REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En : Biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Par :

MEKIOUI Amina

SAYEH KHeira

Thème :

Caractérisation phénotypique et évaluation de la formation de biofilm des souches *Porphyromonas sp. ,Prevotella sp . et Bacteroides sp*. chez des sujets atteints de parodontite

Mme. MOUZAOUI F.	**MAA**	**Université de Médéa**	**Président**
Mr. BOUBAKRI K.	**MAA**	**Université de Médéa**	**Examinateur**
Mr. BENADJI A.	**MAA**	**Université de Médéa**	**Examinateur**
Mme HOCEINI A.	**MAB**	**Université de Médea**	**Promotrice**

Année universitaire 2017/2018

Remerciements

Avant tout, je remercie **ALLAH** de m'avoir donnée la force et le courage nécessaire pour Réaliser ce travail.

Nous tenons ici à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce travail, car seuls nous n'aurions pu l'accomplir.
D'emblée, nous tenons à remercier vivement notre promotrice Mme HOCIENI Amina pour son entière disponibilité, ses conseils judicieux et la pertinence de ses corrections, ce qui nous a permis de mener à bien ce travail.

Nos plus sincères remerciements vont à Mme. Mouzaoui. Maitre de conférences de sciences biologiques, qui nous a fait l'honneur de présider le jury.

Nous adressons également notre profonde reconnaissance à Mr Boubkri et Mr Bendji , Maitres assistants chargés de cours à la faculté des sciences biologiques pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous la remercions également pour la qualité de ses enseignements tout le long de nos années d'études de la Licence jusqu'au Master II.

Nous remercions aussi Mr AMALOU qui nous a donner tous que j'ai besoin de matériels pour la confection du dispositif expérimental.

Notre reconnaissance la plus sincère va à Dr MISBAOUI Bilal qui a beaucoup donné de son temps, pour nous aider à trouver le prélèvement dentaire.
Nos derniers remerciements et pas des amis et camarades qui nous ont prêtés main forte lors de l'échantillonnage. Moindres, s'adressent

Dédicace

Je dédie ce travail ;

A mes très chers parents:

Pour m'avoir toujours soutenu et encourager pour leur présence de tous les instants, et pour m'avoir toujours entourer de leur amour, qu'ils trouvent à travers ce travail les fruits et la récompense de leurs efforts.

Qu'Allah vous protège

A mes très chers frères

Toufik ,Terek et Hocine et leurs petites filles Hanae et Lila.

A mes très chères sœurs

Dalila, Hafida , Fatima et Madiha leurs enfants

A mon très chère amie

Bilal, et à toute la famille MEKIOUI et BOUCHERF

A mes très chères cousines *Rima, Sara, et Ahlem,*

A mes enseignants *et particulièrement à Dr HOCIENI Amina pour sa gentillesse, sa sympathie, et son aide dans les moments difficiles de ce travail.*

A mon binôme *Khiera et a touts mes amis pour cette année passée dans la bonne humeur et toute la promotion de Microbiologie applique 2017/2018*

A tous mes collègues *de travail d'ECD fonds*

MEKIOUI Amina

Dédicace 2

Je dédie cette thèse

A mon père, merci d'avoir été toujours là pour moi, un grand soutien tout au long de mes études.

A ma mère, la lumière de ma vie

A mes chers soeurs et frères

A toute ma famille et mes amis (es) qui me sont chers.

Ainsi qu'à tous ceux qui ont participé de loin ou de prés à la réalisation de ce travail .

SAYEH kheira

Résume

La parodontite est une maladie infectieuse entrainant une inflammation des tissus de soutien des dents, une perte d'attache et une alvéolyse progressive, elle est caractérisée par la formation d'une poche parodontale. Cette maladie est induite par des bactéries anaérobies à Gram négatif telle que le complexe rouge et orange.

Cette étude a pour objectif la caractérisation phénotypique des souches *Prevottella* sp. ,*porphyromonas* sp. *et bacteroides* sp. qui font partie de la flore sous-gingivale et l'évaluation de l'aptitude de ces souches à la formation du biofilm. Un autreobjectif de cette étude était de comparer les données de questionnaires (les paramètres socio-démographiques et les pratiques d'hygiène orale)entre des adultes ayant des lésions parodontales et d'autres qui sont indemnes de parodontites.

L'étude des données de questionnaire concerne 15 sujets indemnes de parodontites et 20 présentant des lésions parodontales. Parmi ces participants, des échantillons des plaques sous-gingivales ont été recueillis à partir de 06 sujets sains et 09sujets ayant des lésions parodontales.L'identification est basée sur les caractères morphologiques, les caractères biochimiques et le test de sensibilité aux antibiotiques.

Onze souches bactériennes ont été isolées à partir des plaques sous-gingivales des sujets atteints des lésions parodontales.Ces isolats appartiennentà 03 genres *: Bacteroides* sp. *(28*%), *Prevottella* sp.*(36*%) *et porphyromonas* sp. *(36*%).

Les résultats de l'aptitude de formation de biofilm confirment l'effet de saccharose dans l'amélioration de la capacité de formation de biofilm des souches isolées ainsi que la fiabilité de la technique quantitative de microplaque de titration (PMT) par rapport à la méthode qualitative sur gélose Rouge Congo (RCA) dans l'étude du pouvoir de formation de biofilm.

Mots clés: parodontite, Bactéries anaérobies ,plaque sous gingivale, biofilm .

Abstract

Periodontitis is an infectious disease resulting in inflammation of the supporting tissues of the teeth, loss of attachment and progressive alveolysis, itischaracterized by the formation of a periodontal pocket. This disease isinduced by Gram-negative anaerobicbacteria such as the red and orange complex.

The objective of thisstu dyis the phenotypic characterization of the *Prevottella* sp., *Porphyromonas* sp.et *bacteroides* sp.qui fent strains as part of the subgingival flora and the evaluation of the ability of these strains to biofilm formation. Another objective of thisstudywas to compare questionnaire data (socio-demographic parameters and oral hygiene practices) between adult swith periodontal lesions and others who are free from periodontitis.

The study of the questionnaire data concerns 15 free from periodontitis and 20 with periodontal lesions. Amongthese participants, samples of the subgingival plaques were collectedfrom 06 healthy subjects and 09 subject swith periodontal lesions. The identification is based on morphological characters, biochemical characters and antibiotic susceptibility testing.

Bacterial strains were isolated from the subgingival plaques of subjects with periodontal lesions.These isolates belong to 03 genera: *Bacteroides* sp. (28%), *Prevottella* sp. (36%) and *porphyromonas* sp. (36%).

The results of the biofilm formation ability confirm the effect of sucrose in improving the biofilm formation capacity of the isolated strains as well as the reliability of the quantitative titration microplate (PMT) technique as compared to the method. red Congo agar (RCA) in the study of biofilm formation power.

Key words: periodontitis, subgingival plaque, anaerobicbacteria, biofilm,

ملخص

التهاب الأسنان هو مرض معد ينتج عنه التهاب في الأنسجة الداعمة للأسنان ، وفقدان الارتباط والانحلال التدريجي ، ويتميز بتكوين جيب اللثة.سبب هذا المرض هي البكتيريا اللاهوائية سالبة الجرام مثل المركب الأحمر والبرتقالي.

الهدف من هذه الدراسة هو التوصيف المظهر يلسلالات :

Porpyromonas sp. *Bacteroide* sp. *et Prevotella* sp.

كجزء من البنيات تحت اللثة وتقييم قدرة هذه السلالات لتشكيل بيوفيلم. كان الهدف الآخر لهذه الدراسة هو مقارنة بيانات الاستبيان (البارامترات الاجتماعية والديموغرافية وممارسات النظافة الفموية) بين البالغين الذين يعانون من آفات اللثة وغيرهم من المرضى الذين يعانون من التهاب اللثة.

وتتعلق دراسة بيانات الاستبيان بـ 15 حالة خالية من التهاب اللثة و 20 مع آفات دواعم السّن. من بين هؤلاء المشاركين ، تم جمع عينات من لويحات تحت اللثة من 06 شخصًا أصحاء و 09 شخصًا يعانون من آفات دواعم السن ، ويستند التعرف على الأحرف المورفولوجية والشخصيات البيوكيميائية واختبار الحساسية للمضادات الحيوية.

تم عزل 11 سلالة بكتيرية من اللويحات تحت اللثة للمصابين بأمراض اللثة. تنتمي هذه العزلات إلى أجناس 03 :

porphyromonas sp .*(36و* ٪ *Prevottella* sp. (36،) ٪ *Bacteroides* sp.(28%)

نتائج قدرة تكوين بيوفيلم تؤكد تأثير السكروز في تحسين قدرة تكوين الأغشية الحيوية للسلالات المعزولة وكذلك موثوقية تقنية الصفيحة الكمية المعيارية (PMT) مقارنة بالطريقة. الأحمر agar الكونغو (RCA) في دراسة قوة تشكيل بيوفيلم

الكلمات المفتاحية: التهاب اللثة ، اللوح تحت اللثة ،، البكتيريا اللاهوائية ، البيوفيلم ،

Liste des Abréviations

E.coli : *Escherichia coli*

EPS : exopolysaccharide

PAE : Pellicule Acquise Exogène

MEC : Matrice extra cellulaire

Pg : *Porphyromonas gingivalis.*

AAC : *Actinobacillus actinomecetemcomitans*.

