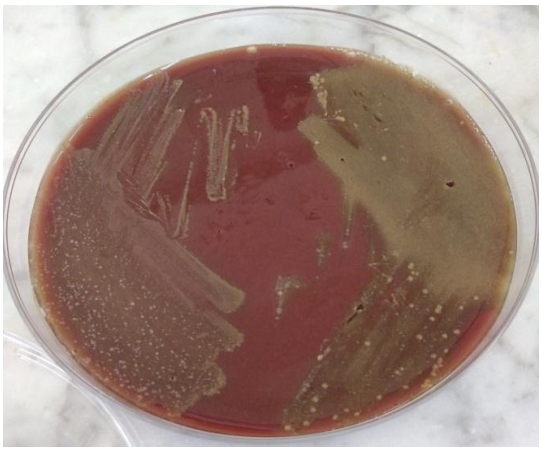
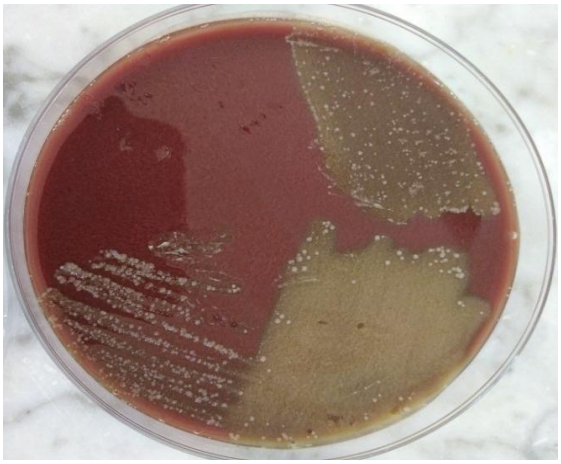
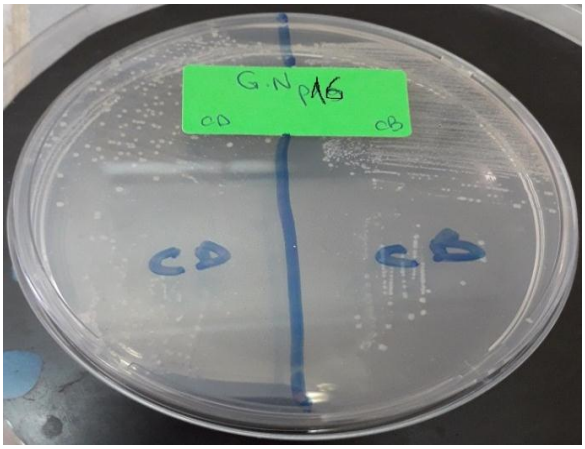
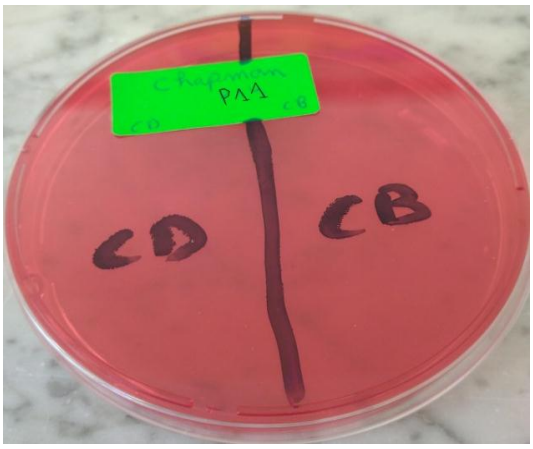
	présent une forme régulière.	bombé, présent une forme régulière.	présent une forme régulière.	et rugueuses, bombé, présente une forme régulière et irrégulière.	forme régulière.
06	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie.	Absence de colonie.	Absence de colonie.	Colonie blanche, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.
07	Colonie blanche, de taille moyenne, rond, bombé, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie gris, très petite taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.
08	Colonie jaunâtre, de différente taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie gris, de très petites taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.
09	Colonie jaunâtre, de taille moyenne, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
10	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie

11	Colonie blanche, de différente taille, lisse, rond, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie
12	Colonie verte, de grande taille, bombé, rugueuse, présent une forme irrégulière.	Colonie noir, de grande taille, rond, rugueuse, plat, crémeuse, présent une forme irrégulière.	Colonie blanche, de grande taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Colonie blanche, de petite taille, rond, plat, lisse, présent une forme régulière.	Colonie gris, de différentes tailles, lisse, plat, présent une forme régulière et/ou irrégulière.
13	Colonie jaunâtre, de petite taille, lisse, rond, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de très petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie jaunâtre (gris), de différente taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
14	Colonie jaunâtre, de différent taille, rond, lisse, plate, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie blanche, de très petite taille, rond, lisse, plate, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.
15	Colonie jaunâtre, de petite taille, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de différent taille, rond, lisse, bombé, présent une forme régulière.
16	Colonie jaunâtre, de petite taille,	Colonie orange, de différente	Colonie blanche, de petite taille,	Absence de colonie	Colonie blanche, de petite taille,

	rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	taille, lisse, plat, rond, présent une forme régulière.	en étoile, plat, présent une forme irrégulière.		rond, lisse, plat, présent une forme régulière.
17	Colonie jaunâtre, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.	Absence de colonie	Absence de colonie	Absence de colonie	Colonie jaunâtre, de différentes tailles, rond, lisse, plat, présent une forme régulière.

Ces figures représentent quelques aspects macroscopiques sur les différents milieux de culture :

	
Gélose Sabouraud de P 3	**Gélose Chapman de P 3**

	
Gélose nutritif de P 6	**Gélose nutritif de P 12**
	
Gélose au sang de P 13	**Gélose au sang de P 14**
	
Gélose nutritif de p 16	**Gélose Chapman de P 11 (culture négatif)**

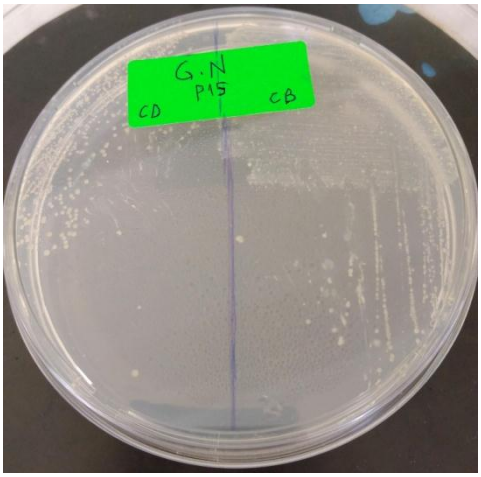
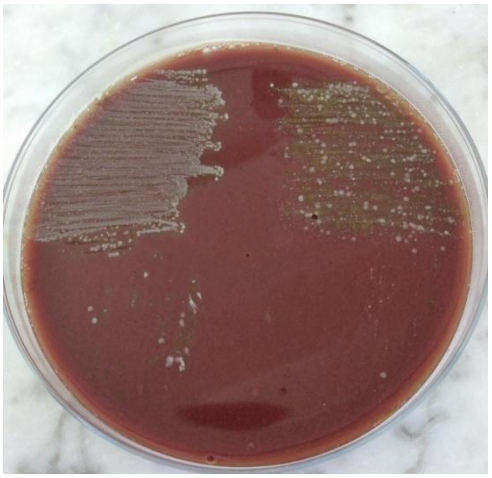
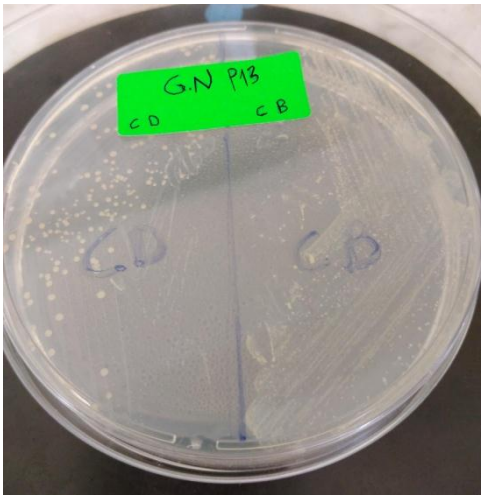
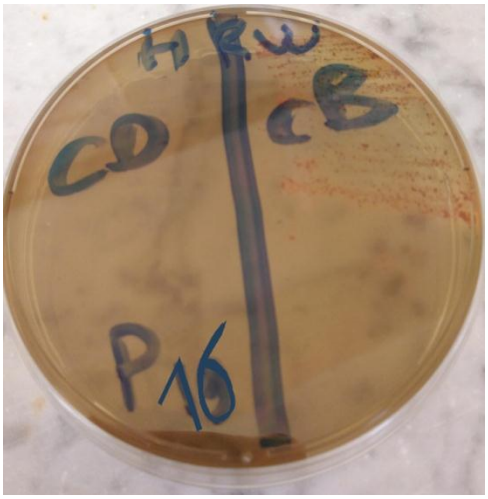
	
Gélose nutritif de P 15	**Gélose au sang de P 16**
	
Gélose nutritif de P 13	**Gélose Hektoen de P 16**

Figure 33 : Aspects macroscopiques des colonies isolées **(Des photos personnelles).**

3. Résultats d'identifications microscopiques :

3.1. Observation des mouvements bactériens :

La mise en évidence des mouvements bactériens par l'examen de l'état frais entre la lame et la lamelle à l'objectif x40. Les résultats montrent que toutes les bactéries sont différentes (immobiles et mobiles) avec des formes différentes (cocci, bacille, coccobacille) regroupées en courte chainette ou en amas **(voir Tableau 12).**

Tableau 12: Les résultats de la forme, la mobilité et le mode de regroupement de différents isolats.

La carie dentaire					
Prélèvement	**Gélose Nutritive**	**Gélose Chapman**	**Gélose Hektoen**	**Gélose Sabouraud**	**Gélose au Sang**
01	Cocci bacille Levure	Levure	Absence de colonies	Cocci Bacille	Absence de colonies
02	Cocci grappe de raisin	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
03	Levure	Levure	Levure	Levure	Absence de colonies
04	Levure	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
05	Cocci Immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci mobile
06	Cocci immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Cocci immobile
07	Cocci mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci immobile
08	Cocci Mobile	Levure	Levure	Levure	Cocci en chainette Cocci en grappe de raisin
09	Cocci immobile	Cocci immobile	Absence de colonies	Bacille immobile	Absence de colonies
10	Cocci immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
11	Cocci en grappe de raisin Cocci en chainette mobile Un peu cocci isolé mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies

12	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci en amas immobile
13	Cocci en grappe de raisin immobile Cocci en chainette immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Cocci en chainette immobile
14	Cocci isolé mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci en amas immobile	Cocci en chainette immobile
15	Cocci en amas immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci isolé mobile Cocci en amas immobile
16	Cocci en amas immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci isolé Cocci en chainette mobile
17	Cocci en amas immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Cocci isolé mobile Cocci en chainette immobile
La cavité buccale					
01	Cocci bacille	Levure	Absence de colonies	Levure avec bourgeonnement	Absence de colonies
02	Cocci en grappe de raisin	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
03	Cocci en grappe de raisin	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Absence de colonies
04	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies

05	Cocci immobile	Levure	Levure	Levure	Cocci immobile
06	Cocco bacille	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci mobile
07	Cocci mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci immobile
08	Cocci immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci mobile
09	Cocci Immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
10	Cocci en amas immobile Cocci isolé mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
11	Cocci en amas immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
12	Cocci isolé mobile	Cocci isolé immobile Cocci en chainette	Cocci isolé immobile	Cocci en amas immobile Bacille isolé Immobile	Cocci isolé mobile
13	Cocci isolé immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Cocci en grappe de raisin immobile Cocci isolé mobile
14	Cocci en grappe de raisin immobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci isolé immobile
15	Cocci en amas immobile Cocci isolé mobile	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci en amas immobile
16	Cocci en amas immobile cocci en chainette immobile	Absence de colonies	Cocci en amas immobile	Cocci en chainette Mobile	Cocci en chainette mobile

17	Cocci en amas Un peu cocci en chainette	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci en amas immobile en chainette

Ces figure répresetent ‘aspect à l’état frais **(Photo personnelle):**

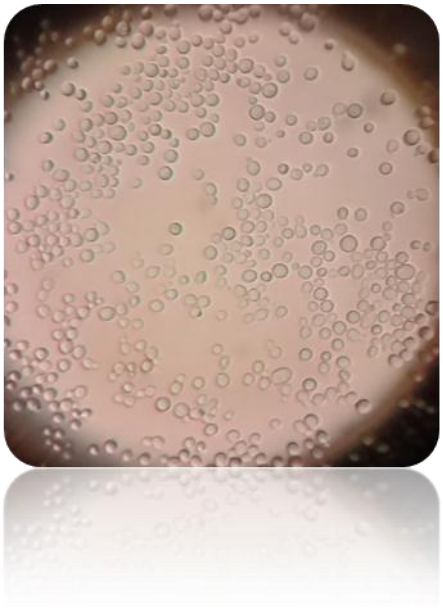


Figure 34 : Aspect de levure **(Photo personnelle).**



Figure 35 : Aspect de bacille **(Photo personnelle).**

3.2. Coloration différentiel de Gram :

La coloration de Gram permet non seulement de déterminer la taille, la morphologie et la disposition des cellules mais aussi des informations sur d'autres fonctionnalités. L’observation microscopique à objectif x100 montre la présence de différents groupes de micro-organismes bactériens. Après coloration différentielle de Gram, nous avons isolé des cocci, des bâtonnets et des coccobacilles. Les photos qui suivent montrent l’aspect microscopique de quelques bactéries isolées sur les milieux utilisés. Tous les résultats sont résumés dans le **(Tableau13).**

Tableau 13 : Les résultats des observations microscopique (coloration de gram).

La carie dentaire					
Prélèvement	**Gélose Nutritive**	**Gélose Chapman**	**Gélose Hektoen**	**Gélose Sabouraud**	**Gélose au Sang**
1	Gram (+) de couleur violette	Levure	Absence de colonies	Gram(+)	Absence de colonies
2	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
3	Levure	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
4	Levure	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
5	Gram(-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+) de couleur violette
6	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (-)	Gram (+)
7	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
8	Gram (+)	Gram (+)	Levure	Gram(+)	Absence de colonies
9	Gram (-)	Gram (+)	Absence de colonies	Gram (+)	Absence de colonies
10	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
11	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
12	Gram(+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
13	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (-)	Gram (+)
14	Gram (-) de couleur rose	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)	Gram (+)

15	Gram(+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
16	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (-)
17	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de Colonies	Levure	Gram(-)
La cavité buccale					
01	Cocci Gram (+)	Cocci Gram (-)	Absence de colonies	Levure	Absence de colonies
02	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
03	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Levure	Absence de colonies
04	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
05	Gram (-)	Gram(-)	Gram(-)	Levure	Gram (+)
06	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
07	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram(-)
08	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
09	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
10	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
11	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies
12	Gram(+)	Gram(+)	Gram (-)	Gram(-)	Gram (+)
13	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (-)	Gram(+)

14	Gram(+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Cocci en amas Gram (+)
15	Gram (-)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (+)
16	Gram(+)	Absence de colonies	Gram(-)	Gram(+)	Gram(-)
17	Gram (+)	Absence de colonies	Absence de colonies	Absence de colonies	Gram (-)

Ces figures représentent quelques aspects des bactéries après coloration de Gram**(Photo personnelle)** :

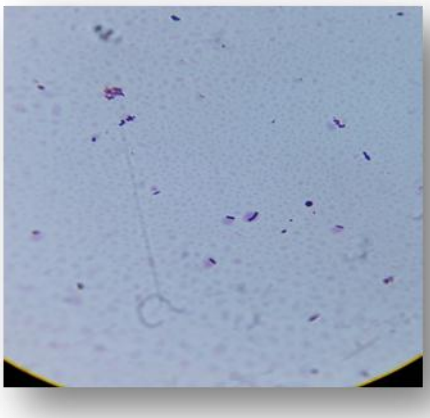


Figure 36: Cocci en chainette Gram (+).

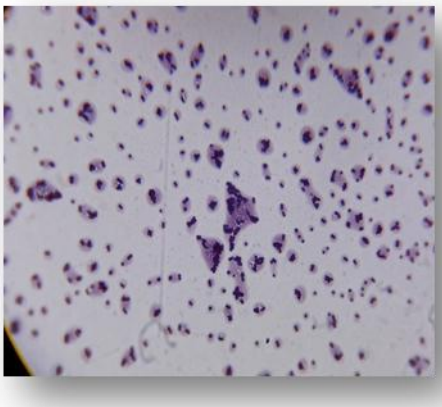


Figure 37: Cocci Gram (+) en grappe de raisin.