Tf : *Tannerela forsythias*.

Td : *Treponema denticola*

Spp : Toutes les espèces ou plusieurs espèces du genre.

Ec *:* *Eikenella corrodens*

Cc : *Campylobacter concisus.*

Cg : *Capnocytophaga gingivalis*

Cr : *Capnocytophaga rectus*

***Cs* :** *Campylobacter showae.*

E*n :* *Eubacterium nodatum*

Pi : *Prevotella intermedia*

Pn : *Prevotella nigrescens*

Pm : *Prevotella melaninogenica*

Fn : *Fusobacterium nucleatum*

BHIB : Bouillon cœur cervelle (Brian Heart Infusion Broth)

Strep : Streptocoque

CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme-Société Française de Microbiologie

DO : Densité optique

UFC : Unité formant colonie

PAI : polysaccharide andésine intercellulaire

RCA : Rouge Congo agar

PMT : Microplaque de titration 96 puits

Liste des figures

Figure 01 : Coupe d'une dent ……. 3

Figure 02 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm……. 8

Figure03 : les complexes bactériens de Socransky et al.(1998)……9

Figure 04 : Biofilm supra et sous-gingival selon les complexes bactériens……..... 12

Figure 05 : Evaluation de la maladie parodontal…….. ...19

Figure 06 : comparaison entre dent sans problème parodontal et dent avec problème parodontal. …….. 19

Figure 07 : représente une photo de parodonte sain……. 20

Figure 08 : représente une parodontite ……..21

Figure 09 : prélèvement par cônes de papier stérile……..28

Figure 10 : Les eppendrof contenant le prélèvement bactérien ……. 28

Figure 11: préparation des dilutions (photo originale)……..29

Figure 12: sachet d'aluminium comporte le générateur GENbox ……...30

Figure 13: sachet d'aluminium comporte le générateur GENbag…… 31

Figure 14 : La photo de la gauche présente un Dessiccateur contenant les sachets générateursd'anaérobiose**…… ……31**

Figure15 : Teste catalase ……34

Figure 16 : Les Effiat de teste oxydase ……. 34

Figure17 : Formation de biofilm en microplaque ……..38

Figure18 : Culture sur la gélose Rouge Congo ……..39

Figure 20 : représente la répartition des deux populations selon tranche d'âge ……..40

Figure21 : représente la répartition des deux populations selon le sexe …….. ..41

Figure 22 : Les fréquences de brossage des dents pour les deux population …… 42

Figure 23 : Réparation de fréquence de saignement de gencive lors de brossage des dents chez les deux populations**. ……...…43**

Figure 24 : La répartition selon le fréquence de tabagisme et alcoolisme pour les deux populations……...44

Figure 25 : La répartition de fréquence de mauvaise haleine chez les deux populations……...45

Figure 26 : observation microscopique de coloration de gram (photo personnel..... 47

Figure 27 : Représente les colonies bactériennes après l'isolement chez les sujets présente un lésions parodontal……...48

Figure 28 : Représente les colonies bactériennes après l'isolement chez les sujets indemnes un lésions parodontal ……48

Figure 29 : Représente les colonies bactériennes après le repiquage chez les sujets maladie…….49

Figure 30 : fréquence d'isolement des bactéries chez les les deux populations…… 49

Figure 31 : Résultat de teste Catalase …….. 50

Figure 32: Résultats de test oxydase ……51

Figure33 :antibiogramme *de porhyromonas.sp*…….53.

Figure34 : antibiogramme de *bacteroides sp*……..……54

Figure 35 : antibiogramme de *prevotella.sp* par l'antibiogramme…….…...55

Figure 36 : Répartition des isolats en cas de parodontite……56

Figure 37 : la microplaque de titration et le lecteur de microplaque ……57

Figure 38 : Répartition des souches selon la production de biofilm sur le milieu BHIB non saccharosés 58

Figure 39 : Répartition des souches selon la production de biofilm sur le milieu BHIB saccharoses ……59.

Figure 40 : Résultats de formation de biofilm par la méthode de Rouge Congo……...60

Figure 41 : Répartition de la fréquence des souches selon le pouvoir de formation de biofilm par méthode de Rouge Congo **……..……61**

Liste des tableaux

Tableau 01 : bactéries de la flore présente dans la parodontite chronique…….14

Tableau 02 : bactéries de la flore présente dans les parodontites agressives……..15

Tableau 03 : composition de la flore sous-gingivale en fonction de l'état de santé parodontale…… .21

Tableau 04 : les résultats de la forme, la mobilité et Coloration de Gram de différents isolats……....47

Tableau 05 : Résultats des testes catalase et oxydase des isolats……...51

Tableau 06 : Représente l'ensemble des résultats de la sensibilité et la résistances des souches étudie par antibiogramme **…… ….52**

Tableau 07 : Résultats de la sensibilité de *porphromonas .sp* aux antibiotiques…… 53

Tableau 08 : Résultats sensibilité de *Bacteroides sp.* Aux antibiotiques……..54

Tableau 09 : Résultats de la sensibilité de *Prevotella sp.* Aux antibiotiques…….55

Tableau 10: Résultats de la production de slime par la méthode RCA…… 60

Tableau 11 : représente le pourcentage de formation de biofilm par PMT et RCA…..…62