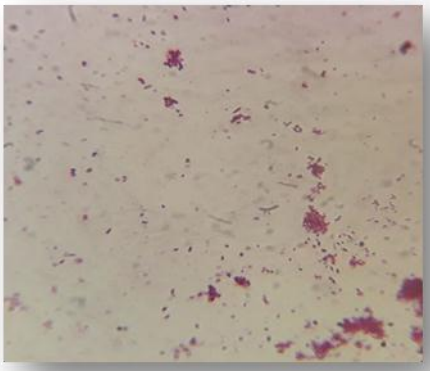


Figure 38 : Cocci Gram (-).

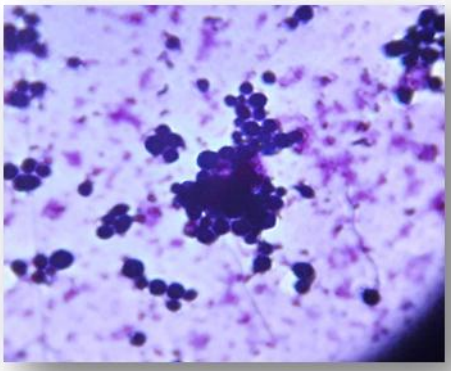
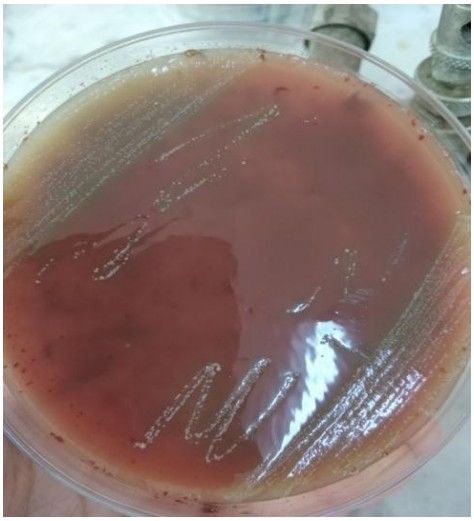
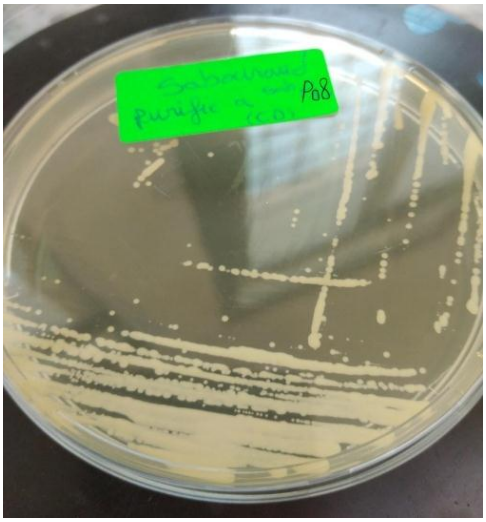
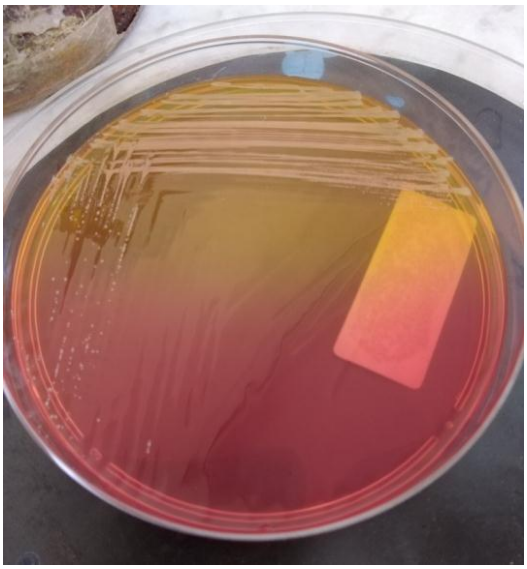
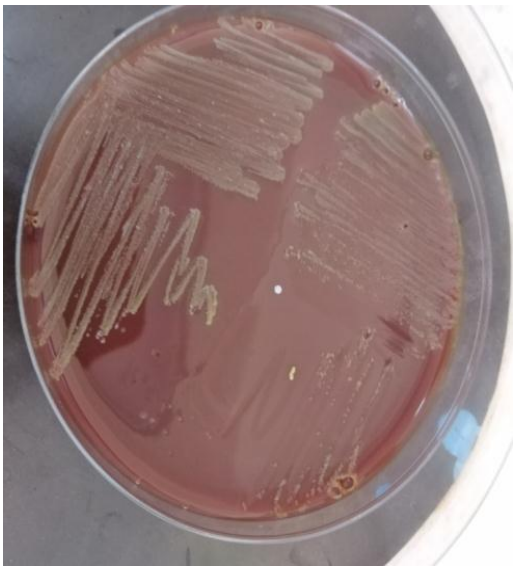


Figure 39 : Aspect des levures.

4. Résultat de l'enrichissement et la purification (repiquage) :

Dans le but d'obtenir des souches pure, car dans la plupart cas on trouve un mélange de bacille et de cocci et de Gram(+) et Gram(-), on fait une série de repiquage dans le même milieu pour les milieux sélectif et dans un autre milieu pour les milieux ordinaire. Aussi pour la réalisation de la galerie API ou la galerie classique il faut avoir une culture d'au moins de 24 h.

Ci-joint quelques photos présentant les résultats du repiquage dans le tableau des figures ci-dessus:

	
Purification de GN de P 6 dans GS	**Purification de Sab de P 8 dans Sab (CD)**
	

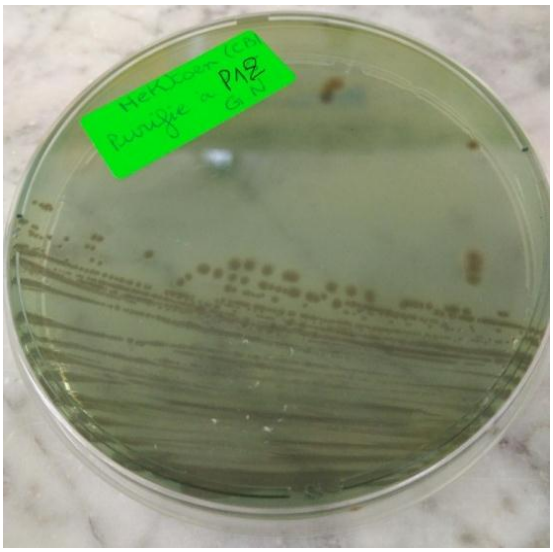
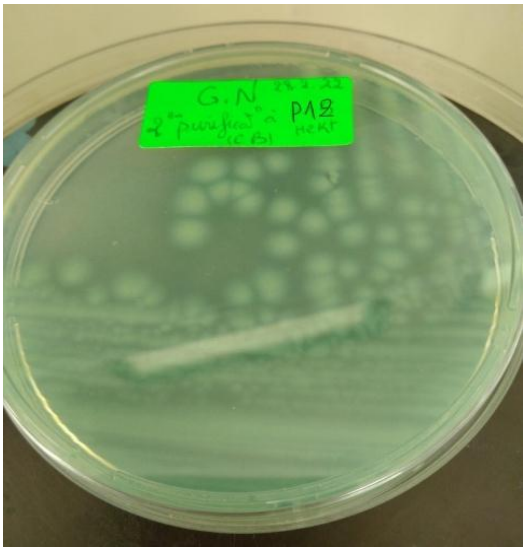
Purification de Chap P 12 dans Chap (CB)	Purification de GS P 13 dans GS (CB)
	
1er Purification de GN P12 dans Hekt (CB)	2eme Purification de Hekt P 12 dans GN (CB)

Figure 40: Les résultats des repiquages **(Photo personnelle).**

5. Tests complémentaires :

On à effectuer les tests **(Oxydase, Catalase, Coagulase)** sur les souches, Ces Figures représentent les caractères Oxydase, Catalase chez les bactéries isolées.

5.1. Test catalase :



Figure 41: Catalase (+) **(Photo personnelle).**

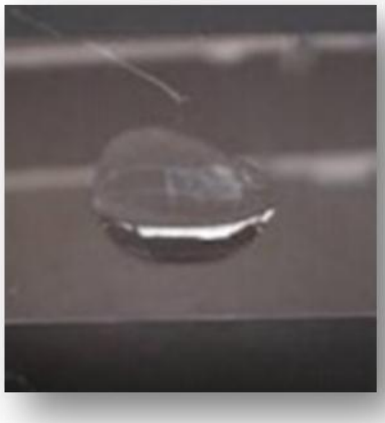


Figure 42: Catalase (-).

Tableau 14: Résultat de test catalase.

Milieux	Gélose nutritif		Gélose Sabouraud		Gélose Hektoen		Gélose Chapman		Gélose au Sang	
Prélèvement	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale
1	-	+	-	+	/	-	+	-	/	/
2	+	+	/	/	/	/	/	/	/	/
3	/	+	+	+	+	/	+	/	/	/
4	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/
5	+	-	/	+	/	-	/	+	+	+
6	+	+	-	/	/	/	/	/	+	+
7	+	+	/	/	/	/	/	/	+	+
8	+	+	+	/	-	/	-	/	+	+
9	+	-	-	/	/	/	+	/	/	/
10	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/
11	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/
12	-	+	/	+	/	+	/	-	-	-
13	-	-	-	-	/	/	/	/	+	+
14	+	+	-	-	/	/	/	/	+	+
15	-	+	/	/	/	/	/	/	+	+
16	-	-	/	+	/	-	/	/	+	+
17	-	-	-	/	/	/	/	/	+	-

5.2. Résultat du test Coagulase :

Les staphylocoques à Coagulase positive, sont les bactéries qui se présentent sous forme de Cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin. Ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase, La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie, les résultats du test coagulase sont représentés dans le Tableau ci-dessus.

Tableau 15:Résultats du test coagulase.

Prélèvements	Milieu de culture	Lieu de prélèvement	Observation
12	Chapman	Cavité buccale	(+)
13	Gélose au sang	Cavité buccale	(-)
14	Gélose au sang	Carie dentaire	(-)
15	Gélose au sang	Carie dentaire	(-)
16	Gélose au sang	Cavité buccale	(-)
17	Gélose au sang	Carie dentaire	(-)

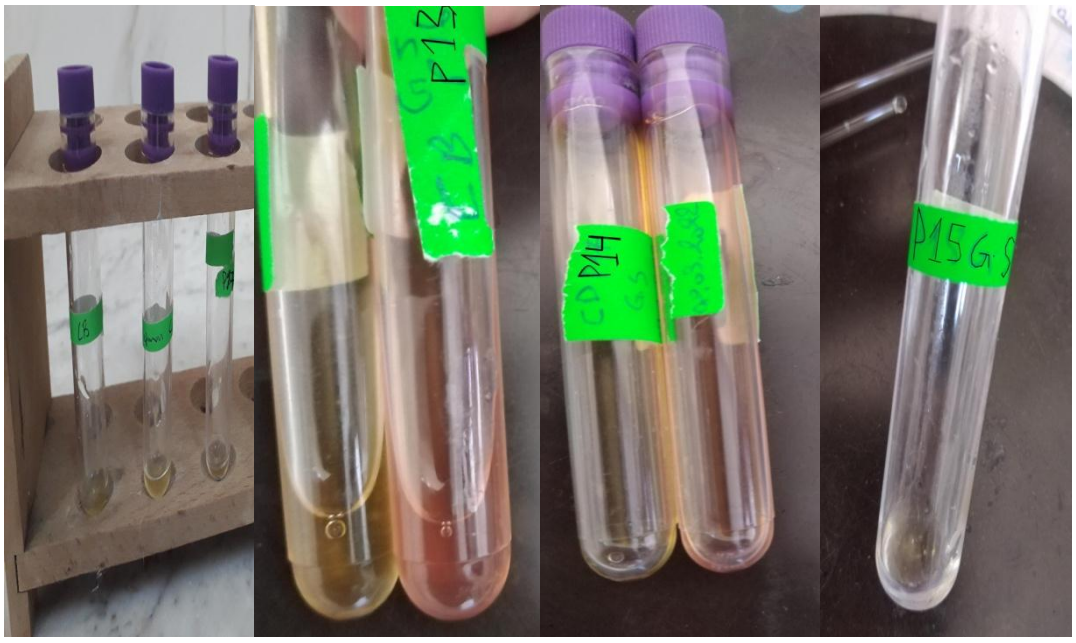


Figure 43 : Représentent les résutats des tests coagulase **(Photo personnelle).**



Figure 44: Coagulase (+).

5.3. Test cytochrome oxydase :

Les résultats obtenus montrent qu'il n'ya pas un virage de couleur vers le violet, donc les isolats sont dépourvus d'oxydase.

Tableau 16 : Résultat de test oxydase.

Milieux	Gélose nutritif		Gélose Chapman		Gélose Hektoen		Gélose Sabouraud		Gélose au Sang	
Prélèvement	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale	Carie dentaire	Cavité buccale
5	+	+	/	-	/	-	/	-	+	-
6	+	+	/	/	/	/	/	/	-	-
7	-	-	/	/	/	/	/	/	+	+
8	-	-	-	/	-	/	-	/	+	+
9	+	+	-	/	/	/	-	/	/	/
10	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
11	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/
12	/	+	/	/	/	+	/	+	-	-
13	+	+	/	/	/	/	-	/	+	+
14	+	+	/	/	/	/	-	-	+	+
15	+	+	/	/	/	/	/	/	+	+
16	+	+	/	/	/	+	/	-	+	+
17	+	-	/	/	/	/	-	/	+	+



Figure 45: Oxydase (+) **(Photo personnelle).**



Figure 46 : Oxydase (-).

5.4. Test d'identification de *Candida albicans* :

5.4.1. Test blastèse :

Tableau 17: Résultat de blastèse.

Prélèvements	Milieu de culture	Lieu de prélèvement	Observation
P 6	Gélose Sabouraud	Carie dentaire	Levure (-)
P 17	Gélose Sabouraud	Carie dentaire	Candida albicans (+)

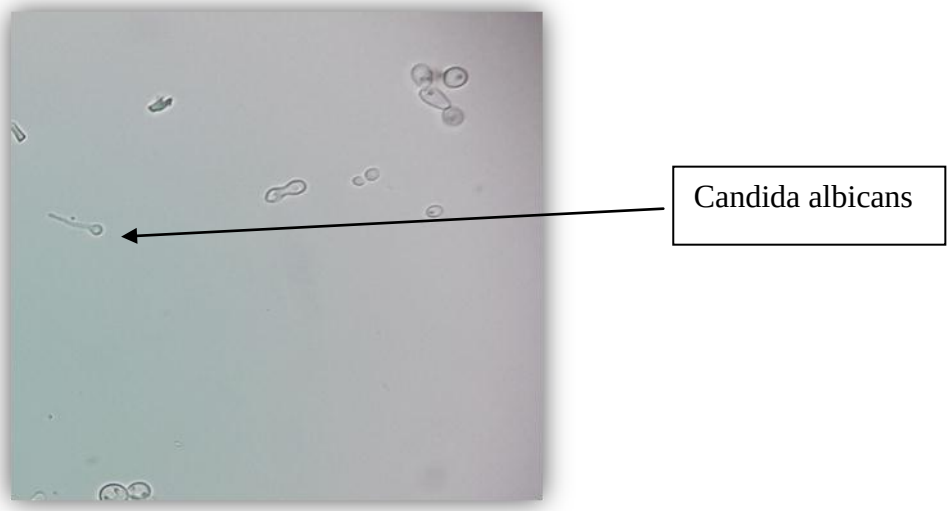


Figure 47 : Aspect de *Candida albicans* sous microscope **(Photo personnelle).**

6. Résultat d'identification biochimique :

Nous avons utilisés galeries classique : test TSI, Mannitol mobilité, Citrate de Simmons (les figures ci-dessus).

Les résultats de galeries classiques sont résumés dans le **Tableau 18**.

Tableau 18: Résultat des Galeries classique.

Prélèvement	Mannitol mobilité		TSI					Citrate de Simmons
	Mannitol	Mobilité	H2s	Gaz	Sucres			
					Lac	Sac	Glu	
P 12 (CB)	-	+	-	-	-	-	-	+
P 16	-	-	-		+	+	-	-

Ci-joint quelques Figures présentent dans le tableau ci-dessus, correspondant aux résultats de la galerie classique.



Résultats de galerie classique isolée de gélose Hektoen de P 16 (Carie dentaire).



Résultats de galerie classique isolée de gélose Hektoen de P 12 (Cavité buccale).

Figure 48: Les résultats macroscopiques de galerie classique **(Photo personnelle).**

7. Antibiogramme :

Après incubation sur milieu Muller-Hinton à 37C° pendant 24h, nous avons obtenus les résultats résumés dans le tableau suivant.

Tableau 19: Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus (P 12)			
Antibiotique	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**	**Sensible**	**Résistante**
Vancomycine **(VA) 30 µg**	19	+	-
Aztreonam **(AZM)**	32	+	–
Pinicilline **(PG) 10 µg**	13	-	+
Nitrofurantoin **(NIT)**	24	+	-

Tableau 20: Résultats de l'antibiogramme de *Streptococcus*.

Streptocococcus (P 14, P13 : CD)			
Antibiotique	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**	**Sensible**	**Résistante**
Lévofloxacine 5µg (LE)	35	+	-
Gentamicine(HLG) 120µg	28	+	-
Pinicilline (PG) 10µg	10	-	+
Vancomycine (VA) 30µg	13	-	+
Clindamycine (CD) 2µg	14	-	+

Tableau 21: Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa (P 12, CB)			
Antibiotique	**Diamètre de la zone d'inhibition (mm)**	**Sensible**	**Résistante**
Lévofloxacine (LE)5µg	35	+	-
Gentamicine(HLG) 120µg	35	+	-
Ticacilline (TIC) 75µg	20	+	-
Azithromysine(AT)30µg	30	+	-

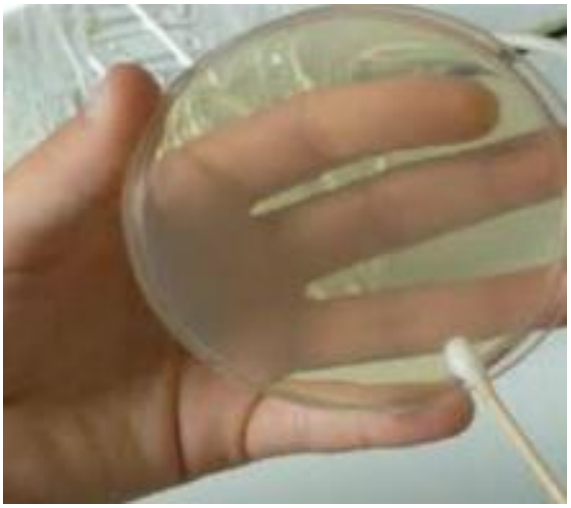
LE : Lévofloxacine. **P:** Penicillin (G). **AZM:** Aztréonam.

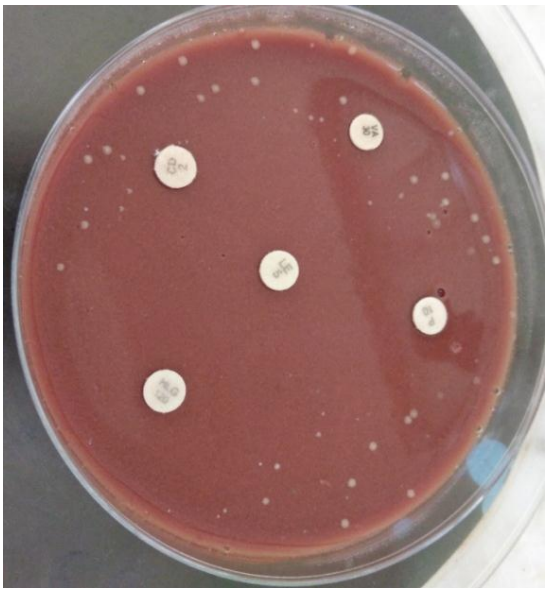
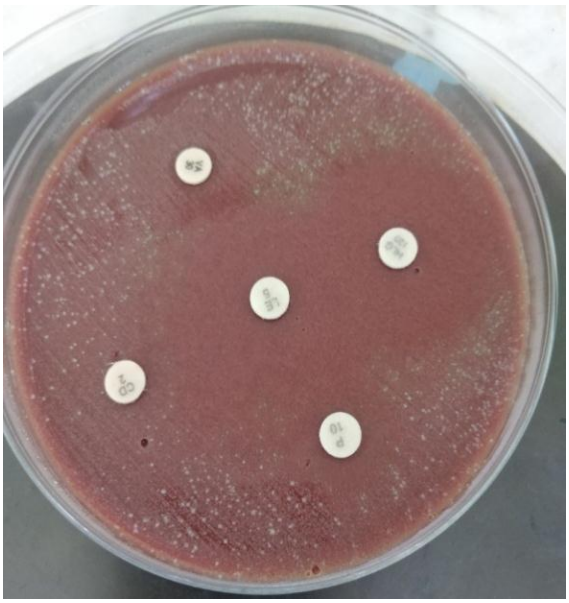
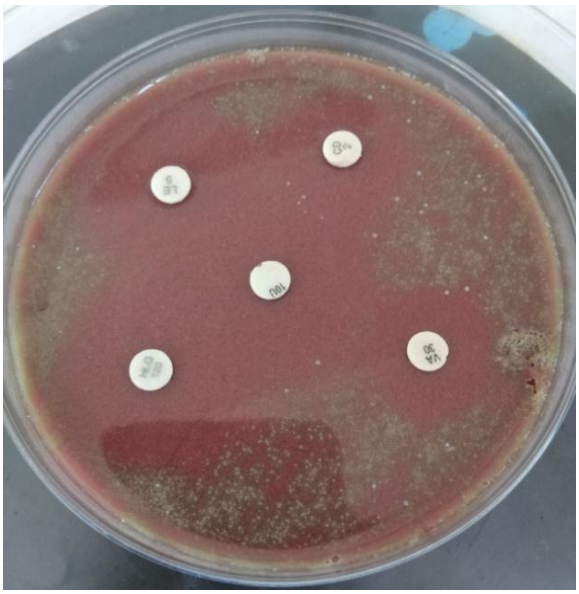
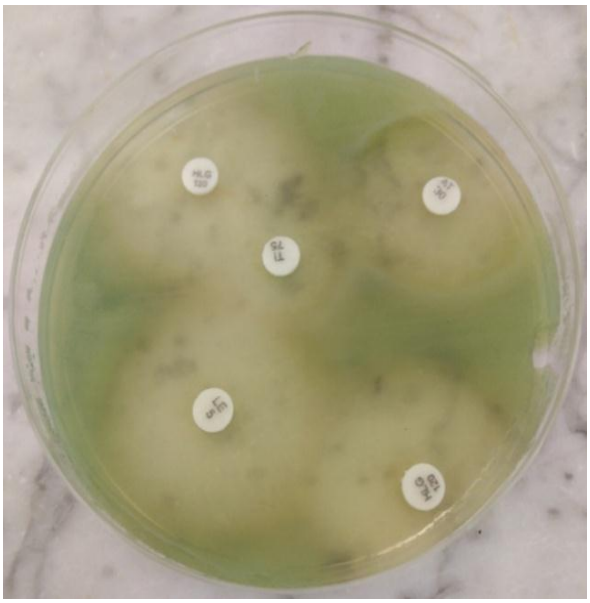
VA : Vancomycine. CD^2 **:** Clindamycine. **TIC:** Ticarciline.

HLG: Gentamicine**. **NIT:** Nitrofurantoin. **AT:** Azithromysine**.**

Ce tableau des figures représente les résultats des antibiogrammes réalisés au niveau du laboratoire.

Tableau 22 : Réalisation d'antibiogramme.

	
Ensemencement	**Dépôt les ATB**

	
Résultats sur Gélose au sang P 15 (négatif).	**Résultats sur Gélose au sang P 14.**
	
Résultats sur Gélose au sang P 13.	**Résultats sur Gélose MullerHinton P 12 (gélose hektoen).**

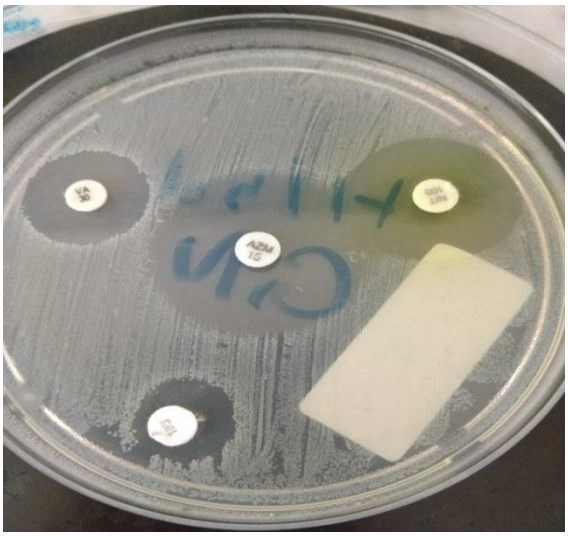
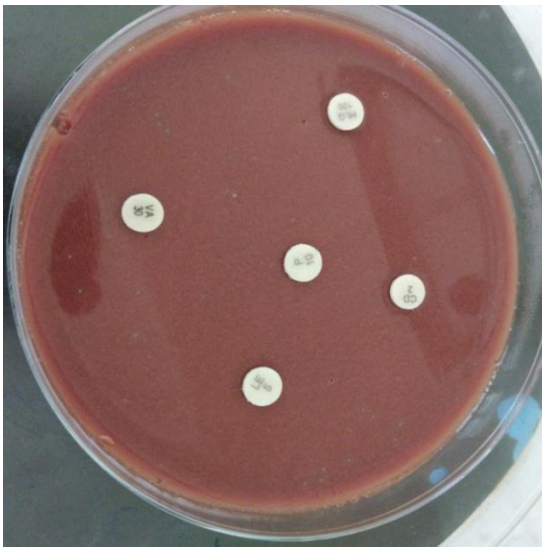
	
Résultats sur Gélose MullerHinton P 12 (gélose nutritif).	**Résultats sur Gélose au sang P 17 (négatif).**

Figure 49 : Résultats de l'antibiogramme **(Photo personnelle).**

8. La formation de biofilm chez les souches bactériennes :

8.1. Résultats de méthode Rouge Congo :

La caractérisation phénotypique du biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats sur le milieu RCA (Rouge Congo Agar). Les résultats sont révélé la présence de colonies rouges foncées pour les souches *P.aeruginosa* qui sont donc non productrice de slime. Contrairement aux *Streptococcus*, *Staphyococcus* qui sont producteurs de slime, ce qui se manifeste par la formation de colonies noires sur le milieu Rouge Congo Agar **(Figure 50, 51).**

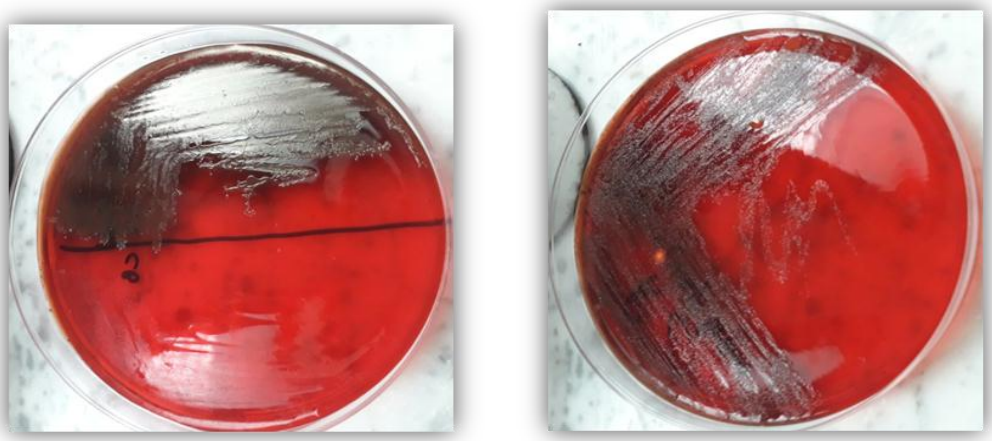


Figure 50 : Production de slime par manifestation des colonies noire sur le milieu Rouge Congo Agar **(Photo personnelle).**

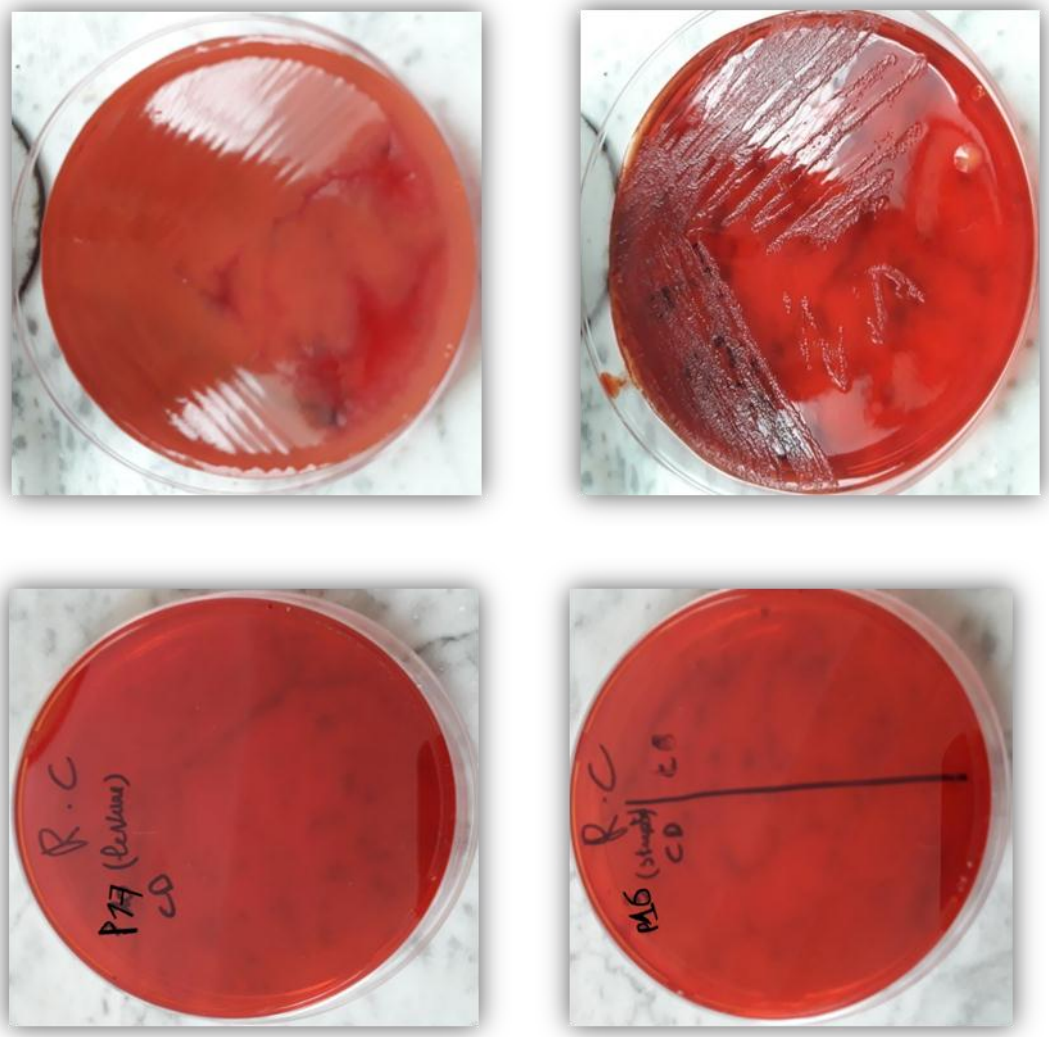


Figure 51 : Non production de slime par manifestation des colonies rouges sur le milieu Rouge Congo Agar **(Photo personnelle).**

8.2. Résultat de méthode Crystal violet :

8.2.1. Effet de la propolis brute :

L'effet de la PB sur l'adhésion a été étudié en fonction de concentrations croissantes en PB additionné directement dans le milieu de culture (BHIB) sous forme de poudre. Cette dernière a été aseptiquement ajoutée aux concentrations de : 0.1 ; 0.2 ; 0.3 ; 0.4 ; 0.5 ; 1 ; 1.5 et 2% (masse/volume).

8.2.2. Effet de la PB sur la formation de biofilms de S.aureus et Streptococcus :

La formation de biofilm bactérien est toujours en transition entre deux formes ; la forme fixée (biofilm) et la forme libre (planctonique).

8.2.2.1. Effet de la PB sur l'adhésion des cellules sessiles de S.aureus et Streptococcus :

Les résultats obtenus, après 24 heures d'incubation en présence des différentes concentrations en PB sont présentées dans le **(Tableau 23, 24) (Figure 56).**

Tableau 23 : Les résultats de *S.aureus*.

Concentration en PB (%)	DO à 600 nm
BHIB	0.3
Témoin	0.24
0.1	0.418
0.2	0.678
0.3	0.528
0.4	0.702
0.5	0.820
1	1.02
1.5	1.611
2	0.666

Tableau 24 : Les résultats de *Streptococcus*.