Table des matières

Introduction …… 1 et 2

PARTI N01 : Synthèse bibliographique

I .Généralités sur la cavité buccale……. 3

I.1.Généralité……...…… 3

I.2.Anatomie des organes dentaires …… 3

I.2.1.L'odonte (les dents)…… … 3

I.2.1.1. Les tissus dentaires…… …… 4

I.2.2. Le parodonte …… 4

I.2.2.1. La gencive…… 4

I.2.2.2. Le desmodonte…… …….. 4

I.2.2.3. Le cément…… …… 5

I.2.2.4. L'os alvéolaire……..…… .5

II. Le pouvoir de formation de biofilm……5

II.1. Définition……..…… 5

II.2. Etapes de formation des biofilms…… 5

II.2.1. L'adhérence réversible…… 6

II.2.2. L'adhérence irréversible…… . 6

II.2.3 Le développement précoce du biofilm…… 6

II.2.4. La maturation du biofilm…… 6

II.2.5. Le détachement de bactéries…… 6

II.3. La composition du biofilm dentaire ……..…… 8

II.3.1. La matrice extra cellulaire…… 8

II.3.2. Les bactéries…… …… 9

II.4. La plaque dentaire…… …… 10

II.4.1. Composition de la plaque dentaire……10

II.4.2. La matrice de la plaque dentaire…… 10

II.4.3. Formation de la plaque dentaire…… 11

II.4.4. Plaque supra-gingivale et plaque sous-gingival …… 11

II.5. Classification du biofilm dentaire…… 11

II.5.1. Biofilm supra-gingival…… 11

II.5.2. Biofilm sous- gingival 12

III. Les maladies parodontales ……..…… 12

III.1. Définition…….…… … 12

III.2.Les différents types de parodontites…… 13

III.2.1. La parodontite chronique…… 13

III.2.2. La Parodontite agressive…… 14

III.3. Etiologies….…… 15

III.3.1.La présence de bactéries pathogènes…… 15

III.3.2.L'absence de bactéries protectrices …… … 16

III.3.3.Environnement dento-gingival adéquat…… 16

III.3.4.Défaillance acquise ou innée de l'hôte……...16

III.4. L'évaluation du risque parodontal……..…… 16

III.4.1. Facteurs liés au patient……. 17

III.4.1.1. Le contrôle de plaque…….. 17

III.4.1.2. L'âge…….. 17

III.4.1.3. Le tabac…….. 17

III.4.1.4. Le diabète…….17

III.4.2. Facteurs liés à la dent…… 18

III.4.2.1. Position de la dent au niveau de l'arcade……18

III.4.2.2. Restaurations iatrogènes…… 18

III.4.2.3. Altération de la réponse de l'hôte……18

III.4.2.4. Le risque génétique…….. 18

III.4.2.5. Le stress……..18

III.5. Relation entre état parodontal et flore sous gingivale…… 19

III.5.1. Composition de la flore des sites sains et des sites malades…….19

III.5.1.1.Parodonte sains…… 20

III.5.1.2.Parodontites…….. 20

III.6. La flore parodontopathogène……..…… 21

III.6.1. Les principales bactéries parodontopathogènes…….. 22

PartieN02 : Etude expérimentale

I. Matériels …… 23

I.1. Matériels de prélèvement de la plaque sous-gingivale …… 23

I.2. Milieu de culture …… 23

I.3.Matériels de culture anoxique …… 23

I.4. Disques d'antibiotiques..…… 23

I.5. Matériels d'étude du biofilm dentaire …….. 23

I.6.Les détergents de nettoyage et de stérilisation…… 23

I.7. Autres matériels…… 24

II. Méthode :

II.1. Lieu et période d'étude …… 25

II.2. Type d'étude…… 25

II.3. Objectifs de l'étude …….. 25

II.4. Population d'étude …...…… 25

II.4.1. Les critères d'inclusion…… 26

II.4.2. Les critères d'exclusion …… 26

II.5.Echantillonnage …… 26

II.5.1. Prélèvement de la flore sous gingival. …….26

II.5.2. Site de prélèvement ……..……. 26

II.5.3. Techniques de prélèvement ……. 27

II.5.4. Transport des prélèvements au laboratoire …… 28

II.6. Analyse des prélèvements …… 28

II.6.1. Préparation des dilutions …… 29

II.6.2. Ensemencement et incubation …… 29

II.6.3.Repiquage …….. 31

II.6.4. Deuxième repiquage (subculture) …… 32

II.7. Identification phénotypiques des isolats …..…… 32

II.7.1. Caractères microscopiques ……...……32

II.7.1.1. L'état frais …… 32

II.7.1.2. Coloration de Gram ……. 33

II.7.2. Caractères macroscopiques ……. 33

II.7.3. Caractères biochimiques …….. 33

II.7.3.1. Test de catalase ……33

II.7.3.2. Test de cytochrome- oxydase …… .34

II.7.4. Test de sensibilité aux antibiotiques …… 35

II.7.4.1. Principe …… 35

II.7.4.2. Technique …… 35

II.7.4.3. Lecture …… 35

II.8. Les méthodes d'étude de la formation de biofilm …… 36

II.8.1. Méthodes des microplaques de titration ……..... .. 36

II.8.1.1. Technique …… 37

II.8.1.2. Lecture …… 37

II.8.1.3. Calcul de la valeur seuil de $DO_{Minimal}$ et $DO_{Maximal}$… …….38

II.8.2. Méthode de Rouge Congo …….39

II.8.2.1. Technique……. 39

II.8.2.2. Lecture……..…...39

Parti N03 : Résultats et discussion…….. ……. 41

Conclusion…….64

Annexe

Introduction :

La cavité buccale est un écosystème dynamique et complexe à équilibre fragile. Elle abrite des micro-organismes divers qui constituent une entité structurale spécifique : le biofilm buccal**.(Chardin et** *al.* **,2006).**

Le biofilm microbien a un effet important sur la santé humaine, en effet, plus de 60% des infections rencontrées chez l'homme sont causées par des biofilms **(Li et Yu-mei, 2011).** Le biofilm le plus accessible se trouve dans la cavité buccale et il est appelé plaque dentaire **(Zijnge et** *al.***, 2012).**

La plaque dentaire est un biofilm qui se développe naturellement sur les dents et se compose d'environ 700 espèces bactériennes qui font partie de l'écosystème complexe de la cavité buccale **(Kolenbrander et** *al.,* **2006).**

Les interactions entre ces espèces bactériennes, dès les premières étapes de la colonisation jusqu'à la formation des sous-gingivales matures, sont les principaux agents étiologiques des maladies infectieuses de la bouche, comme la gingivite et la parodontite **(Kang et** *al.,* **2011).**

Les maladies parodontales sont des maladies multifactorielles, dont l'étiologie primaire est le biofilm microbien. Des conditions spécifiques liées aussi bien à l'environnement qu'à l'hôte déterminent la susceptibilité du sujet à développer une flore bactérienne pathogène, une infection et une réponse inflammatoire destructrice.
La poche parodontale, lésion élémentaire de la parodontite, constitue un environnement idéal pour la colonisation et la prolifération de certaines espèces bactériennes, en particulier des bactéries anaérobies.(**Löe H, 1965**)

De point de vue microbiologique, la flore commensale présente au niveau d'un parodonte sain est constituée principalement de bactéries Gram positif, non mobiles, aérobies ou relativement anaérobies. En présence d'une atteinte parodontale, la plaque sous gingivale est composée surtout de bactéries Gram négatif, anaérobies strictes avec une grande proportion de motiles. Ces bactéries possèdent des facteurs de virulence et sont capables d'entraîner une destruction tissulaire, (**Wiebe SH, 1996).**

De ce fait, et en tenant compte de toutes ces données on a choisis de mettre la lumière sur le profil bactériologique de parodontite dans la région de Médéa.

L'objectif de ce travail est d'isoler quelques souches anaérobies incriminées dans la maladie parodontale à savoir *Porphyromonas, Prévotella et Bactéroides* et d'étudier leur pouvoir de formation de biofilm .

Ce travail est constitué de quatre parties :

La première est une synthèse bibliographique qui rassemble des informations sur le biofilm buccale et sa physiologie. Nous décrirons comment celui-ci intervient dans la genèse de la maladie parodontale, avec ses signes et ses complications, qui ne sont en fait que les motifs de consultations de nos patients, par mettre en exergue les moyens nécessaires à l'élimination de ce facteur, considéré jusqu'à présent comme principal facteur étiologique.

La deuxième partie détaille les matériels et méthodes ; dont on a adopté la démarche expérimentale suivante :

- Prélèvements.
- Isolement et identification des souches cliniques.
- Evaluation de la formation de biofilm par deux méthodes : (RCA, PMT,).

La troisième partie consacrée aux résultats et à la discussion donne des résultats pertinents et clairement argumentés.

Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce traval

.

I. Généralité sur la cavité buccale

I.1.Généralité

La cavité buccale est l'entrée du tube digestif. Le tube digestif anatomiquement continu et abrite environ 1×10^{14} micro-organismes, ce qui est plus que les quelque 6×10^{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 utilisant des méthodes de biologie moléculaire récemment développées. Ces micro-organismes colonisent les surfaces orales où ils forment un consortium microbien appelé plaque dentaire ou biofilm oral. **(Takahashi , 2005)**

I.2 .Anatomie des organes dentaires

I.2.1 L'odonte :

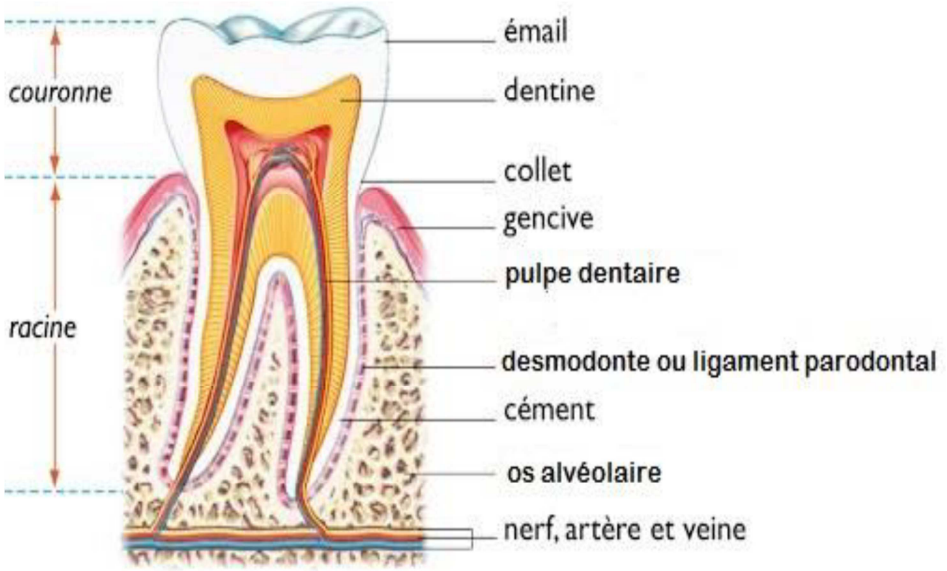


Figure 1 : *Coupe d'une de dent* **(Devals, Anne*, 2003).**

Les dents sont des structures vivantes et minéralisées, de couleur blanc ivoire. Grâce au parodonte, elles sont insérées dans l'os alvéolaire de la mâchoire, dessinant deux arcades dentaires en forme de fer à cheval. On peut les diviser en 3 parties : la racine et la couronne, séparées par le collet.**(Devals, , 2003 ; Danielle et *al.*, 2005) :**

- La **couronne** est la partie visible de la dent, qui dépasse de la gencive

- Le **collet** représente la limite entre la couronne et la racine

- La **racine**, non visible, est cachée par la gencive. Elle ancre la dent dans l'os alvéolaire **((Woelfel , Scheid , 2007)**

I.2.1.1. Les tissus dentaires

La dent est constituée de trois tissus minéralisés : l'émail, la dentine et le cément et d'un tissu conjonctif : la pulpe dentaire composée notamment de nerfs et de vaisseaux sanguins qui acheminent les éléments nourriciers vers la dent par l'intermédiaire de l'apex radiculaire (**((Cavézian et** *al*, **2006).**

I.2.2. Le parodonte :

L'ensemble des tissus qui entoure, enveloppe et soutient les dents s'appelle le parodonte : il est constitué de quatre tissus différents, minéralisés ou non : l'os alvéolaire, le desmodonte (ou ligament alvéolo dentaire), le cément et la gencive. Pourtant très différents anatomiquement et physiologiquement, ces tissus ont en commun le rôle de soutien des dents **(Albert, Olivier, 1994)**

I.2.2.1. La gencive

La gencive est la seule partie visible du parodonte. Elle correspond à l'ensemble des tissus épithéliaux et conjonctifs qui entourent les parties cervicales des dents et qui recouvrent l'os alvéolaire sous-jacent. La muqueuse gingivale, est une portion de la muqueuse orale kératinisée, de consistance plutôt ferme.