Concentration en PB (%)	DO à 600 nm
BHIB	0.3
Témoin	0.48
0.1	0.573
0.2	0.686
0.3	0.787
0.4	0.841
0.5	0.669
1	0.682
1.5	1.424
2	0.645

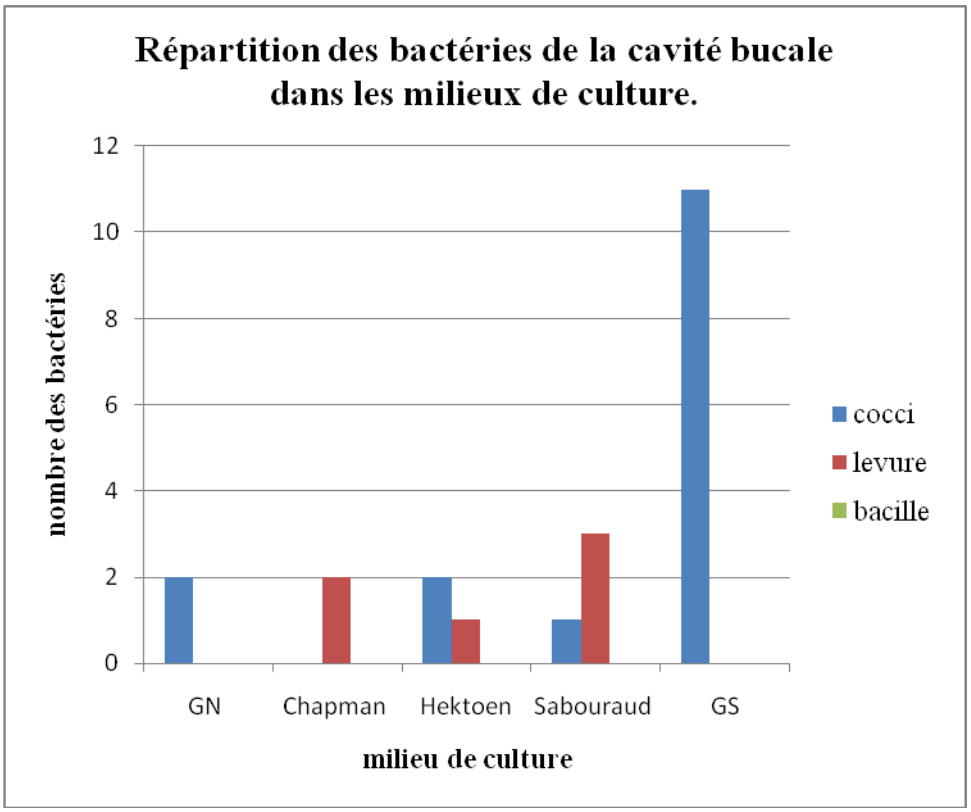


Figure 52 : Répartition des bactéries de la cavité buccale dans les différents milieux de culture (à l'état frais).

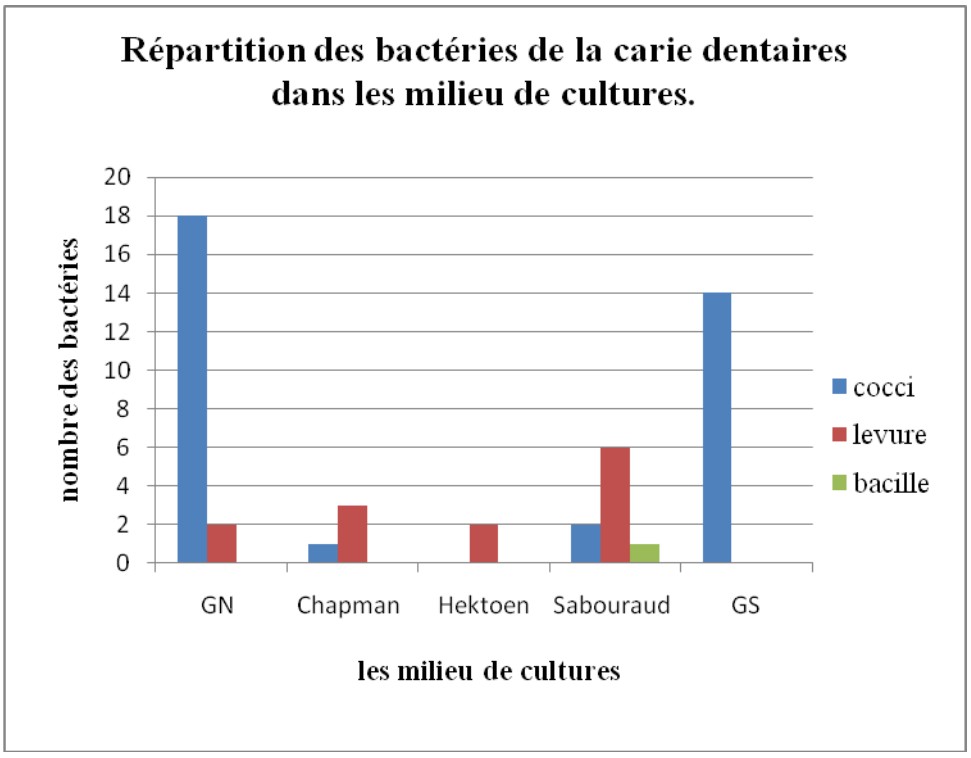
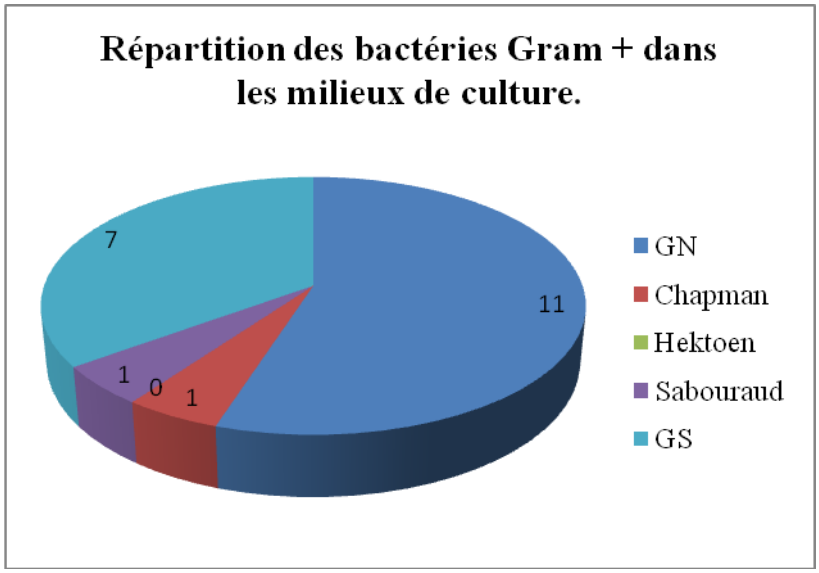
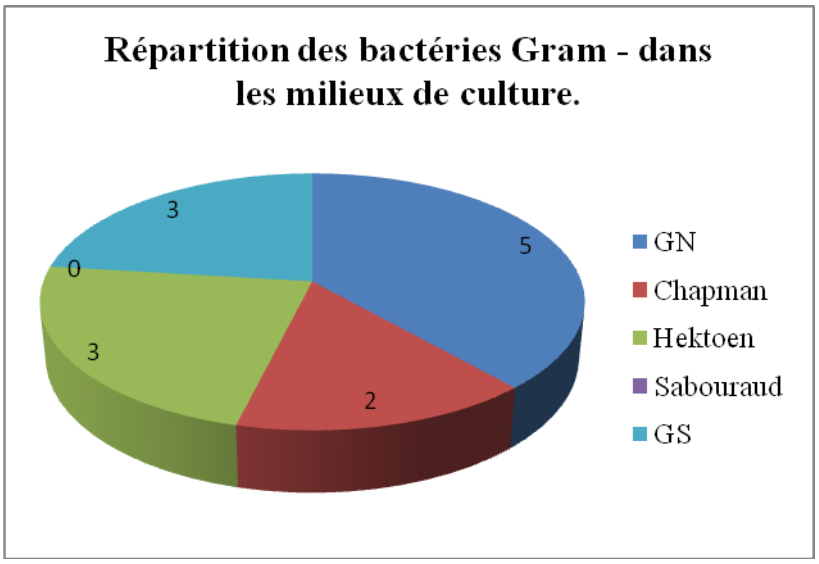


Figure 53 : Répartition des bactéries de la carie dentaire dans les différents milieux de culture (à l'état frais).





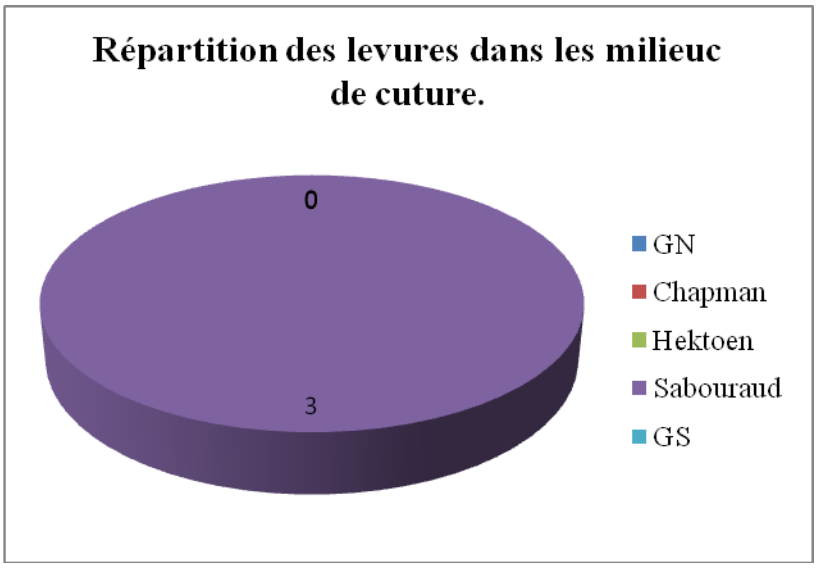
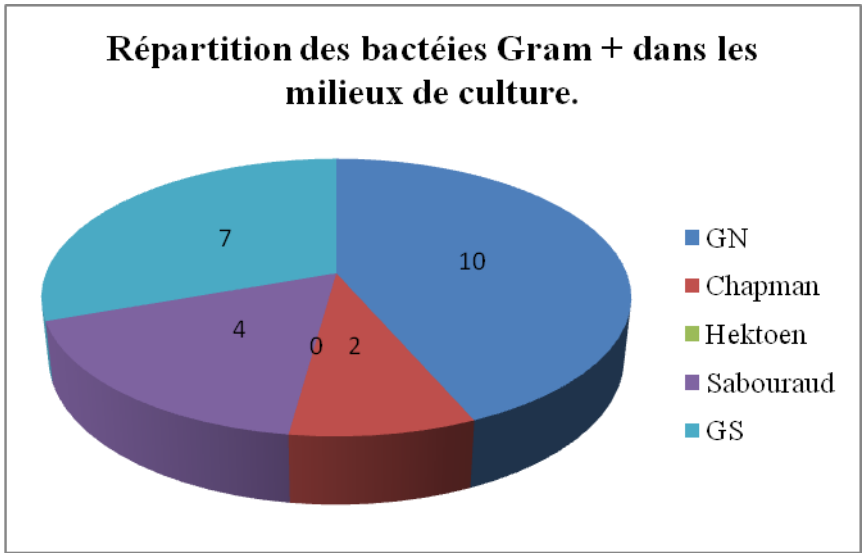
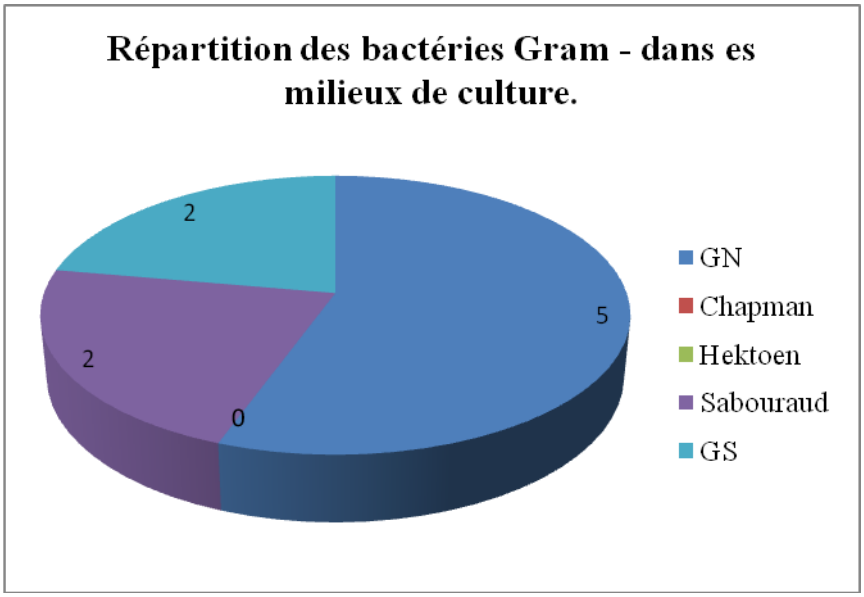


Figure 54 : Répartition des bactéries (Gram+, Gram-, levure) de la cavité buccale dans les différents milieux de culture.





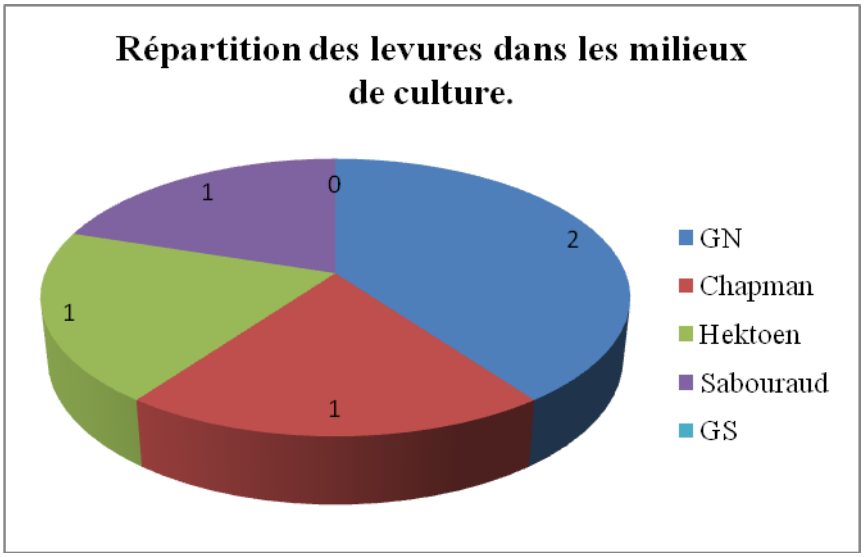


Figure 55 : Répartition des bactéries (Gram+, Gram -, levure) de la carie dentaires dans les différents milieux de culture.

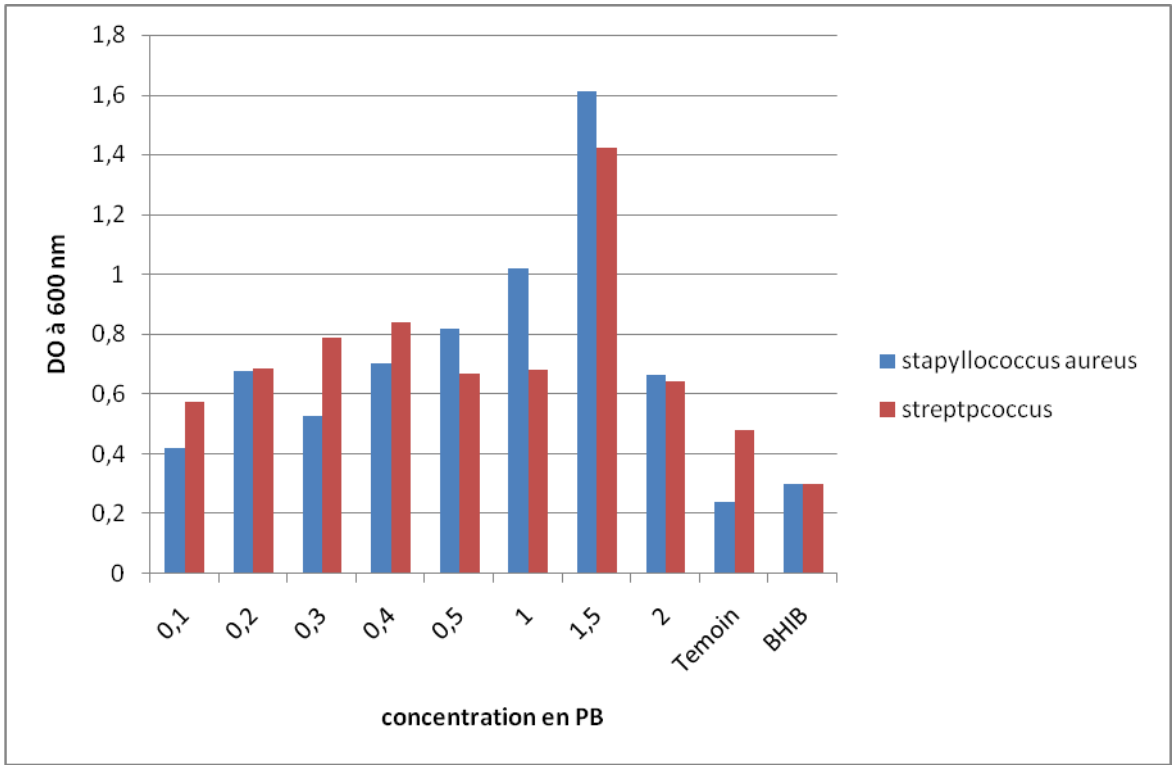


Figure 56 : Effet des différentes concentrations en PB sur la formation du biofilm de *S.aureus* et *Streptococcus*.

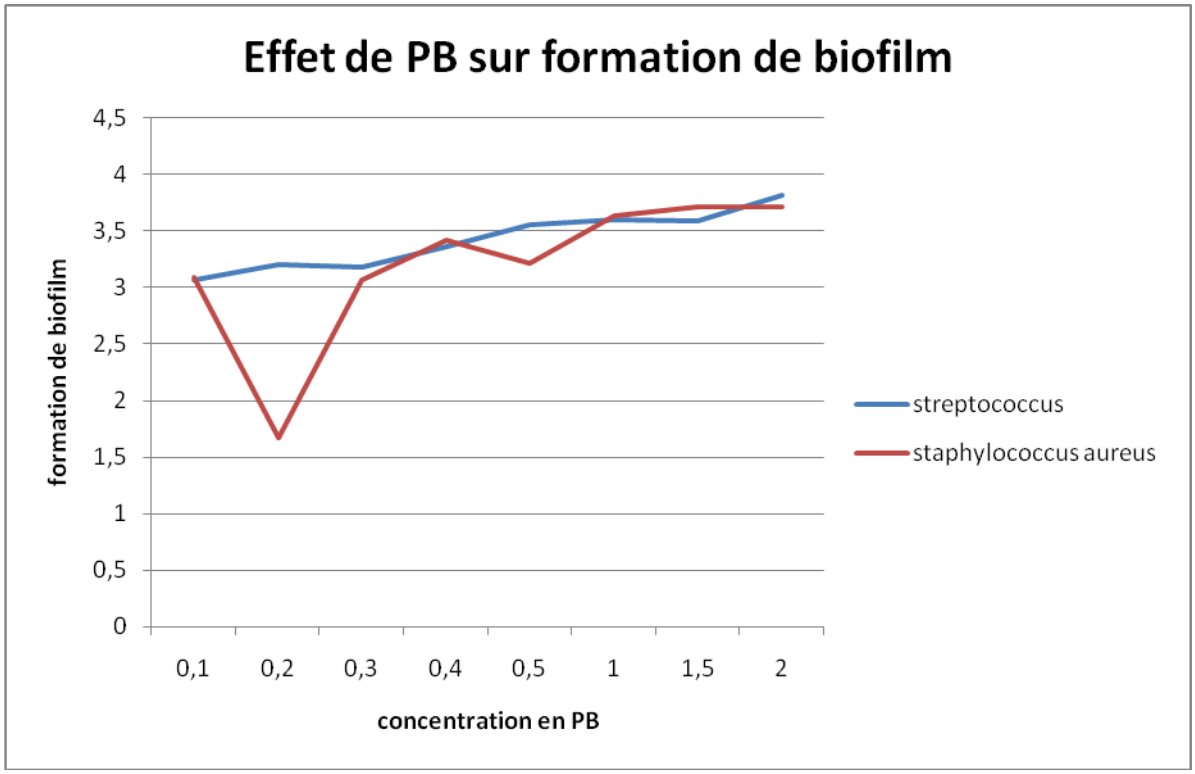


Figure 57 : Effet de différente concentration en PB sur la formation de biofilm avant la coloration avec du cristal violet.

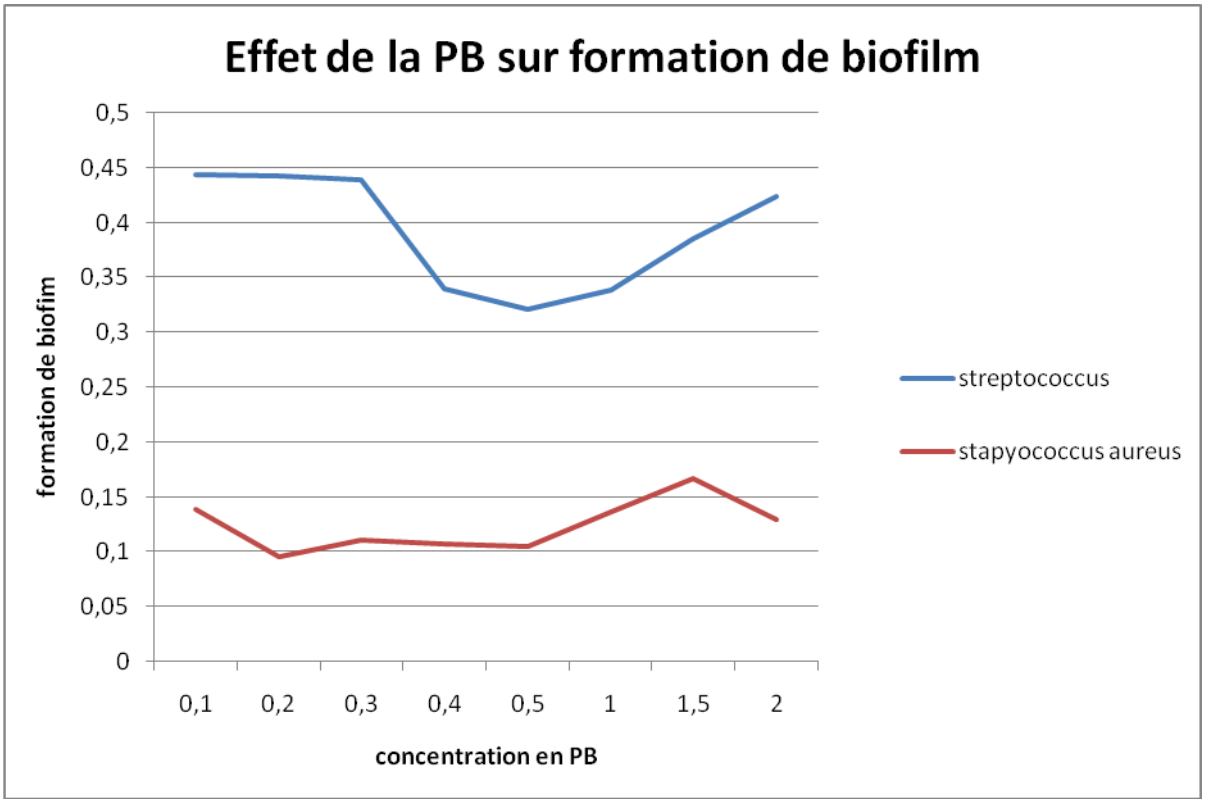


Figure 58 : Effet de différente concentration de PB sur la formation de biofilm après la coloration avec cristal violet.

Discussion :

Notre étude basée sur l'isolement et l'identification des microorganismes de la cavité buccale est effectuée dans la cabinet chirurgiens dentaire privés et polyclinique de Médéa.

Ce travail a concerné 15 adultes (7 hommes et 8 femmes) âgés de 17 à 58 ans et 2 enfants âgés de 10 ans.

L'analyse macroscopique des bactéries isolées a montré une grande variété de forme et aspect des colonies qui ont poussés sur les cinq géloses utilisées pour l'isolement (la gélose nutritive, la gélose Chapman, la gélose au sang, la gélose Hektoen et Sabouraud). Selon

L'analyse microscopique de tous les prélèvements de la cavité buccale et de la carie dentaire révèle aussi un polymorphisme de la flore bactérienne. La coloration de Gram a montré la présence des Gram négatifs et des Gram positifs (qui apparaissent beaucoup plus dans le milieu GN et GS par rapport aux autres milieux de cultures) et de multiples formes allant des cocci(qui est la formes la plus fréquent) aux bacilles et passant par les coccobacilles Cela a été rapporté aussi par **Aas (2005),**et même des fois des levures qui apparaissent principalement sur les milieux Hektoen et Sabouraud (à partir de prélèvement 1, 3, 5, 6, 8, 13, 17). Ceci est dû soit à des contaminations suite aux conditions d'asepsie dans le site d'isolement et d'incubation de notre prélèvement ou au développement des mécanismes d'adaptation des différents germes sur les milieux sélectif.

Les bactéries ont été cultivées, repiquées et identifiées grâce à l'étude des caractères biochimiques. Au total 11 souches ont été isolées appartenant cinq familles (*Streptococcaceae*, *Stapylococcacea*, *Enterococcaceae*, *lactobacillaceae*, levure) on n'a pas pu aller jusqu'à 'identification des espèces pour cause de l'indisponibilité des plaques de la galerie Api. L'étude de leurs sensibilités aux différents antibiotiques utilisés est considérée comme un critère ultime d'identification pour les bactéries anaérobies et anaérobies facultatives. Les résultats des études microscopiques par coloration de Gram, des tests biochimiques (catalase, oxydase, Galerie biochimique classique).

Les Cocci Gram positif aérobies et aéro-anaérobies facultatifs ont été isolés après mise en culture des prélèvements en aérobiose sur gélose au sang et sur gélose Chapman (pour les *Staphylocoques*) a 37°C pendant 24 heures.

Les *Streptococcus* buccaux sont souvent organisés en quatre groupes : les mutans, les salivaires, les angmcesus et les mutis **(Guillaume et Marc, 2011).**Nous avons trouvé une seule espèce appartenant à la famille de *Streptococcaceae*. A partir de prélèvement 16, 17 et 18 sur le milieu gélose au sang nous trouve *Streptococcus* qui fait partie de la flore normale de la cavité buccale. L'identification des isolats (*Streptococcus*) doit se faire dans des conditions d'anaérobiose ces dernières peuvent être obtenues de différentes manières : la chambre anaérobie est le meilleur moyen qui permet de garder les bactéries EOS (extremely sensitive oxygen) en atmosphère anoxique **(Grollier *et al.*, 2004).**

En outre, le genre *Lactobacillus* (phylum Firmicutes), déjà identifié comme bactérie cariogène, était présent dans notre étude chez les personnes cariés, les genres *Streptococcus* et *Lactobacillus* comme les bactéries cariogène produisent l'acide, ces deux genres étaient abondants dans les caries avancées dans les études précédentes **(Corby *et al.*, 2005 ; Chhour *et al.*, 2005).**Le genre *Enterococcus* a été aussi isolé comme il a été indiqué par les auteurs **(Aas, 2005).**

L'identification biochimique par l'utilisation des galeries classiques (tests citrate de Simmons, TSI, teste mannitol mobilité) et des tests complémentaires (catalase, oxydase, coagulase, blastèse) a pour but de confirmer certains cas (comme *Pseudomonas aerugenosa*..).

Les antibiotiques testés dans notre étude sont au nombre 9. Ils sont suivants : Pénicilline G, Clindamycine, Ticarciline, Nitrofurantoin, Vancomycine, Lévofloxacine, Azitromycine, Aztreonam, Gentamicine. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques nous a confirmé que parmi les espèces bactériennes isolées, certaines exhibent une sensibilité aux différents antibiotiques utilisés.

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont résistantes à l'amoxicilline et à la vancomycine mais présentent une résistance naturelle aux aminosides (Kanamycine), cette résistance naturelle est rapportée dans la littérature **(CASFM, 2012).** Les résultats de notre antibiogramme ont révélé cette résistance aux vancomycine et on n'a pas testé la résistance aux autres antibiotiques à cause de la non-disponibilité.

Les nombreuses études sur la plaque dentaire et le biofilm ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de celui-ci. Ainsi, il est aujourd'hui bien reconnu qu'une bactérie prise au sein d'un biofilm présente une capacité d'agrégation et de développement

augmentée et peut acquérir des facteurs de virulence notamment l'acquisition de gènes codant des résistances aux antibiotiques.

On a étudié la capacité de formation de biofilm sur les souches obtenues par utilisations de deux méthodes : la méthode RCA et méthode TCP. Les résultats de l'issu de méthode RCA ont montré que sauf les souches de *Streptococcus* (P 13) et *Staphylococcus aureus (*P 12) ont la capacité de production de slime et de biofilm. Suite à toutes ces techniques et selon plusieurs auteurs **(Oli *et al.*, (2012), Mathur *et al.*, (2006))** la méthode de RCA semble être moins efficace pour détecter la formation du biofilm par contre que la méthode TCP est la méthode de sélection la plus sensibles et la plus précise montrant une bonne reproductibilité pour la détection de la formation de biofilm. Nos résultats concordent avec ceux d'**Oli *et al.*, (2012).**

Profitant de l'essor grandissant des médecines dites « naturelles », la propolis s'inscrit dans cette tendance, le plus souvent en complément des traitements conventionnels. Les recherches entreprises durant ces dernières années ont permis de montrer qu'elle pouvait être une alternative efficace dans bon nombre de troubles et pathologies. Les résultats qui nous obtenus durant l'utilisation de la propolis brute montrée que cette dernière permet et favoriser la formation de biofilm.

Nous pouvons aussi constater la présence de nombreux germes dans tous les prélèvements que nous avons effectués. Cette caractéristique peut être expliquée par les contaminations directes ou indirectes dans le laboratoire. Le manque de réactifs et de produits nous nous a pas permis de pousser la recherche et l'identification plus loin des microorganismes. Il serait préférable de continuer ce travail tout en mettant l'accent sur une recherche poussée en microbiologie et étudier les facteurs de risques pouvant causer cette maladie.

Conclusion

Conclusion :

Dans notre travail nous sommes intéressées à l'identification de la microflore de la cavité buccale et de déterminer les germes les plus abondants et ceux qui peuvent être la cause des infections bucco-dentaires en formant des biofilms bactériens.

L'étude des échantillons obtenus des deux laboratoires (polyclinique et cabinet chirurgiens dentaire privés de Médéa) est basée sur la méthode des analyses biochimique et microbiologique. Ces analyses ont été effectuées au niveau de laboratoire de bactériologie (laboratoire de l'EPSP de Médéa)

A la lumière de nos résultats obtenus, il en ressort que les prélèvements réalisés sont poly-microbiens. Les Streptocoques, les Staphylocoques, les Entérobactéries et les levures constituent la microflore la plus abondante.

Les résultats obtenus par l'antibiogramme montrent que la majorité des bactéries sont sensibles aux antibiotiques testés sauf *Streptococcus* sont résistants aux Pénicilline, Vancomycine et Clindamycine et *Staphylococcus aureus* a été résistante aux Pénicilline.

Le biofilm dentaire constitue une varie société bactérienne ou existe l'entre aide, le partage et même la concurrence. On le considère comme le facteur déclenchant des maladies parodontales. Ainsi la prophylaxie qui n'est autre que l'hygiène bucco-dentaire est obligatoire.

Les études d'adhésion bactérienne et de formation du biofilm ont été réalisées par les méthodes Rouge Congo et méthode de plaque de culture de tissue montre que certains souches isolés étaient productrices de biofilm et de slime (1 *Streptococcus*, 1 *Staphylococcus aureus*) pour les souches *P.aeruginosa* et levure (*Candida albicans*) qui sont non productrice de slime et de biofilm.

Les maladies bucco-dentaires, y compris les caries dentaires et les maladies parodontales, sont généralement causées par un large éventail de microorganismes associés au biofilm buccale ou à la plaque dentaire.

La propolis est un composé biologique très complexe, d'une très grande diversité, leurs conférant une multitude de propriétés, aussi bien sur le plan nutritionnel que sur le plan thérapeutique.

Conclusion

Au terme de notre étude nous pouvons formuler quelques précautions de réduire la consommation des sucres surtout les enfants car la contamination par les Streptocoques peut engendrer des conséquences graves. Et surtout faire le brossage quotidiennement des dents et la langue de deux minutes avec une brosse à dent souple après chaque repas pour éviter la formation de plaque dentaire qui cause les infections buccale.

En perspective :

Ceci n'est qu'une initiation d'un gros travail qui reste à faire ; nous projectons dans le futur proche, vers une identification complétes des divers espèces de la flore bucco-dentaire par l'utilisatioin de la galerie API

Au vu des résultats prometteurs obtenus, et du potentiel du sujet traité. S'y approfondir un peu plus et de différentes approches semble un projet à envisager dans le future.