Des vaisseaux sanguins parcourent le tissu conjonctif et donnent à la gencive sa couleur rose pâle, corail chez les personnes de couleur claire ; chez les individus à la peau mate, elle sera plus foncée et parfois piquetée de brun **(Albert, Olivier, 1994).**

I.2.2.2 Le desmodonte

Le desmodonte, ou ligament alvéolodentaire ou parodontal, est un tissu conjonctif fibrocellulaire dense, non minéralisé et très vascularisé, qui s'étend entre l'alvéole osseuse et la racine dentaire. Il est composé de nombreuses fibres de collagène (et en moindres proportions oxytalanes, réticulées et élastiques) regroupées en faisceaux, et d'un compartiment cellulaire formé essentiellement de fibroblastes (synthétisant le collagène), cémentoblastes et ostéoblastes **(Mary , 2011 ; Margar et .Fehrenba , 2006 ; Lorimier.et Kemoun., 2012)**

I.2.2.3 Le cément

Le cément radiculaire recouvre la racine dentaire : « *il constitue l'interface entre la dentine et les tissus desmodontal et gingival* ». Il ancre les fibres de collagène du ligament sur la dent, pour l'unir à l'os alvéolaire : il constitue donc un élément du parodonte, alors qu'il fait anatomiquement partie de la dent. C'est un tissu conjonctif à peu près aussi dur que l'os, fortement minéralisé, avasculaire et non innervé **(Lorimier. , Kemoun. , 2012).**

I.2.2.4 L'os alvéolaire

C'est un tissu minéralisé, dur. Il protège et supporte les dents (temporaires et permanentes), dont les racines sont enchâssées dans les procès alvéolaires, qui délimitent les cavités alvéolaires et doivent leur développement à la présence des dents dont ils dépendent : en effet, ils se résorberont à la disparition des dents. Tout au long de la vie, l'os alvéolaire subit, comme les autres os, les mécanismes cycliques de remaniements osseux **(Lorimier., Kemoun,2012).**

II. Le pouvoir de formation de biofilm

II.1.Définition :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésive et protectrice qu'ils secrètent**. (Jain et** ***al.*** **,2011) C**'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique, libre et isolé dans l'environnement .Un **(Espinasse et** *al.* **, 2010)** Biofilm peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de microorganismes **(Behlou, et Gilmore, 2008).**

II.2.Etapes de formation des biofilms :

Les bactéries semblent initier la formation d'un biofilm en réponse à une pression environnementale **(Annous. et** *al* **., 2009).**telle que le manque d'oxygène et de nutriments ou la présence d'un traitement .**(Vu. et** *al* **., 2009)** Les biofilms peuvent se développer sur une grande variété de surfaces incluant les tissus vivants, les dispositifs médicaux, ou tout autre support retrouvé dans le sol ou dans les milieux aquatiques. On distingue généralement cinq étapes de formation de biofilm **(Talaro et** *al.***, 2008) .**

II.2.1. L'adhérence réversible :

En milieu liquide ou exposé à l'humidité, les bactéries planctoniques s'approchent d'une surface solide**)** par mouvement brownien, par sédimentation ou par mobilité active (présence de flagelles**) (Høiby, et** *al* **., 2011).** Elles s'y attachent de manière réversible des interactions non spécifiques, électrostatiques et élerodynamiques. Cette étape est influencée par des conditions environnementales impliquant le pH, l'os molarité, la température, la concentration en oxygène et en nutriments et l'hydrodynamique de fluide .L'adhérence des bactéries est également influencée par la nature de la surface, notamment sa rugosité et son hydrophobicité. Les bactéries adhèrent facilement sur une surface rugueuse, hydrophobe et non polaire **(Beloin, et** *al* **., 2005) .**

II.2.2. L'adhérence irréversible :

La fixation à la surface solide devient irréversible en raison de la production d'exo polysaccharide par les bactéries et surtout grâce à des structures d'adhérence variables selon les espèces bactériennes, par exemple les fimbriae et les curli pour *E.coli*, qui interagissent avec des récepteurs spécifiques présents sur la surface **(Beloin, et** *al* **., 2005) .**

II.2.3. Le développement précoce du biofilm :

Les bactéries se multiplient lentement et continuent de produire des exopolysaccharides.Elles s'agrègent entre elles et forment des micro colonies, qui sont protégées par la matrice ex polysaccharidique **(Jacobsen, et** *al* **., 2008) .**

II.2.4. La maturation du biofilm :

L'architecture complexe du biofilm se met en place avec la formation de canaux aqueux et de pores entre les micro colonies permettant l'acheminement d'oxygène et de nutriments nécessaires à la croissance de micro-organismes **(Folkesson. et** *al* **, 2008),** ainsi que l'élimination des déchets (**Tenke et** *al* **, 2006)**. La production et la sécrétion d'enzymes ou de toxines provoque la dégradation des résidus présentent dans les surfaces environnantes et permet ainsi la libération de nutriments **(Jacobsen, SM et** *al* **, 2008).**

II.2.5. Le détachement de bactéries :

Pour que la densité bactérienne sur une surface peut atteindre 10^7 Un biofilm est approximativement constitué de 85% de matrice extracellulaire et de 15% de

microorganismes (**Behlou, et Gilmore, 2008)**. La matrice extracellulaire est principalement constituée d'eau (97%) et incluse également des polymères d'exo-polysaccharides, de protéines, des phospholipides, des nutriments et des métabolites. Cette matrice à un rôle protecteur et un rôle structurel **(Beloin, et** *al* **, 2005).**

Les bactéries acquièrent un mode de croissance, une physiologie et un métabolisme différent des bactéries planctoniques. Ces changements phénotypiques résultent d'une révolution du profil d'expression de leurs gènes. Toutes ces transformations sont coordonnées grâce à un système de communication entre les bactéries d'une même espèce au sein du biofilm, appelé quorum sensing **(Behlou, et** *al* **, 2008)**. Ce système est fondé sur la production de molécules diffusibles par les bactéries, par exemples les acyl-homoserinelactones chez les bactéries à Gram négatif, qui donnent une indication de la densité cellulaire dans un environnement donné **(Filloux, et Vallet , 2003**).

Les biofilms matures possèdent une structure tridimensionnelle avec plusieurs microenvironnements différents qui évoluent selon l'os molarité, le pH et la densité cellulaire Du fait de cette hétérogénéité, l'état métabolique d'une bactérie diffère selon sa localisation il existe une variété de phénotypes bactériens au sein de biofilm. Les contacts rapprochés entre les micro-organismes favorisent le transfert horizontal de matériel génétique. Ce phénomène pourrait notamment facilité la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques **(Trautner, et Darouiche , 2004).** Cellules/cm^2, des bactéries se détachent du biofilm et se dispersent dans le milieu environnant après un retour à l'état planctonique. Traditionnellement, le détachement de bactéries est considéré comme un phénomène passif, dépendant notamment des forces du flux du milieu dans lequel le biofilm se trouve. Cependant, le détachement de bactéries peut aussi être une stratégie active, initiée par les bactéries elles mêmes, leur permettant de coloniser de nouvelles surfaces et de survivre lorsque l'espace et les nutriments deviennent limités. Les bactéries peuvent se détacher seules ou par petits ou gros amas selon les mécanismes impliqués. Comme pour les autres étapes, le détachement de bactéries est un processus complexe qui implique des signaux environnementaux et une communication entre les bactéries Ainsi un biofilm établi constitue un réservoir de bactéries viables, capables d'aller coloniser d'autres surfaces **(Joshi, et** *al* **, 2010).**

.

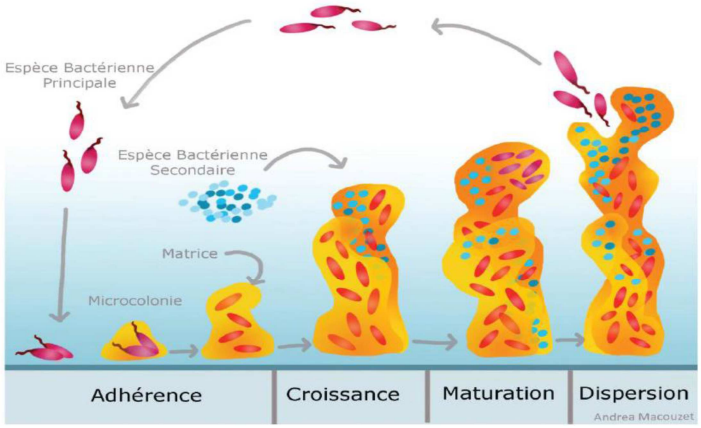


Figure 02 : Schéma présentant les étapes du développement du biofilm **(Yannick et *al* , 2014)**

II.3. La composition du biofilm dentaire

Le biofilm est constituée d'une matrice extra cellulaire et des bactéries.