Références bibliographiques

Références bibliographiques :

A

A.dos Santos Pereira, A.C. Pinto, J.N. Cardoso, F.R. de Aquino Neto, M.F. de Souza Ramos, G.M. Dellamora-Ortiz et E.P. dos Santos, J. High Resolu. Chromatogr. 21(1998) 396-400.

Aas J. A., Paster B. J., Stokes L. N., Olsen I., Dewhirst F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. Journa of Cinical Microbiology 43, 5721-5732.
Aas J.A, Paster B.J, Stokes L.N, Olsen I, Dewhirst F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. J. Clin. Microbiol. 2005;43(11) :5721-5732;

Abbad, H., & Ouldamer, S. (2016). Contribution à l'étude des effets antioxydants d'extrait éthanolique de propolis de la wilaya de sétif (Thèse de doctorat, université de Bouira).

Abe S, Ishihara K, Adachi M, Okuda K. Oral hygiene evaluation for effective oral care in preventing pneumonia in dentate elderly. Arch Gerontol Geriatr 2006 ; 43 : 53-64;

AFSSAPS (2001). Microbioogie des infections bucco-dentaires.

Ahn, M.-R.; Kumazawa, S.; Usui, Y.; Nakamura, J.;Matsuka, M.; Zhu, F.; Nakayama, T. Antioxidant Activity and Contituents of Propolis Cpllected in Various areas of China. Food Chemistry 2007, 101, 1383-1392.

Ait Kaci, S. and Hamdi, M.S., (2008).Contribution à l'étude des paramètres physico-chimiques et bactériologiques de l'embouchure de l'oued "Béni-Messous". Mémoire de DEUA en science de la mer. (I.N.S.M.A.L).

AL-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., & Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. Medicines, 5(1), 2.

Albert., Olivier. (1994). Conseils à l'officine dans le domaine de l'hygiène buccodentaire. Thèse pour le diplome d'état de Docteur en Pharmacie. Toulouse : Université Paul Sabatier.

Almasaudi, S. B., Al-Nahari, A. A., El Sayed, M., Barbour, E., Al Muhayawi, S. M., Al-Jaouni, S., ... & Harakeh, S. (2017). Antimicrobial effect of different types of honey on Staphylococcus aureus.Saudi journal of biological sciences, 24(6), 1255-1261.

Alnnasouri, M. (2010).Etude du développement de biofilms dans des réacteurs detraitement d'eau. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Andelkovi B., Vujisi L., ckovi I. V., Tesevi V., Vajs V., devac D G. (2016). Metabolomics study of Populus type propolis. Pharmaceutical and Biomedical Analysis; S0731- 7085: 30493-9.

AS. Pereira, M. Norseil, J.N. Cardoso, F.R. Aquino Netoet M.F.S. Ramos, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 5226-5230.

Auger M. (2012). Formation de biofilm in vitro par des souches cliniques d'Escherichia coli : impact de la modification des conditions expérimentales. Thèse de doctorat. Université de Nantes, France.

B

Bailey, Scott's (2014) Diagnostic Microbiology. China: Elsevier, 13th ed. ISBN: 978-0-323-08330-0.

Bailey, Scott's (2014) Diagnostic Microbiology. China: Elsevier, 13th ed. ISBN: 978-0-323-08330-0.

Bauer T.T., Torres A., Ferrer R., Heyer C.M., Schultze-Werninghaus G. et Raschek., 2002. Biofilm Formation in Endotracheal Tubes-Association between Pneumonia and the Persistance of Pathogens.Monaldi Archives for ChestDisease. 57 :84-87.

Bellifa S. (2014). Evaluation de la formation du biofilm des souches de Klebsiella pneumoniae isolées de dispositifs médicaux au CHU Tlemcen. Thèse de doctorat .Université abou bekr belkaid, Tlemcen.

Bendinger B., Rijnaarts H. H., Altendorf K., Zehnder A. J. (2003). Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. Applied and environmental microbiology. 59(11): 3973-3977.

Bercey., Tenembaum. (1996). Parodontologie de diagnostic à la pratique. Bruxelles : De Boeck Supérieur, p 50- 97-98-107-108-128-195 -197-199-200.

Bercy P, Tenenbaum H. Parodontologie : du diagnostic à la pratique. De Boek Supérieur ; 2017. 290 p.

Bercy P., Tenenbaum H. Parodontologie : du diagnostic a la pratique. Paris, Bruxelles : De Boeck Universite, 1996;

Bonvehi, J. ; Gut iérrez, A. Antioxidant Activity and tatal phenolics of propolis from the Basque. Cpuntry (Northeastern Spain). Journal of the American Oil Chemists' Society 2011, 88, 1387-1395.

Bouchard P., 2015. Odontologie Parodontologie dentisterie implantaire. Vol.1. medecine parodontale, Lavoisier paris.

Boulkroune, H. (2008). Contribution à l'étude biologique du pouvoir auto-épurateur de l'eau : cas du marais d'El-Kennar. Mémoire due Magister. Université de Jijel. 119p.

Bousseboua, H. (2003). Cours de microbiologie générale. Université Mentouri Constantine. page:28-12 ISSN : 9947-0-0192-3

Boutaleb N. (2007). Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Universités de Bretagne-Sud, France. 174 pages.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. P. 131-164.

Branger A., Richer M-M., Roustel S. (2007). Quelque système microbien : les biofilms. Dans : Microbiochimie et alimentation. Educagri éditions, dijon. p.131-164.

Brown A, Smith H (2015) Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology. New York: McGraw-Hill, short version, 13th edition. ISBN: 978-0-07-340241-3.

Brown A, Smith H (2015) Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology. New Leboffe M.J, Pierce B.E (2011) Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. United States of America: Morton, 4 th ed. ISBN: 978-089582-872-9.

Burdock G A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem. Toxicol.; 36 :347-363

Burne R.A. et Marquis R.E., 2000. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries.FEMS Microbiology Letters 2000, 193:1–6.

Burne R.A., Zeng L., Ahn S.J., Palmer S.R., Liu Y., Lefebure T., et al., 2012. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health.Advances in Dental Research 2012, 24:77–80.

C

Carbonnelle, D. and Kouyoumdjian, S. (1988). Bactériologie médicale techniques usuelles. Méd. Mal. Inf. 251 p.

Cardon-Nomblot, S. (2016). Avoir une ruche : modèles (ruche Dadant…) et pratiques apicoles. Futura. https://www.futura-sciences.com/planete/dossiers/zoologie-abeillesaccueillir-ruche-chez-soi-976/page/6

CA-SFM. (2012). ''Comite de l'antibiogramme de la société française de microbiologie recommandations 2012.'' 2012. Retrieved 25 mai, 2013, from/ www.sfm-microbiologie.org/.

Castaldo S et Capasso F. (2002). La propolis, un vieux remède utilisé dans la médecine moderne. Fitoterapia ; 73 Suppl. ; 1 : S1-S6.

Cavézian R, Pasquet G, Baller G Imagerie dento-maxillaire, approche radioclinique. Elsevier Masson, Paris, 3e edition ; 2006 ;

Cavézian R, Pasquet G, Bel G, Baller G Imagerie dento-maxillaire, approche radioclinique. Elsevier Masson, Paris, 3e edition; 2006;

Chalvet de Rochemonteix A. (2009). Les biofilms et la peau. Thèse pour le Doctorat vétérinaire. Ecole Nationale Vétérinaire D'alfort Paris.

Characklis WG, Marshall K.C. (1990). Biofilms.John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Chardin H., Barsotti O., Bonnaure-Mallet M. (2006). Microbiologie en odonto-stomatologie. Paris : éditions Maloine.

Chhour K.L., Nadkarni M.A., Byun R., Martin F.E., Jacques N.A., and Hunter N. (2005). Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. J. Clin. Microbiol. 43(2) : 843–849. doi:10.1128/JCM.43.2.843-849. PMID:15695690.

Chomicz L. 2016. Identification of infectious microbiota from oral cavity environment of various population group patients as a preventive approach to human health risk factors. Ann Agric Environ Med. 23: 566-569.

Christophe GD. , Simpson WA., Bisno AL., Beachy EH. (1985). Adherence of biofilm producingstrains of Staphylococciepidermidis to smooth surfaces. Infection andImmunity 37 :318-326.

Ciancie S. (2003). Improving oral health : Currentconsideration. J.Clin. Peridontol. ; 30 : 4-6.

Coenye T, De Prijck K, De Wever B, Nelis HJ. 2008. Use of the modified Robbins device to study the in vitro biofilm removal efficacy of NitrAdineTM, a novel disinfecting formula for the maintenance of oral medicaldevices. Journal of AppliedMicrobiology. 105 :733-740.

Connie R.M, Donald C.L (2019) Textbook of diagnostic microbiology.Elsevier Saunders, 6 th ed. ISBN: 978-0-323-48218-9.

Corby P.M., Lyons-Weiler J., Bretz WA., Hart T.C., Aas J.A., Boumenna T., Goss J., Corby A.L., Junior H.M., Weyant R.J., Paster B.J. (2005). Microbial risk indicators of early childhood caries. J Clin Microbial 43 :5753-5759.

Courson F, Landru M.-M, Gerval J. La carie dentaire. Paris : hermann, 1998. 122 p ;

D

De Chalvet De Rochemonteix A. (2009). Thèse de Doctorat .Les biofilms et la peau. La faculté de médecine de Crétei

Dechaume M. Précis de stomatologie. Paris: Masson. 1960;

Decoster. (2008). Les streptocoques - Cours de Anne Decoster, FLM, page :1; 6.DelarrasC.(2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Lavoisier. Editions TEC and DOC.

Docteur Yves Donadieu, les produit de la ruche. 3ième Edition. 1981.

Donlan R.M. (2002). Biofilms : Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases ;8, 9 : 881-890.

Donlan RM (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerging Infectious Disease journal. 8 (9): 881-890

Donlan RM, Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews.15: 167- 193.

Dumas C. (2007). Catalyse électro-microbienne dans les piles à combustible. Thèse de Doctorat. Institut National polytechnique de Toulouse. 306 pages.

Duqueyroix, S. (2015). La propolis, l'antibiotique de la ruche. Le magazine de la Ruche Qui Dit Oui. Consulté le 08 aout 2020, à l'adresse https://magazine.laruchequiditoui.fr/la-propolis-antibiotique-meconnu/

Duyninh T, Jame O et coll., Classification des maladies parodontales, 2005 ;

E

Eric Debuyser., 1984. La propolis. Thèse pour e diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université De Nante, faculté de pharmacie.

Evaluation of Biofilm Formation on the Fixed Twin Block Appliance: A Clinical Trial. Int J
Expertise-collective, INSERM. (1999).Rapport : Maladies Parodontales Thérapeutiques et prévention.

F

Faure S. « L'anatomie bucco-dentaire ». Actual. Pharm. avril 2010. Vol. 49, n°495, p. 14;

FERHOUM, F. (2010). Analyses physico chimiques de la propolis locale selon les étages bioclimatiques et les deux races d'abeille locales (Apis mellifica intermissa et Apis mellifica sahariensis). Mémoire de magister en Technologie alimentaire, Université de M'hamed Bougara Boumerdès.

Filloux,A. et Vallet, I.(2003).risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.Med Sci (Paris) 19, 77-83.

Foster J.S. et Kolenbrander P.E., 2004. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell.Appl. Environ. Microbiol., 70 :4340-4348.

Frias-Lopez J. et Duran-Pinedo A., 2012. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. J. Bacteriol., 194 :2082-2095.

Front Oral Biol., 15:1-16.
Fronty P, Sapanet M, Georget C, Collet G. L'identification estimative – première;2005;

Fronty P, Sapanet M, Georget C, Collet G. L'identification estimative – Première; 2005;

G

G.A. Burdock, Food Chem. Toxicol. 36 (1998) 347-363.

Galmiche, F. (2011). *Le role de l'alimentation dans la santé buccodentaire*.

Gangon J. Altération du goùt d'origine médicamenteuse.

Garnier M, Delamare V, Delamare J. Dictionnaire illustré des termes de médecine. In : Dictionnaire illustré des termes de médecine. Maloine. 2017.

Genco R. Using antimicrobial agents to manage periodontal diseases. JADA 199; 122, 30–38;

GENDRON R, GRENIER D, MAHEU-ROBERT LF (2000). La cavité buccale : une source de bactéries pathogènes pour les infections à distance. Journal dentaire du Québec 37 :257-266.

Gillespie S.H, Hawkey P.M (2006) Principles and Practice of Clinical Bacteriology. England: John Wiley & Sons Ltd, 2nd ed. ISBN-13 978-0-470-84976-7.8 mai 1945 Guelma.78p. 64

Goller C.C, Romeo T. (2008). Environmental influences on biofilm development. Current Topics in Microbiology and Immunology.322: 37- 66

Grara Nedjoud, (2001/2002). Isolement, identification des lactobacilles de la cavité buccale et etude de leur sensibilité aux antibiotiques et à l'hexitidine. Mémoire de MAGISTER; page 23, 24, 29, 34.

Grollier G. A., Le Moal G. B., Robert R. (2004). Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (Clostridium difficile et Actinomyces exus). Elsevier SAS. EMC-maladies infectieuses ; 262-280.

Guilaume, G. N. et Marc, C. L. (2011). *Streptococcus mutans* et les Streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. Rev. can. Microbiol. 57 : 1-20.

Guillaume, P.Y. (2004). Les milieux de cultures 32.

H

Hafstrom C, Wikstrom M, Renvert S, Dahlen G. Effect of treatment on some periodontopathogens and their antibody levels in periodontal abscesses. J Periodontol 1994; 65, 1022–1028;

Haikel Y. Carie dentaire. In E. Piette, & M. Goldberg, La dent normale et pathologique. Bruxelles : De Boeck Universite. 2001; pp. 99- 125;

Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et Stoodley P., 2004. Bacterial biofilms ; from the natural world to infectious disease. Nat. Rev. Microbiol, 2 (2) : 95-108.

Hamadi F., Latrache H., El Ghmari A., Ellouali M., Mabrrouki M., Kouider N. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and electron acceptor characteristics of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.Annals of Microbiology. 54: 213-225.

Hiam Wehbé, Edgard Nehmé, Jeanine Hoyek Gebeily. Abces parodontal palatin V/s carcinome : approche clinique. Medecine orale/Oral Medicine. IAJD; 2011- Vol. 2 – Issue 2. ;

Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. et Maeda N., 2009. Bacterial interactions in dental biofilm development.J Dent Res. , 88 :982-990.

Hola V. et Ruzicka F., (2011), The formation of Poly-Microbial Biofilm on UrinaryCatheters, Urinary Tract Infections,153-172.

Hou W., Sun X., Wang Z. et al., (2012), InvestigativeOphthalmology& Visual Science, The Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9.5624.5631.

http://aphtes.spondylarthrite-ankylosante.org/aphte-epidemiologie-etiologieetcontextes-dapparition/

https://www.laboratoire-medident.fr/blog/aphtes-comment-soigner-un-aphte-n110;

https://www.pharmashopi.com/propolis-spray-pxl-178_720_728.html

I

Ingle, NA., Dubey, HV, Kaur, N and Gupta, R. (2014).*Prevalence of dental caries among school children of Bharatpur city*, India. J IntSocPrevCommunity Dent. 4(1):52-5. doi:10.4103/2231-0762.131267.

Irie Y. et Parsek M., (2008). Quorum sensing and microbial biofilm, Curr Top MicrobiolImmunol, 322: 67-84.

J

Jaramillo A, Arce R, Herrera D, Betancourth M, Botero J,Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. J Clin Periodontol 2005; 32: 1213–1218 ;

Jass J, Surman S, Walker J (2003) Medical biofilms detection, prevention and control. England: John Wiley & Sons. ISBN: 0-471-98867-7.

Jenkinson H. F. et Lamont R. J., 2005. Oral microbial communities in sickness and in health.Trends in Microbiology, 13:589-595.

Juliette. (2019). Propolis : Existe-t-il des effets indésirables ou un danger potentiel ? Natural Athlete Club. Consulté le 5 aoit 2020, à l'adresse https://naturalathleteclub.com/blog/propolis-danger-effets-secondaires/

Jung c. Les infection bactérienne bucco –dentaires :consiel du pharmacien. Thèse. 2018

Jung C. Les infections bactériennes bucco-dentaires : conseil du pharmacien. Thèse. 2018 ;

K

K. Ghedira, P. Goetz, R. Le Jeune ;'' Propolis'', Phytotherapie ; 2009 ; 7 ; 100–105.

Kaqueler J.C., Le May O. (1998). Anatomie pathologique bucco-dentaire, 2ème édition. Paris : Masson.

Kara Terki, I. (2014). Caractérisation et évoluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen.

Keijser B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., ten Cate J.M., Crielaard W., 2008. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. J Dent Res., 87(11) :1016-20.

KERNER S (2005). Microbiologie et maladies parodontales. Le « point de vue » des bactéries. Information Dentaire 16 :943-946.

Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Egland P.G., Foster J.S., Palmer R.J. Jr., 2002. Communication among oral bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 66 :486-505.

Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B. 2018.Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease –Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase.Front. Microbiol. 9: 53.

Kukavica-Ibrulj I. (2007). Chapitre 1. Introduction. Collection mémoires et thèses électroniques .Université Laval. Québec, Canada.

L

Laison F, Gaudy J.-F. Anatomie cranio-faciale. Paris : Masson, 1993. 292 p ;

Lasfargues J.J. et Colon P., 2009. Odontologie conservatrice et restauratrice. Une approche médicale globale. Tome 1. Éd. CdP. Paris. (XXIII-480 p.).

Laurent, F.(2011). Biofilm bacterien. Université de Médecine de Lyon. http://www.infectiologie.com/site/medias/enseignement/seminaires_desc/2011-mai/desc mai2011-biofilm-laurent.pdf

Lautrou A. Anatomie dentaire. Paris, Milan, Barcelons, Editions masson, 2n édition ; légale, editions atlantique ; 1998 ;

Leboffe M.J, Pierce B.E (2011) Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory. United States of America: Morton, 4th ed. ISBN: 978-089582-872-9.

Lebres et Mouffok F. (2008). Le cours national d'hygiène et de microbiologie des eaux de boisson. Manuel des travaux pratique des eaux. Institut Pasteur d'Algérie. 53p.

Lebres, E. (2004a). Entérocoques et Streptocoques. Institut Pasteur d'Algérie.

Lebres, E. (2004c). Identification biochimique des micro-organismes, Institut Pasteur d'Algerie.

Lézy J-P, Prine G. Pathologie maxillo-Faciale et stomatologie. Masson; (ABREGES).

Li J., Helmerhorst E.J., Leone C.W., Troxler R.F., Yaskell T., Haffajee A.D., Socransky S.S., Oppenheim F.G., 2004. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. J Appl Microbiol., 97 :1311-1318.

Liesse Iyamba J-M. (2012).Etude de l'interaction des souches cliniques de Staphylococcus aureus avec une surface abiotique. Thèse de doctorat. Université Libre de Bruxelles d'Europe, France

Lignon G, Dure-Molla MD La, Dessombz A, Berdal A, Babajko S. l'émail : un auto-assemblage unique dans le monde du minéral. Médecine/Sciences. 2015;31(5):515-21;

Lindhe J., 1986. Manuel de parodontologie clinique. CdP Editions.

Lingstrom P, Holm A, Mejare I, Twetman S, Soder B, & Norlund A e. a. 118. Dietary factors in the prevention of dental caries : a systematic review. Acta Odontol Scand. 2003;

Loe H, Theilade E, & Jensen B. Experimental Gingivitis in Man. Journal of Periodontology. 1965;

Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. J Periodontol.1965; 36: 177-187.

M

MankodI S.,BartizekR.D.,Winston J. l., BiesbrockA.R.,Stephen F., Mcllananahan.,Tao H. (2005). Antigingivitisefficacy of Stabilized 0, 454% StannousFluoride /Sodium hexametaphosphate dentifrice : A controlled 6 monthclinical Trial. J.Clin. Periodontol ; 32 :75-80.

Marchal M. (2010).Etude des biofilms bactériens arsénite-oxydants. Thèse de doctorat .Université de Strasbourg, France.

Marquis R. E., 1995. "Oxygen metabolism, oxidative stress adn acid-base physiology of dental plaque biofilms. Journal of Industrial Microbiology, 15: 198-207.

Marsh P.D., 1999. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. Dent Clin North Am 43:599–614. (Figure 03).

Marsh P. D., 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. J Clin Periodon

Marsh P.D., 2004. Dental plaque as a microbial biofilm. Caries Res., 38 :204-21.

Martinez LR, Casadevall A. (2007). Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on Cryptococcus neoformans biofilm formation depends on surface support and carbone source

and reduces fungal cells susceptibility to heat, cold and UV light. Applied and Environmental Microbiology. 4592- 4601.

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., Rattan A. (2006). Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. Indian Journal of Medical Microbiology. 24: 25-29.

Mazmanian S.K. et Kasper D.L., 2006. The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system.Nat Rev Immunol. , 6:849-858.

Meng H. Periodontal abscess. Annals of Periodontol 1999; 4:79–83;

Meurman J.H., Kari K., Waltimo T., Kotinanta A., KeriJ.,le S. (2006). Invitro antifungaleffect of amine fluoride – Stannousfluoridecombinationon oral albicansspecices. Oral diseases ; 12 :45-50.

Moore W.E., Moore L.V. (2000).The bacteria of periodontal diseases.Periodontol ; 5:66- 77.

Moulin, B. (2020). Propolis : bienfaits et utilisation. Doctonat. Consulté le 5 août 2020, à l'adresse https://doctonat.com/propolis/

MOUTON C, ROBERT J-C (1994a). infections loco-régionales et métastases des infections bucco-dentaires. In : Pathologies buccales d'origine bactérienne. C Mouton and J-C Robert editors. Paris : Masson, pp. 161-173.

Mouton C., Robert J.C. (1993). Bactériologie buccodentaire. Paris : Masson, 2-225-84360- 0.

Muller-Bolla M, Courson F, Dridi S-M, Viargues P, L'odontologie préventive au quotidien, Maladies carieuses et parodontales, malocclusion. 2013;

N

Nasr SA., AbuShady H M., Hussein HS. (2012). Biofilm formation and presence of ica AD gene in clinical isolates of staphylococci. The Egyptian Journal of Medical Human Genetics 1110-8630.

Nauciel C, Vildé J.L (2007) Bactériologie médical. Elsevier Masson SAS, 2ème éd. ISBN: 978-2-294-08994-7.

Nguyen H, Vallee B, Person H. Nouveaux dossiers d'anatomie PCEM : Tète. Paris : Heures de Frances, 1994. 257 p.

Nicolas G.G., Lavoie M.C. (2011). Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. Revcanmicrobiol. 57: 1–20. (Figure 02).

Nobbs, A. H., Lamount, R. J. and Jenkinson, H. (2009), ―Streptococcus adherence and colonization‖, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 73 No. 3, pp. 407-505

O

Oli A.K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R. (2012). Biofilm formation by Multidrug resistat *Eterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. *Journal of Microbiologie and Biotechnology Research*.

OMS. Appel à l'action pour promouvoir la santé dentaire en utilisant le fluor, FDI et IADR, 2006;

OMS. Rapport : Santé bucco-dentaire. 2018;

Oral Dent Health. 4:066.
Organisation mondiale de la santé (OMS). Santé bucco-dentaire – Aide-mémoire 2012. Genève : OMS ; 2012 ;

Organisation mondiale de la santé (OMS). Santé bucco-dentaire –Aide-mémoire 2012. Genève: OMS; 2012;

Ouhayoun J.P. (2012). Le traitement parodontal en omnipratique. Quintessence international, p 38-77-122

P

Paes Leme A.F., Koo H., Bellato C.M., Bedi G. et Cury J.A., 2006. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation---nex insight. J. Dent. Res., 85 :878-887.

Paster B.J, Boches S.K, Galvin J.L, Ericson R.E, Lau C.N, Levanos V.A, Sahasrabudhe A, Dewhirst F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J.Bacteriol. 2001 ; 183(12):377-3783;

Pechère, J. C., Acar, J., Grenier, B. et Nihoul, E. (1982).Reconnaitre, comprendre et traité les infections. 4ème édition. Edisem ST-Hyacinthe. Québec. 509p.

Peeters.E., Nelis, H. J. &Coenye, T. (2008). Compaaison of multiple méthode for quantification of microbial biofilms grown ,in microtiter plates. J MicrobiolMethods 72,157-165.

Pereira Dos Santos A C., Pinto J.N., Cardoso F R., De Aquino Neto M F., De Souza Ramos G M., Dellamora-Ortiz et E P., Dos Santos J. (1998). High Resolu. Chromatogr.; 21:396-400.

Perrin, C. (2009). Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'Escherichia coli K-12. L'Université Lyon I - Claude Bernard, France.

Petersilka G.J., 2000. Subgingival air-polishing in the treatment of periodontal biofilm
Philip, D. Marsh and Michael, V. Martin.(2009). Oral Microbiology, fifth edition. S.I. : Churchill Livingstone Elsevier, Elsevier limited.

Philippe J. M. (1999). Le guide de l'apiculteur. Troisième Edition EDISUD. P1087.

Piette E., Goldberg M. la dent normale et pathologique. Bruxelles : De Boeck Université, 2001. 392 p;

Pilet, C. (1987). Bactériologie médicale et vétérinaire. Systématiquebactérienne. Doin. 371p.

Pitts N.B., 2001. Clinical diagnosis of dental caries: a european perspective. J Dental Educ., 65(16) : 972-978.

Pobiega, K., Przybył, J. L., Żubernik, J., & Gniewosz, M. (2020). Prolonging the Shelf Life of Cherry Tomatoes by Pullulan Coating with Ethanol Extract of Propolis During Refrigerated Storage. Food and Bioprocess Technology, 13(8), 1447-1461. https://doi.org/10.1007/s11947-020-02487-w

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2017). *The Laboratory Identification of Yeasts* In: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.

Propova, M.; Bankova, V.; Butovska, D.; Petkov, V.; Nikolova-Damyanova, B.; Sabatini, A. G.; Marcazzan, G. L.; Bogdanov, S. Validated Methodes for the Quantiffication of Biologically Active. Constituents of Poplartype Propolis. Phytochemical analysis 2004, 15, 235-240.

R

Reggam, A. (2010). Evaluation de la Qualité Physico – Chimique et Bactériologiques des Eaux Potables : Cas de la Station de Traitement de Hammam Debagh–Guelma, Mémoire de Master. Université de 08 Mai 1945 Guelma, 75p.

Righetti S. Le pharmacien face aux infections bacteriennes buccales. Thèse 2007. Nancy;

Rodier, J. (1996). L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer, chimie,physicochimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. 8ème édition DUNOD. 1384p.

Rodier, J. (2009). L'analyse de l'eau. 9ème édition, DUNOD.Paris.1579p.

Rouaiguia, M. (2010). Qualité micrbiologique de l'eau d'Oued Messida. Mémoire de master 2. Université 8 mai 1945 Guelma.78p. 64

Rouaiguia, M. (2010). Qualité micrbiologique de l'eau d'Oued Messida. Mémoire de master 2. Université York: McGraw-Hill, short version, 13th edition. ISBN: 978-0-07- 340241-3.

Roux A. Et Chigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, Bull. Acad. Vêt, 261-268.

Roux A. Et Chigo J-M. (2006). Les biofilms bactériens. Communication, Bull. Acad. Vêt, 261-268.

S

S. Castaldo, F. Capasso, Fitoterapia 73 Suppl. 1 (2002) S1-S6.

Sambou, M., Jean-François, J., Ndongou Moutombi, F. J., Doiron, J. A., Hébert, M., Joy, A. P., ... & Touaibia, M. (2020). Extraction, Antioxidant Capacity, 5-Lipoxygenase XXIV Inhibition, and Phytochemical Composition of Propolis from Eastern Canada.Molecules, 25(10), 2397.

Sanz M, Beighton D, Curtis MA, Cury JA, Dige I, Dommisch H, et coll. Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease.J Clin Periodontol .2017; 44(Suppl 18): S5-S11.

Sayad, L. (2008). Qualité physico-chimique et bactériologie des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux (wilaya de Taraf). Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. 125p.

Scannapieco and Frank, A. (2013). « The oral microbiome : its rôle in health and in oral and systemic infections ». Clinical Microbiology Newsletter. Elsevier, Vol. 35, 20, pp.163-169.

Secci, G. 2006). Manuel d'hygiène bucco-dentaire, Destiné à la formation de prophylaxistes, SDI 2006 / 2007, Ed. n°1.

Selwitz R.H., Ismail A.I. et Pitts N.B., 2007. Dental caries. Lancet, 369:51–59.

Shahali, Y., Kler, S., Revets, D., Planchon, S., Renaut, J.,Pourpak, Z.,… &Hilger, C. (2020). Apport de l'immunoprotéomique à l'évaluation du risque allergique lié à la propolis. Revue Francaised'Allergologie, 60(4), 317-318.

Sixou J.L., Bailleul-forestier I., dajean-trutaud S. et Vaysee, F., 2004. Recommandations sur la prescription des fluorures de la naissance à l'adolescence. J. Odont. Stomatol.Pediatr., 11 : 157-156.

Sixou M., DiRienzo J.M., Slots J., SixouM.,Sol M.A., Harmon R.,Mckay T. (1994).Specificgeneticvariants of Actinobacillusactinomycetemcomitanscorrelatewithlocalizedjuvenileperiodontitis. Infection and Immunity, 26 (8) : 3058 – 3065.

Slinger R., Chan F., Ferris W., Yeung S.W., St-Denis M. ,Gaboury I. et Aaron S.D. , 2006. Multiple combination Antibiotic Susceptibility Testing of Non-Typeable Haemophilus Influenzae Biofilms.Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 56 :247-253.

Smith R & Davies R. Acute lateral periodontal abscesses. Br Dent J 1986;161:176– 178;

Société Française de Chirurgie Orale (SFCO). Prise en charge des foyers infectieux bucco-dentaires. Med Buccale Chir Buccale 2012;18:251-314;

Socransky S.S, Haffajee A.D., 2002. Dental biofilmq : difficult therapeutic targets. Periodontol., 28 :12-55.

Socransky S.S. et Haffajee A.D., 2005. Periodontal microbial ecology.Periodontol., 38:135-187.

Spormann AM. (2008). Physiology of microbes in biofilms stability of Burkholderia cenocepacia biofilms. Applied and Environmental Microbiology.5208- 5218

Stepanovic S. ,Vukovic D., Dakic I., Savic B.S., Vabic-Vlahovic M. (2000). Amodifiedmicrotiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal ofMicrobiologicalMethods. 40 :175-179.

Struillou X. (2002).Classification des maladies parodontales. Journal de Parodontologie & d'immplantologie Orale 21 :373-379.

T

Takahashi N., 2005. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress Series, 1284 :103 – 112.

Takahashi N., 2005. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress Series, 1284 :103 – 112.

Takahashi. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity : Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress series, 1284 : 103 – 112.

Takane VV, Jatti R, Bhat K, Keshan D, Keluskar K, et al. 2018. Microbiological
Tonetti MS, Eickholz P, Loos BG, Papapanou P, Van der Velden U, Armitage G, et coll. Principles in prevention of periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases.J Clin Periodontol. 2015; 42(Suppl 16): S5- S11.

Touati A., Achour W., Abbassi et al., (2007), Détection des gènes ica et de la production de slime parmi des souches de Staphylococcus epidermidis isolées d'infections liées aux cathéters chez des patients neutropéniques, Pathologie Biologie, 55 : 277–282.

V

Vaillant L, Samimi M, Parent D. Aphtes, aphthoses, maladie de Behçet. EMCDermatol. 2016;11(1):1-13;

Vidailhet B, Robin O., olo A, Bravetti P, Mahler P. « Salivation ». EMC-Médecine Buccale. 2008. p. 1‑8;

Vidailhet B, Robin O., olo A, Bravetti P, mahler P. <<salivation>> EMC- Médecine buccale. 2008. P. 1-8 ;

Vidailhet B,Robin O., olo A, Bravetti P, Mahler P.(Salivation) . EMC – Médecine buccale . 2008 .P. 1-8

Vincent, A. (2008).Infection associées aux soins définition, fréquences et facteurs de risque.Laprugne-GARCIA E, Saint genislaval.CCLIN sud-est.CCLIN, p5.

Virtanen, E., Söder, B., Andersson, L.C., Meurman, J.H and Söder, P.O. (2014). History of Dental Infections Associates with Cancer in Periodontally Healthy Subjects: A 24-Year Follow-Up Study from Sweden. *Journal of Cancer*.2; 5Suppl 2:79-85.

W

Walker C., Sedlacek M.J. (2007). A2. Takahashi, N. (2005). Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress Series, 1284:103 – 112

Walsh C.T, Wencewicz T.A (2016) Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities. Washington DC: ASM Press. ISBN: 9781555819309.

Walsh LJ. Dental plaque fermentation and its role in caries risk assessment. Int Dent South Afr. 2006 ; 8(5) : 34-41.

Willey J.M, Sherwood L.M, Woolverton C.J (2008) Prescott, Harley, and Klein's microbiology. New York: McGraw-Hill, 7 th ed. ISBN: 0-07-299291-3

Woelfel JB, Scheid RC. Anatomie dentaire. Application à la pratique de la chirurgie dentaire. Paris, Editions Maloine ; 2007 ;

Z

Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. 2012. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. Oral Diseases. 18: 109-120.

Zawadzki PJ, Perkowski K, Starościak B, Baltaza W, Padzik M, Pionkowski K,
Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001). Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming.Methods in Enzymology. 336: 195-203.