II.3.1. La matrice extra cellulaire :

L'adhésion des bactéries colonisatrices primaires à la PAE déclenche des modifications Phénotypiques de ces micro-organismes aboutissant à la synthèse de MEC. Cette PAE est une mince couche organique, homogène tenace qui se forme sur les surfaces exposées dons la cavité buccale. Elle est acellulaire, c'est –à-dire dépourvue de micro-organisme (ni bactéries ,ni autre cellules) ;jusqu'au moment ou les bactéries commencent à s'y accumuler .La PAE favorise la colonisation bactérienne. Progressivement, des colonies se développent et s'organisent en élaborant la matrice intercellulaire .Ainsi, le volume et l'épaisseur de la plaque dentaire augmentent, on appelle se processus la phase de maturation. La substance inter-bactérienne est composée de glycoprotéines salivaires, de bactéries lysée set de la MEC bactérienne. La MEC est composée de 25% de phase aqueuse mais aussi de saccharides (dextranes, levanes, autres polysaccharides, glycogène, amyloectine), de sucres simples, lipides, protéines, oligo-éléments, ions calcium et phosphates. Les hydrates de carbone (polysaccharides, fructanes (ou levanes) et glycanes (ou dextranes) représentent 20%du poids sec de biofilm. Ils servent de source énergétique pour les bactéries ou jouent le rôle de charpente de la matrice et de la structure du biofilm.La MEC est synthétisée à partir des sucres de l'alimentation, sous l'action d'enzymes bactériennes, telles que la glycosyltransférase ou encore la fructosyltransférase. **(Berger, 2010).**

II.3.2. Les bactéries :

Plus d'une douzaine d'entre elles sont aujourd'hui classées comme pathogènes pour le parodonte .Parmi celles-ci, on compte surtout les bactéries Gram négatives, notamment Pg, AAC, Tf, Td.

Certaines de ces bactéries possèdent des propriétés biochimiques importantes pour la pathogénèse des maladies parodontales .Elles sont capables de Co-agrégation, c'est-à-dire qu'elles forment avec une ou plusieurs espèces de bactéries des agrégats hétérogènes dénommés complexes ou clusters **(Socransky et *al*.1998-1999**).Un équilibre écologique stable S'établit au fur et à mesure dans ces complexes et parmi les bactéries impliquées on différencie les complexes très pathogènes et les complexes peu pathogènes.

• **Actinobacillusactinomycetemcomitans sérotype b** qui forme un complexe à lui seul, n'ayant pas pu être rapproché des autres bactéries.

• **le complexe jaune :** formé de Streptococcus spp.

• **le complexe vert :** Capnocytophagaspp., AAC sérotype a, Ec et Cc.

• **le complexe violet :** Veillonella parvula et Actinomycesodontolyticus.

• **le complexe orange :** Cg, Cr, Cs, En, Pi, Pn, Pm, et les sous-espèces de Fn.

• **le complexe rouge :** Pg, Tf et Td.

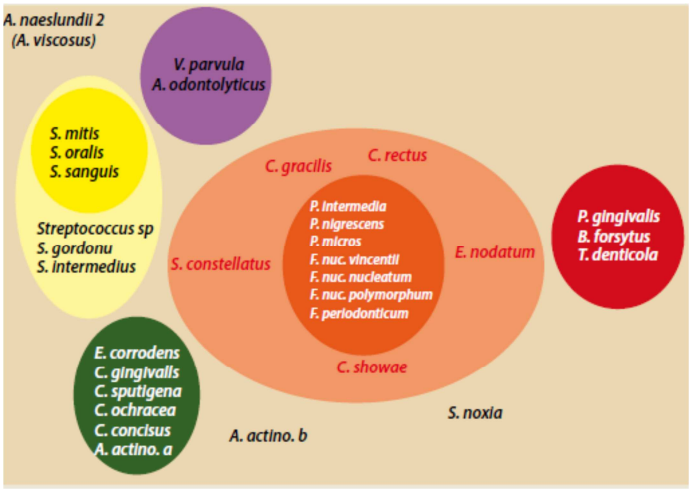


Figure 03 : les complexes bactériens de **Socransky et *al.* (1998)**

L'existence de ces complexes repose sur le fait que les bactéries qui les composent sont plus souvent retrouvées ensemble qu'avec celles des autres complexes. Certaines bactéries pourraient sécréter des facteurs de croissance pour les autres. De plus, des associations inter complexes existent, le complexe orange étant fortement lié au complexe rouge, et les

complexes jaune et vert étant eux aussi en relation. (**Herbert et** *al.* **2004 ; Dufour et Svoboda , 2010).**

II.4. La plaque dentaire :

Les accumulations bactériennes retrouvées dans la cavité buccale se présentent sous forme de biofilms avec des aspects différents selon leur endroit, mais aussi leur composition et leurs activités métaboliques. Le terme générique de la plaque dentaire est utilisé pour regrouper ces biofilms.

II.4.1. Composition de la plaque dentaire

La plaque dentaire se compose de micro-organismes et d'une matrice inter bactérienne. Elle contient environ 20% de solides organiques et inorganiques et 80% de matière solide . La plaque dentaire compte plusieurs espèces bactériennes qui se distinguent par :

- ❖ Leur paroi gram+ ou gram- : la coloration est basée sur la plus grande perméabilité de la paroi des gram à l'alcool.
- ❖ Leur métabolisme :

- Aérobie stricte : micro-organisme qui peut vivre et se développer en présence d'oxygène .
- Anaérobie stricte : micro-organisme qui se développe seulement en l'absence d'oxygène .
- Anaérobie facultatif : peut croitre dans un milieu pourvu ou non d'oxygène, cela concerne la majorité des bactéries.

- ❖ Leur forme

- Sphérique : coques, exemple : Streptocoques
- Cylindriques : bâtonnet ou filament, exemples : Lactobacilles ou Actinomycètes
- Incurvée/ spiralée : vibrions ou spirochète, exemple : *Treponema denticola* **(Dufour, et** *al* **. ,1992).**

II.4.2. La matrice de la plaque dentaire

On appelle matrice intercellulaire la substance inter bactérienne élaborée par les bactéries elles-mêmes, appelée glycocalyx et enrichie par différents composants provenant de la salive, du fluide gingivale ou des aliments mais aussi du système de stockage extracellulaire des bactéries constitué essentiellement d'hydrates de carbone. Le glycocalyx va apporter un

caractère hydrophile à la plaque lui assurant une protection contre le dessèchement des d'espèces spécifiques qui pour certaines deviendront pathogènes.

II.4.3.Formation de la plaque dentaire

Le biofilm est un dépôt mou , adhérent, de couleur blanc-jaunatre à la surface des dents et des matériaux de restauration dentaire . Celui-ci se forme en quelques heures et ne peut etre éliminé par un simple jet d'eau sous pression . Cet élément va permettre de différencier la vraie plaque dentaire de la *materiae alba* constituée de dépots alimentaires, de leucocytes désagrégés, de cellules épithéliales desquamées et de micro-organismes. Par contre,on ne la retrouve pas au niveau des surfaces concernées par la friction au cours de la mastication (cuspides). Ce biofilm peut être éliminé par brossage mais se reconstituera sur la pellicule acquise exogène (PAE**). (Imamurat, 2003).**

II.4.4. Plaque supra-gingivale et plaque sous-gingivale

Il est essentiel de distinguer la plaque supra-gingivale de la plaque sous-gingivale,car le milieu ou elles se constituent à des caractéristique différentes.

-plaque supra-gingivale : De couleur blanc-jam âtre elle est située en milieu ouvert (adhére à la surface dentaire).C'est la première à se former et elle est composée de bactéries aérobies gram + cariogènes : *Streptococcus mutans,StreptococcusSalivarius et SreptococcusSanguinis.* L'auto-nettoyage par salive est primordiale et la concentration en oxygène est élevée .Cette zone est exposée aux mécanismes d'attrition propres à la cavité buccale (mastication ,déglutition, phonation,)et est directement accessible au brossage.

- plaque sous-gingivale : située en milieu fermé (sillon gingivale et poche parodontale),elle est baignée par le fluide gingivale presque exclusivement anaérobie. Elle est moins adhérente et moins dense que la plaque supra-gingivale.L'auto-nettoyage par la salive est nettement diminué et la concentration en oxygène est faible .On y retrouve une flore de type parodonto-pathogène dotée d'un métabolisme anaérobie **. (Imamurat, 2003).**

II.6. Classification du biofilm dentaire

II.6.1. Biofilm supra-gingival :

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.

II.6.2. Biofilm sous-gingival :

Il constitue la continuité apicale du biofilm supra gingival, il est à l'origine des maladies parodontales. Une colonisation initiale par des bactéries des complexes jaune, vert et pourpre en même temps que les actinomyces modifient l'environnement dans le biofilm, permettent aux bactéries du complexe orange d'abord, puis enfin à celle du complexe rouge de se développer et de devenir majoritaires dans les biofilms sous-gingivaux. **(Bercey et Tenembaum ,1996 ; Ouhayoun, , 2012)**

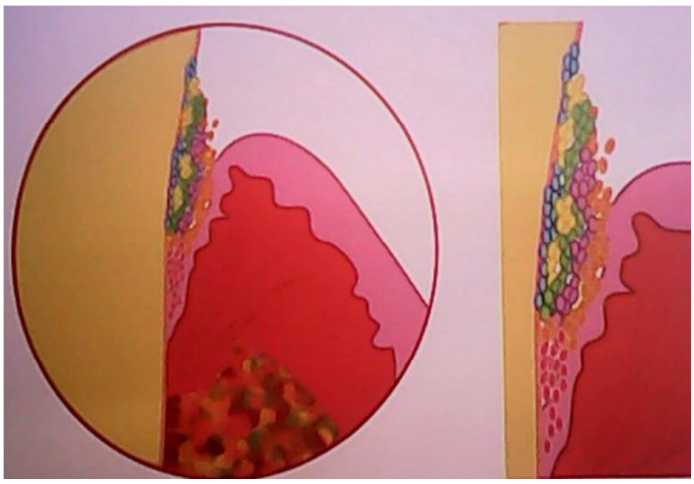


Figure 04: Biofilm supra et sous-gingival selon les complexes bactériens.(**Bercey et Tenembaum ,1996).**

III. Les maladies parodontales

III.1. Définition

La maladie parodontale est une infection poly microbienne et multifactorielle initiée par la présence de bactéries dans le sulcus gingival. Ces dernières génèrent une Inflammation tissulaire qui peut entraîner une destruction du ligament alvéolaire, de l'os sous-jacent et du cément allant jusqu'à la perte de la dent. La composante inflammatoire résulte de l'agression microbienne modulée par la réponse immunitaire de l'hôte (**Taba et *al* . ,2012 ; Gomez et *al*. ,2009)**. On distingue deux grandes familles d'affections parodontales:

- **Les gingivites**

Les gingivites provoquées par la plaque bactérienne représentent l'atteinte gingivale la Plus fréquente. Elle peut survenir à tout âge avec une prévalence pouvant Atteindre 50 à 100% dans la population adulte **(Expertise et Inserm, 1999 ; Struillou x, 2002).** cette atteinte gingivale est réversible, le contrôle de la plaque permet un retour à la Normale. Elle n'atteint que le parodonte superficiel.**(Expertise et Inserm,1999).**

- **Les parodontites**

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. **(Ciancie , 2003 ; Meurman et** *al* **., 2006) .** La plupart des microorganismes intervenant dans ces pathologies sont des bacilles à Gram négatif, anaérobies stricts *(Porphyromonasgingivalis, Prevotellaintermedia, Tanarella forsythia, Fusobacteriumnucleatum, Campylobacter rectus, Treponemadenticola)* **(Sixou M et** *al* **., 1994).**

III.2. Les différents types de parodontites :

III.2.1.la parodontite chronique :

La parodontite chronique est la forme la plus commune des maladies parodontales .Sa prévalence est plus élevé chez l'adulte mais elle peut aussi survenir chez l'enfant . la destruction des tissus de soutien est reliée à la présence de facteurs locaux .elle est associée à un schéma bactériologique versatile. Nous retrouvons fréquemment du tartre sous-gingivale .Son taux de progression est lent à modéré avec de possibles périodes de rapide progression. Cette augmentation du de taux progression peut être en relation avec la modification ou l'apparition de facteurs locaux, systémique ou environnementaux qui agiront sur la réponse de l'hôte. les facteurs locaux peuvent influencer l'accumulation des plaques alors que les facteurs systémiques (diabète, VIH et les conditions hormonales) influenceront les décences de l'hôte .les facteurs environnementaux tels la cigarette ou le stress influenceront à la fois la réponse de l'hôte et l'accumulation de la plaque. La perte d'attache et l'alvéolés sont progressives, leur classification se fait en fonction de l'étendue et de la sévérité de l'atteinte. Elles peuvent donc être :

***Localisées :** moins de 30% de sites atteints

***Généralisées** :plus de 30% de sites atteints **.(Flemming ,1999).**

TABLEAU 01: bactéries de la flore présente dans la parodontite chronique (Afssaps, 2001).

Bactéries	Fréquence d'isolement des bactéries
Actinobacillusactinomycetemcomitans	+
Campylobacter rectus	+
Eikenellacorrodens	+
Fusobacteriumnucleatum	+
Micromonas micros	+
Porphyromonasgingivalis	+
Prevotellaintermedia	+
Prevotellamelaninogénica	+

+,++ ou +++ fréquence d'isolement des bactérie

III.2.2.La Parodontite agressive :

La parodontite agressive est une maladie infectieuse entrainant une inflammation des tissus de soutien des dents, une perte d'attache et une alvéolyse rapide . elle est caractérisée par la formation d'une poche parodontale et / ou d'une récession gingivale. Il existe habituellement une incidence familiale. La dénomination, « « parodontite agressive » »,a été choisie car elle moins restrictive que la précédente ,, la parodontite à début précoce, qui été trop dépendante de l'âge du patient. Toute fois la nouvelle désignation « « parodontite agressive localisée » » recoupe ; en général, le schéma clinique des anciennes, parodontites, juvéniles localisées, La parodontite agressive représente une entité spécifique, clairement différente de la parodontite chronique .La perte d'attachement et l'avéolyse sont rapide ; leur classification se fait en fonction de l'étendue de l'atteinte ainsi que la sévérité. Elles peuvent donc être :

***Localisées :** moins de 30% des sites sont atteints.

***Généralisées :** plus de 30% de sites atteints**. (Tonetti, et Mombelli ,1999).**

Tableau 02 : bactéries de la flore présente dans les parodontites agressives (Afssaps, 2001).

Bactéries	Fréquence d'isolement des bactéries
Aggregatibacteractinomycetemcomitans	++
Bacteroidesforsythus	+
Campylobacterrectus	+
Eikenellacorodens	+
Porphyromonasgingivalis	+++
Prevotellaintermedia	+
Spirochètes (Treponemasp.)	+

+,++ ou +++ fréquence d'isolment des bactéries

III.3.Etiologies :

Définies comme étant d'origine infectieuse auparavant, l'aboutissement à la destruction parodontale avec ou sans poches requiert la réunion en même temps d'un certain nombre de conditions inspirées du modèle de Sokransky qui sont nécessaires, mais non suffisante sen elles-mêmes afin d'engendrer des dommages tissulaires. Quatre d'entre elles sont décrites dans la littérature.

III.3.1. La présence de bactéries pathogènes :

La flore buccale de l'hôte abrite de nombreuses espèces bactériennes, certaines font partie de la flore commensale compatible avec la santé parodontale du milieu buccal, et peuvent par moment devenir virulentes par l'augmentation de leur nombre ou influencées par d'autres espèces. Alors que d'autres, sont considérées d'emblée responsables de la perte d'attache dans

certaines parodontites par leur capacité d'envahir les tissus parodontaux profonds.

III.3.2. L'absence de bactéries protectrices :

Cette flore porte le nom de pro biotique car les bactéries vivent en symbiose dans l'écosystème buccal, leur présence en proportion suffisante est indispensable dans la maintenance de la santé parodontale. Elles sont considérées comme antagonistes aux bactéries saccharo lytiques dont certaines espèces de *Streptocoques* qui s'opposent aux *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus Actinomycetemcomitans et les Spirochètes* au sein du biofilm bactérien.

III.3.3.Environnement dento-gingival adéquat :

La différence de profil entre les bactéries aérobies et anaérobies, sous-entend qu'elles nécessitent deux milieux spécifiques et adéquats compatibles avec leur croissance et multiplication. Les variations de certains facteurs physiques comme le potentiel d'oxydo – réduction (paramètre critique déterminant), la pression osmotique et la température conditionnent fortiori leurs habitats. Par conséquent, l'accumulation de tartre et le saignement issu de l'inflammation est en faveur de la croissance des souches virulentes, en fournissant trois facteurs primordiaux source de nutrition (ions de fer constituants l'hémoglobine), chaleur et anaérobiose. Facteurs de risque de maladies carieuses et parodontales.

III.3.4. Défaillance acquise ou innée de l'hôte :

Les polymorphonucleaires et les monocytes constituent les moyens de défenses de l'hôte Contre l'infection. Si leurs nombres ou fonctions sont altérés au décours de certaines maladies générales telle que : la neutropénie, les agranulocytoses, les aplasies médullaires; l'envahissement des tissus parodontaux profonds est facilité par les agents agresseurs. De même, un dysfonctionnement des monocytes peut être constaté par une surproduction d'interleukines (IL-1$_\beta$) génétiquement chez certains individus, ou peut être acquis par la surconsommation de tabac **(Charon et *al* . , 2010).**

III.4. L'évaluation du risque parodontal :

La susceptibilité des individus à développer une maladie parodontale est très variable.

Selon l'académie américaine de parodontologie, l'évaluation du risque permet d'estimer la probabilité de survenue d'évènements indésirables par des évaluations qualitatives et quantitatives suite à des expositions à des facteurs dangereux pour la santé ou de l'absence

D'influences génétiques. Le risque en parodontologie ne peut s'apprécier qu'à travers qu'un seul paramètre, mais la combinaison de plusieurs ; ceci permet l'identification précoce des personnes concernées et la mise en œuvre des moyens de prévention.

III.4.1. Facteurs liés au patient :

III.4.1.1.Le contrôle de plaque :

L'évaluation du risque d'accumulation de la plaque bactérienne est très significatif car son rôle dans l'étiopathogénie n'est plus à démontrer.