Zijng V,van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, et al Oral Biofilm Architacture On Natural Teeth.PLoS ONE 5(2) 2010; e9321. doi: 10. 1371/journal.pone.000932

Zijnge V., Ammann T., Thurnheer T. et Gmür R.,2012. Subgingival biofilm structure.

Annexes

Annexes :

Annexes 01 : Les compositions du milieu de culture.

Milieu de culture	Composition
Gélose Chapman	- Peptone 10g - Extrait de viande de bœuf 0,1 g - Chlorure de sodium 75g - Mannitol 10g - Rouge de phénol 0,025 g - Agar 15g - PH = 7,5 - Eau distillée stérile 1000ml
Gélose Sabouraud	- Peptone 10 g - Glucose 40 g - Agar 15g - Ph 5,6 - Eau distillée stérile 1000ml
Gélose nutritive	- Peptone 5 g - Extraits de viande 1 g - Extraits de levure 2 g. - Chlorure de sodium 5 g - Agar 15 g - Ph = 7,4 +/- 0,2 - Eau distillée stérile 1000ml
Bouillon nutritif	- Peptone 5 g - Extraits de viande 1 g - Extraits de levure 2 g - Chlorure de sodium 5 g - Ph = 7,4 +/- 0,2 - Eau distillée stérile 1000ml - Ph = 7,1 - Eau distillée stérile 1000ml
Milieu Chapman	- Extrait de viande de bœuf 1.00 g - Peptone * 10.00 g - Chlorure de sodium 75.00 g - Mannitol 10.00 g - Rouge de phénol 0.025 g - Agar 15.00 g - 0.2±pH final à 25 °C: 7.4 - * Digestion enzymatique de protéines.
Bouillon cœur-cervelle (BHIB)	- Extrait de cœur 5.00 g - Extrait de cervelle 12.50 g - Peptone * 10.00 g - Glucose 2.00 g - Chlorure de sodium 5.00 g - Phosphate disodique 2.50 g - 0.2±pH final à 25 °C: 7.4

Milieu Hektoen	- Protéose peptone 12.00 g - Extrait de levure 3.00 g - Chlorure de sodium 5.00 g - Thiosulfate de sodium 5.00 g - Sels biliaires 9.00 g - Citrate de fer ammoniacal 1.50 g - Salicine 2.00 g - Lactose 12.00 g - Saccharose 12.00 g - Fuchsine acide 0.1 g - Bleu de bromothymol 0.065 g - Agar 14.00 g - 0.2±pH final à 25 °C: 7.5
Gélose Muller-Hinton	- Peptone 17.5 g - Extrait de viande 2.00 g - Amidon 1.5 g - Agar 17.00 g - H final à 25 °C: 7.3 * Milieu utilisé pour l'antibiogramme
Columbia au sang	- Peptone 32.0 - Amidon 1.0 - Chlorure de sodium 5.0 - Agar 10.0 - PH 7.3 ± 0.2
Milieu Rouge Congo Agar (RCA)	- BHIB 37 g - Glucose 25 g - Agar 15g - Rouge Congo 0.8g - Eau distillée stérile 1000L - PH = 7.2g Stérilisation à l'autoclave à 115°C pendant 10 minutes.
Cristal violet (1%)	- Cristal violet 1g - Eau distillée 100 ml

Annexes 02 : Quelques matériels pour une étude microbiologique.



(1)



(2)



(3)



(4)



(5)



(6)



(7)



(8)



(9)



(10)



(11)



(12)



(13)



(14)



(15)



(16)



(17)



(18)



(19)



(20)



(21)

1. Microscope optique.	**2. Bec benzène.**	**3. Pipette pasteur.**
4. Tube à essai.	**5. Boite de pétrie.**	**6.Ecouvillon stérile.**
7.Eau distillé.	**8.Anse de platine.**	**9.Etuve.**
10.Bain marré.	**11.Autoclave.**	**12.Balance.**
13. Vortex.	**14.Réfrégirateur.**	**15.Agitateur.**
16. portoirs.	**17.Microplaque de 96 puits**	**18.Micropipette.**
19.Les disques d'antibiotique.	**20.Huile à immersion.**	**21.Les disques d'oxydases.**

Annexe 03 : Préparation de milieu de culture.





Figure 59 : Les milieux de culture utilisée **(Photo personnelle).**



Figure 60 : Préparation de milieu de culture **(Photo personnelle).**



Figure 61 : Balences **(Photo personnelle).**



Figure 62 : Ecouvillon stérille **(Photo personnelle).**



Figure 63 : Flacons **(Photo personnelle).**



Figure 64 : Propolis **(Photo personnelle).**



Figure 65 : Microscope optique **(Photo personnelle).**

Annexe 04 : Réalisation de la formation de biofilm (méthode TCP).

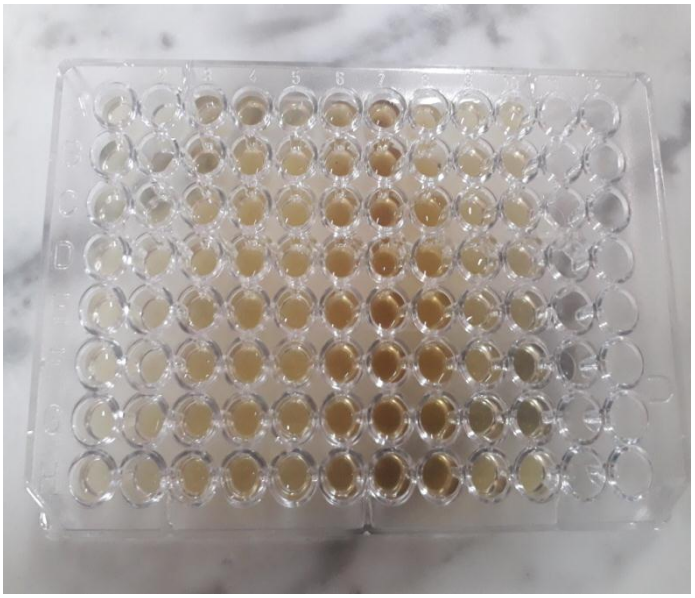


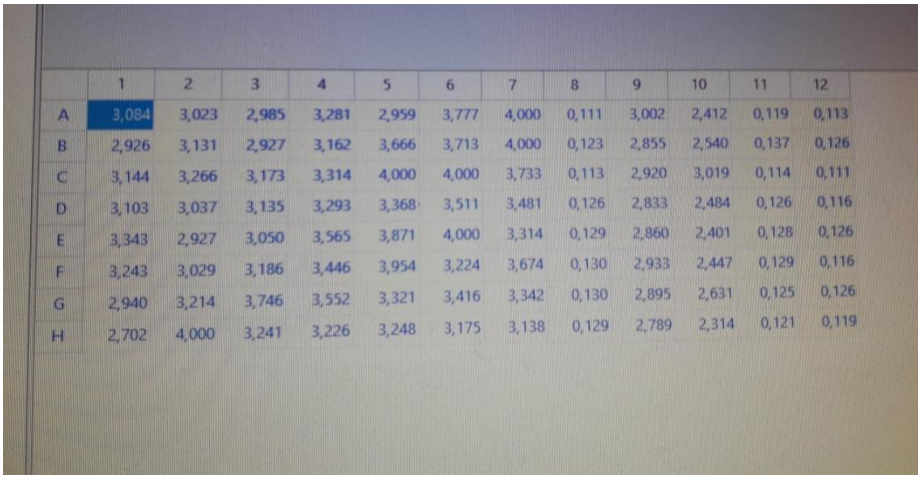
Figure 66 : Microplaque inoculé par suspension (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,975	1,680	3,164	3,032	3,377	4,000	3,615	4,000	2,887	2,443	0,117	0,116
B	3,169	1,452	3,064	3,251	3,539	4,000	3,242	3,837	2,931	2,409	0,114	0,111
C	2,742	1,760	2,897	3,084	3,085	4,000	3,437	3,261	2,841	2,334	0,109	0,115
D	3,051	1,865	2,914	3,326	3,091	3,364	4,000	3,457	2,865	2,297	0,123	0,110
E	3,204	1,552	2,735	3,643	3,052	3,308	4,000	3,109	3,089	2,236	0,124	0,118
F	3,839	1,334	2,957	3,754	3,224	3,509	4,000	4,000	4,000	2,421	0,129	0,118
G	2,816	2,062	3,171	4,000	3,332	3,525	3,549	4,000	3,013	2,286	0,131	0,126
H	2,864	1,618	3,553	3,183	3,013	3,326	3,784	4,000	3,081	2,236	0,124	0,132

Figure 67 : La lecture de microplaque inoculée par suspension sous l'ELIZA (*Stapylococcus aureus*) **(Photo perspnnelle).**



Figure 68 : Microplaque inoculé par suspension(*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	3,084	3,023	2,985	3,281	2,959	3,777	4,000	0,111	3,002	2,412	0,119	0,113
B	2,926	3,131	2,927	3,162	3,666	3,713	4,000	0,123	2,855	2,540	0,137	0,126
C	3,144	3,266	3,173	3,314	4,000	4,000	3,733	0,113	2,920	3,019	0,114	0,111
D	3,103	3,037	3,135	3,293	3,368	3,511	3,481	0,126	2,833	2,484	0,126	0,116
E	3,343	2,927	3,050	3,565	3,871	4,000	3,314	0,129	2,860	2,401	0,128	0,126
F	3,243	3,029	3,186	3,446	3,954	3,224	3,674	0,130	2,933	2,447	0,129	0,116
G	2,940	3,214	3,746	3,552	3,321	3,416	3,342	0,130	2,895	2,631	0,125	0,126
H	2,702	4,000	3,241	3,226	3,248	3,175	3,138	0,129	2,789	2,314	0,121	0,119

Figure 69 : La lecture de microplaque inoculée par a suspension sous l'ELIZA (*Streptococcus*) **(Photo perspnnelle).**

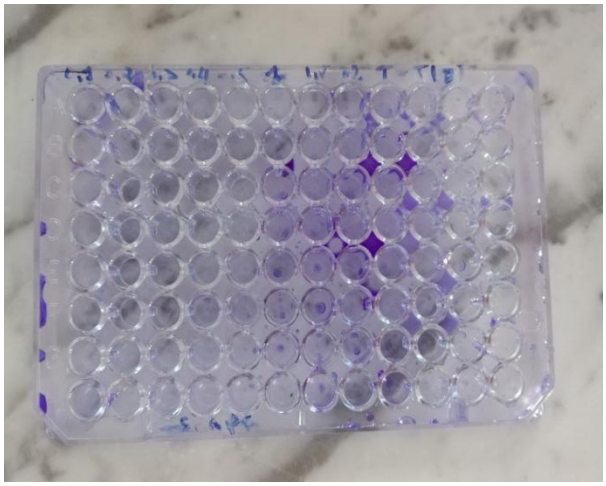
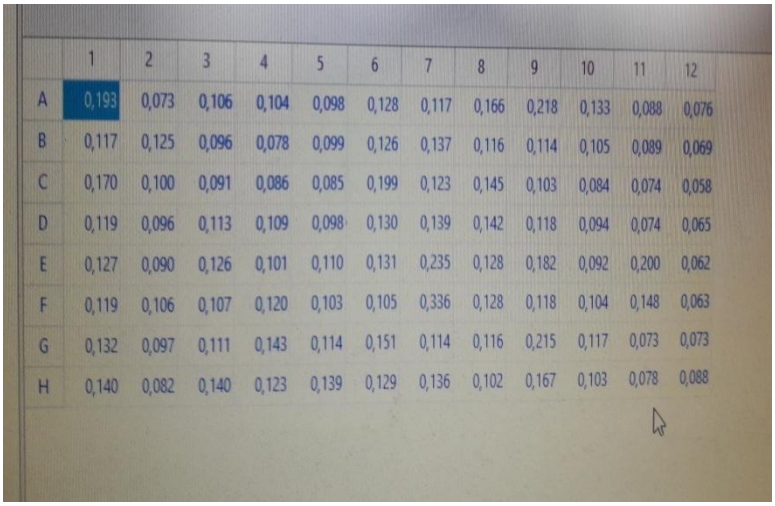


Figure 70 : Microplaque après coloration avec cristal violet (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,193	0,073	0,106	0,104	0,098	0,128	0,117	0,166	0,218	0,133	0,088	0,076
B	0,117	0,125	0,096	0,078	0,099	0,126	0,137	0,116	0,114	0,105	0,089	0,069
C	0,170	0,100	0,091	0,086	0,085	0,199	0,123	0,145	0,103	0,084	0,074	0,058
D	0,119	0,096	0,113	0,109	0,098	0,130	0,139	0,142	0,118	0,094	0,074	0,065
E	0,127	0,090	0,126	0,101	0,110	0,131	0,235	0,128	0,182	0,092	0,200	0,062
F	0,119	0,106	0,107	0,120	0,103	0,105	0,336	0,128	0,118	0,104	0,148	0,063
G	0,132	0,097	0,111	0,143	0,114	0,151	0,114	0,116	0,215	0,117	0,073	0,073
H	0,140	0,082	0,140	0,123	0,139	0,129	0,136	0,102	0,167	0,103	0,078	0,088

Figure 71 : La lecture de microplaque sous l'ELIZA après coloration avec cristal violet (*Stapylococcus aureus*) **(Photo personnelle).**

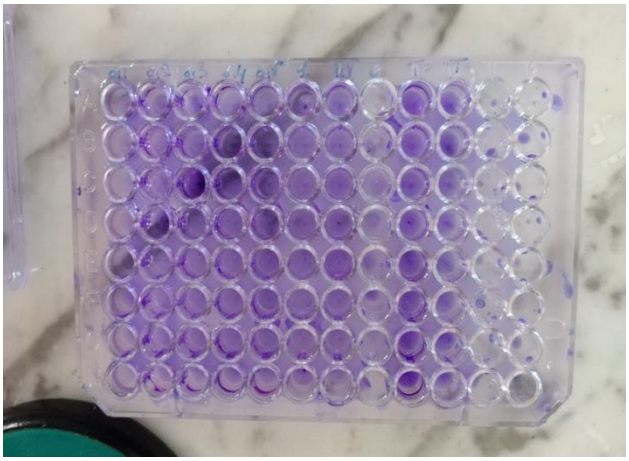
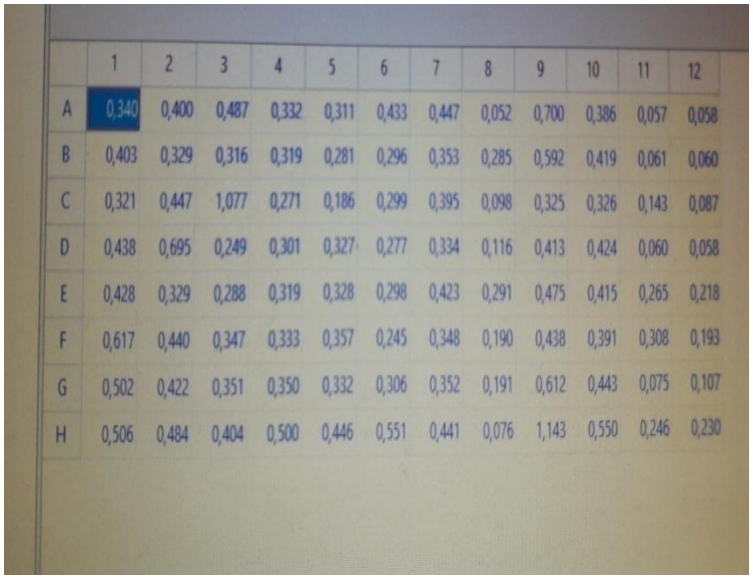


Figure 72 : Microplaqueaprès coloration avec cristal violet (*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,340	0,400	0,487	0,332	0,311	0,433	0,447	0,052	0,700	0,386	0,057	0,058
B	0,403	0,329	0,316	0,319	0,281	0,296	0,353	0,285	0,592	0,419	0,061	0,060
C	0,321	0,447	1,077	0,271	0,186	0,299	0,395	0,098	0,325	0,326	0,143	0,087
D	0,438	0,695	0,249	0,301	0,327	0,277	0,334	0,116	0,413	0,424	0,060	0,058
E	0,428	0,329	0,288	0,319	0,328	0,298	0,423	0,291	0,475	0,415	0,265	0,218
F	0,617	0,440	0,347	0,333	0,357	0,245	0,348	0,190	0,438	0,391	0,308	0,193
G	0,502	0,422	0,351	0,350	0,332	0,306	0,352	0,191	0,612	0,443	0,075	0,107
H	0,506	0,484	0,404	0,500	0,446	0,551	0,441	0,076	1,143	0,550	0,246	0,230

Figure 73 : La lecture de microplaque sous l'ELIZA après coloration avec cristal violet (*Streptococcus*) **(Photo personnelle).**