Par ailleurs, le brossage biquotidien participe à la réduction de la charge microbienne, et par conséquent le maintien de la santé parodontale **(Bouchard , 2015).**

III.4.1.2. L'âge :

Il semblerait qu'il existe une corrélation étroite entre le vieillissement et la prévalence des maladies parodontales, que les personnes âgées sont prédisposées aux parodontites ; car la majorité atteintes de pathologies, sont sous traitements. Certains médicaments sont responsables de la réduction du flux salivaire. De plus l'hygiène est négligée, et participe à l'apparition de la maladie parodontale. **(Mattout et Mattout , 2003)**

III.4.1.3. Le Tabac :

Aujourd'hui, la consommation du tabac est admise par de nombreux auteurs comme un facteur de risque de survenue et de progression de la maladie parodontale. Le risque est de 2,5 à 6 fois plus fréquent chez les fumeurs. On constate une perte clinique plus importante de l'attache épithéliale, de lyses osseuses, et un risque accrue de récessions gingivales chez les fumeurs, mais il est tout à fait sournois car les manifestations cliniques sont moins marquées que chez les non-fumeurs ; une réponse inflammatoire réduite, une hypersialie et un fluide gingival moins important lié à l'interaction avec la nicotine qui stimule la libération d'adrénaline.

III.4.1.4.diabète :

Les sujets diabétiques ont une plus grande prévalence de la maladie parodontale, le mécanisme d'action de cette maladie chronique s'explique par trois théories : vasculaire, immunologique et colla génique. Le maintien de la santé parodontale est axé sur un équilibre glycémique adéquat **(Bouchard , 2015)**

III.4.2.Facteurs liés à la dent :

III.4.2.1.Position de la dent au niveau de l'arcade :

Toute malposition, malocclusion, ou encombrement dentaire influence l'hygiène, en conséquence la maturation de la plaque bactérienne, source de perte d'attache et de lyse osseuse **(Bouchard , 2015)**

III.4.2.2. Restaurations iatrogènes :

Les reproductions de l'aspect anatomique des dents, le respect des limites cervicales, ainsi que l'espace biologique, par les obturations et les restaurations prothétiques ; sont les conditions clefs du maintien de l'intégrité de l'organe dentaire et son parodonte.

III.4.2.3.Altération de la réponse de l'hôte :

La réponse de l'hôte est déterminante dans la gérance des infections microbiennes par l'intervention de l'immunité non spécifique et spécifique. Donc la dégradation de l'état général par certaines maladies comme : les leucémies, l'agranulocytose, la thrombocytopénie, les troubles leucocytaires, entraine une déficience de l'immunité favorisant la destruction parodontale **(Pierrard ,2015).**

III.4.2.4. Le risque génétique :

Le polymorphisme génétique est responsable de la diversité de réponse de chaque individu.
Le phénotype hyper inflammatoire est une particularité bien répandue.

III.4.2.5. Le stress :

Le stress est la réponse psychosomatique d'un organisme devant la perception d'un défi ou d'une menace. Le stress agit sur le parodonte soit par voie systémique soit par voie locale, en altérant ses défenses immunitaires, et en développant des para fonctions compensatoires causant des préjudices directs sur le parodonte, c'est-à-dire que l'adaptation individuelle au stress est plus impliquée dans la genèse de la pathologie **(Pierrard , 2015).**



Figure 5 : Evaluation de la maladie parodontal.

III.5. Relation entre état parodontal et flore sous gingivale :

III.5.1. Composition de la flore des sites sains et des sites malades :

Depuis plus d'un siècle, toutes la génération de biologistes sont arrivées à la conclusion suivantes : la composition de la flore sous gingivale des sujets présentes un parodonte sain diffère de selle des sujets présentant une parodontopathie. En générale la quantité des bactéries est plus importante chez les avec parodontite que chez les sujets exempts de maladie. Les plus grandes différences se situent au niveau des espèces des complexes rouge et orange ; en effet le nombre de bactéries appartenant à ces deux complexes est significativement plus élevé chez les individus avec parodontite**. (Socransky et Haffajee, 2000-2005).**



Figure 06 : comparaison entre dent sans problème parodontal et dent avec problème parodontal.

III.5.1.1. PARODONTE SAINS :

La sante parodontal peut être définie comme un état stable dans le temps de chaque des quatre tissus parodontaux suivants : gencive os alvéolaire, cément, ligament parodontal .on trouve dans les sites sains ou assainis des germes provenant du milieu buccal et de la plaque dentaire. La composition de la flore microbienne associée à la sante parodontal varie cependant en fonction de l'âge et des antécédents de maladie parodontale :

*chez les sujets jeunes, la charge bactérienne relativement faible, la flore principalement composée de gram positif , streptocoque ,actinomyces et seulement environ 15% de gram négatifs

*chez les sujets âgés sans antécédents de maladie parodontale autre que la gingivite, on constate que le pourcentage de gram – peut monter jusqu'à 45% : on retrouve *Fusobacteriummucleatum, Porphyromonasgingivalis Prevotellaintermedia,*.

*chez les patients présentant des antécédents de maladie parodontale, on trouve au niveau des sites assainis une flore bactérienne semblable, avec 15% de gram négatif. LA probabilité de présenter au niveau de site sains des bactéries gram négatif augmente avec l'âge et les antécédents de maladie parodontale, il est probable que la présence de ce bactéries pathogènes majore le risque d'apparition ou de résurgence de la maladie **(Darveau et *al* ., 2000-1997)**



Figure 7: représente une photo de parodonte sain.

III.5.1.2. Parodontite :

La flore de la poche parodontale est beaucoup plus dense que celle de la gingivite .elle varie en fonction de la localisation :

*la plaque supra-gingivale est comparable à celle la gingivite

*la plaque sous gingivale est composée surtout par des bactéries anaérobies à gram négatif. La composition de la poche parodontale est donc constituée essentiellement d'anaérobie ,de bactérie à gram – et de spirochètes .Pour la plupart ,oxygène est toxique et elle ne requièrent pas de carbonates . Beaucoup d'espèces vivent grace aux protéines de fluide gingivale ,d'autregrace aux produits dérivés du métabolisme d'autres espèces (association bactérienne spécifique**). (Darveau et** *al.* **, 2000-1997).**



Figure 8: représente une parodontite

Tableau 03 : composition de la flore sous-gingivale en fonction de l'état de santé parodontale Darveau et *al* ., **2000-1997**

	Etat sain	**Parodontite**
Bacrérie aérobies ou facultatives	75%	10%
Bactéries anaérobies	25%	90%
Bactéries gram positifs	85%	25%
Bactéries gram négatifs	15%	75%

III.6.La flore parodontopathogènes :

Les maladies parodontales sont d'origine bactérienne à composante inflammatoire, sont dites aussi infections mixtes, complexes faisant intervenir plusieurs types d'espèces microbiennes parodontopathogènes**. (Pierrard et** *al* **. , 2015)** Ces micro-organismes font partie de la flore commensale de la cavité orale de l'hôte. Tout changement qualitatif ou quantitatif peut influencer l'équilibre de cet écosystème buccal, et aboutit à l'apparition de maladies localement. Le macrobiote de la poche parodontale, a fait l'œuvre de plusieurs études depuis les années1950 **(Costalonga et Herzberg , 2008) .**Néanmoins, les techniques d'acquisition d'information génétique par la méthode de séquençage jadis ont permis aux enquêteurs de définir les espèces bactériennes responsables de l'initiation et la progression de la maladie. En 1998, Sigmund Sokransky a regroupé ces bactéries en complexes qui sont associés à une couleur en fonction de leur degré de virulence, les plus pertinents font partie du complexe rouge qui contient *Porphyromonas gingivalis*dont la multiplication peut altérer le fondement des éléments nutritifs des niches bactériennes et rompre l'équilibre et les règles de la symbiose**.(Kudva et** *al* **., 2010)**

III.6.1. Les principales bactéries parodontopathogènes ***:***

D'après **Verner (2007),** « l'identification des différents parodontaux donne les résultats suivant :

****Porphyromonas gingivalis :***

Bacille de petites taille, gram négatif , anaérobie strict, non sporulé et immobile , colonie de 1-3mm, ronde, crémeuse, bords irréguliers , lisses, hydrophobes, hémolytiques et *marron ,Catalase négatif, oxydase négatif* .

****Prevotella intermedia :***

Bacille gram négatif, anaérobie strict, non sporulé et mobile,colonie de 1-4mm, lisse, bombé bords irréguliers, hydrophobes, non hémolytiques, beige foncé ,opaques

****Bacteroides***

Ce sont des bacilles, Gram-, catalase+, oxydase-, immobile, anaérobies.

Il existe d'autres bactéries qui interviennent dans le parodontopathogènes : *Aggrégatibacter Actinomycemtemcomitans ,Capnocytophaga ,Eikenellacorrodens, Fusobacteriumnucleatum , Tannerella forsyth.*

Dans ce deuxième chapitre, nous décrivons les méthodes utilisées ainsi que le matériel ayant servi dans l'élaboration, la réalisation et l'aboutissement de notre étude.

1. Lieu et période d'étude

Ce travail a été réalisé durant la période allant d'avril à mai 2018 au niveau du laboratoire de la faculté des sciences - Université YAHIA Farés – Médéa.

2. Type d'étude

Il s'agit d'une caractérisation phénotypique de la flore bactérienne anaérobie de la plaque sous-gingivale chez Neuf (09) patients présentant une parodontite et six (06) sujets sains.

3. Objectifs de l'étude

- **Objectif principal**

Cette travail a pour objectif principale d'étudie les caractérisations phénotypique de *prevottella sp. , porphyromonas sp. ,bacteroides sp.* Chez les atteintes parodontite.

-L'évaluation de l'aptitude des souches isolées à former un biofilm bucco-dentaire

- **Objectif secondaire**

L'évaluation de l'impact des paramètres du questionnaire (les paramètres Socio démographiques, économiques et culturels et les practices d'hygiène bucco-dentaire) sur l'atteinte parodontal.

4. Population d'étude

Cette étude a ciblé des personnes se présentant au service clinique dentaire privé (Dr MOSBAOUI Bilal .Médéa.) pour des soins et de control.

L'examen clinique de chacun de ces sujets a été effectué par médecin dentiste qui applique les recommandations de l'organisation mondial de santé **(OMS 1987 ; OMS 1997).**

Les sujets concernés sont ceux qui ont répondu aux critères d'inclusion et d'exclusion que nous avons établie pour atteindre les objectifs de cette étude .Chacun d'entre eux a rempli un questionnaire médicaux-dentaire avant d'effectuer le prélèvement. **(Voir annexe 01).**

4.1. Les critères d'inclusion

Notre étude concerne des sujets âgés de 23à 30 ans, les neuf (09) personnes présentaient une parodontite et les six (06) sujets n'avaient aucune atteinte parodontale (sains) .

4.2. Les critères d'exclusion

- L'antibiothérapie dans les derniers 3 mois
- Présence des implants prosthétiques fixes ou mobiles
- Avoir moins de 24 dents permanentes
- Patients avec mauvaise hygiène (ne se brossent pas les dents)

.

I. matériels

I.1.Matériels de prélèvement la plaque sous-gingivale

- Pointe de papier
- rouleaux de coton

I.2. Milieu de culture

- Gélose Colombia (Oxoid, England) .
- Bouillon cœur Cervelle(BHIB) (Oxoid,Basingstoke, UK)
- Gélose de Rouge Congo

I.3. Matériels de culture anoxique

- Jarre d'anaérobie et générateur de Gaz
  - ✓ Jarre anaérobie (BD GasPack^{TM} EZ container, USA)
  - ✓ Sachets générateurs d'anaérobiose, GasPack(BD GasPack^{TM} EZ ,USA)

I.4.Disques d'antibiotiques

- Vancomycine
- Amoxicilline
- Kanamycine
- Collistine

I.5. Matériels d'étude du biofilm dentaire

-Microplaque de titration (96puits)

-Lecture de microplaque

1.6. Les détergents de nettoyage et de stérilisation

- l'eau d'javel

-alcool

-éthanol 69%

-l'eau de robinet

- solution PBS

I.7. autres matériels

- Microscope optique
- Balance, Plaque chauffante, Vortex,
- Etuve, Autoclave, Réfrigérateur
- Les boites de pétri, tubes Eppendorf,
- Les lames, les lamelles, pipette pasteur
- Ecouvillons stérile
- Microplaque 1000ul
- Bain marie
- Bec benzène

II. Méthodes

II.1. Echantillonnage

II.1.1. Prélèvement de la flore sous gingival

Les prélèvements de la plaque sous-gingivale concernent 09 sujets présente un attient parodontal et 06 sujets indemnes de parodonte, ces prélèvement ont été soigneusement effectués dans des conditions d'asepsie, par Dr Misbaoui B. (dentiste prévis .Médéa.).

Les prélèvements ont été effectués le matin 12h après le dernier brossage de la dent, et 2h après le dernier repas **(Wolf ,2005).**

II.1.2. Site de prélèvement

Le choix du site de prélèvement se fait après analyse des signes habituels d'activité de la maladie **(Verner ,2006):**

- saignement au sondage
- indice gingival
- perte d'attache
- profondeur de poche

Après avoir considéré ces différents paramètres cliniques et radiologiques, le site de prélèvement est choisi, par exemple au niveau d'une dent présentant la poche la plus profonde d'un quadrant **(Wolf ,2005).** Si plusieurs sites d'un quadrant présentent une profondeur de poche identique, le choix du site de prélèvement se fera de façon arbitraire. Les prélèvements peuvent se faire par pool ou site par site. En pool, les prélèvements de différents sites sont placés dans un même milieu de transport. En site par site, chaque site a son milieu de transport.

II.1.3. Techniques de prélèvement

Les deux méthodes les plus couramment utilisées pour collecter la plaque sous gingivale sont le prélèvement à la curette et le prélèvement par pointe de papier **(Loomer ,2004).** Ces techniques requièrent toutes deux l'élimination préalable de la plaque supra gingivale pour empêcher la contamination ou la dilution de l'échantillon.

Dans notre étude nous choisissons la méthode de pointe de papier

- **Prélèvement à la pointe de papier**

  Cette technique s'effectue selon le protocole suivant :

- suppression de toute la plaque microbienne supra gingivale
- introduction d'une pointe de papier propre à l'aide de parcelle stérile dans la poche parodontale et la laisser 30 secondes.
- Retirer la pointe de papier et la placer dans un tube Eppendorf

Le procédé peut être répété plusieurs fois si cela est nécessaire afin d'obtenir une quantité suffisante de contenant de plaque.

Deux règles importantes sont à respecter :

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

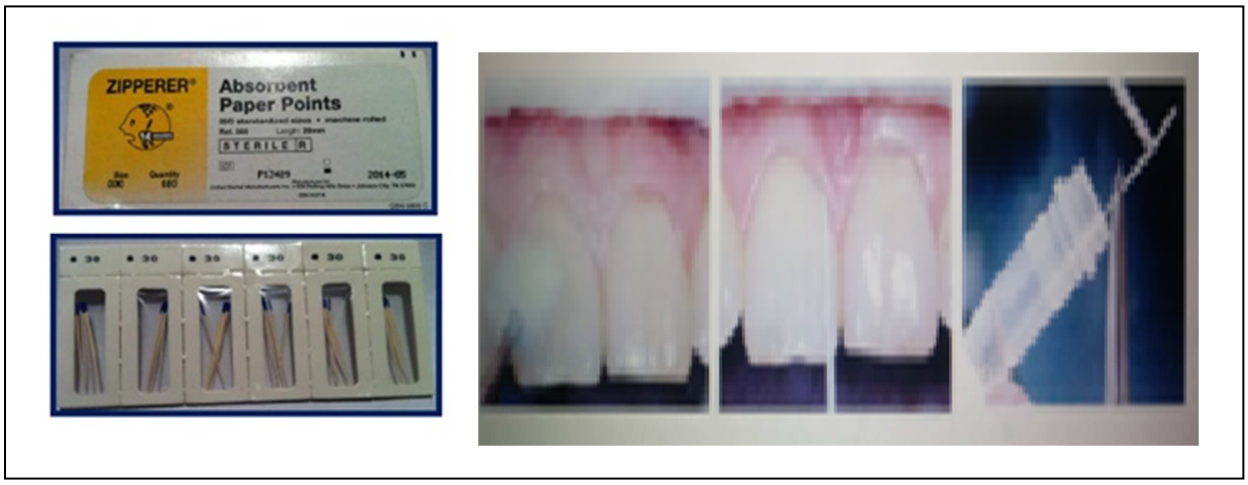


Figure 9: prélèvement par pointe de papier stérile.

II.1.4. Transport des prélèvements au laboratoire

Les prélèvements ont été transportés en anaérobiose au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences-Université de Yahia Farès de Médéa-

Les prélèvements ont été analysés dans un délai ne dépassant pas les 2 h après prélèvement.

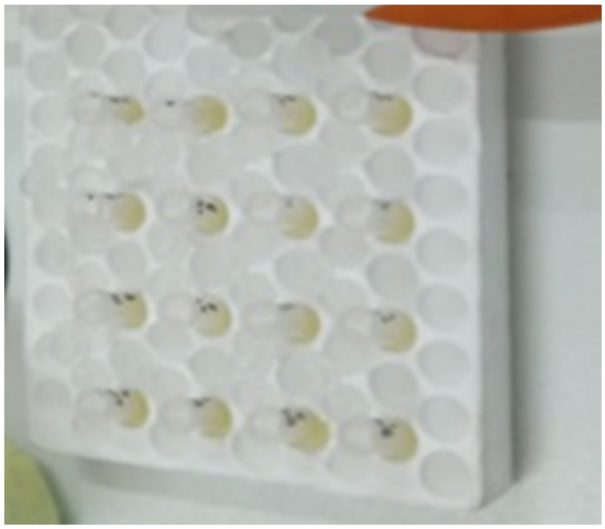


Figure 10 : Les Eppendrof contenant le prélèvement bactérien.

II.2. Analyse des prélèvements

Au niveau de laboratoire, les pointes de papier de prélèvement sont immédiatement déposées dans des tubes Eppendrof contenant 1ml de BHIB pré-réduit pour préparer les dilutions

II.2.1. Préparation des dilutions

La dilution va permettre de réalisé la culture primaire avec une densité moins importante et donc analysable. On les prépare en suivant ces étapes :

- Bien homogénéiser les tubes Eppendorf contenant 1ml pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex
- A partir de cette suspension mère, on prépare des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-4}dans des tubes Eppendorf contenant 900 ul du bouillon BHIB pré réduit.

II.2.2. Ensemencement et incubation

Le prélèvement est ensemencé pur et dilué à10^{-2}et10^{-4} :

- 100ul de la solution mère et de dilutions 10^{-2} et 10^{-4} sont ensemencés sur les boites pétri contenant la gélose Columbia au sang.
- Puis, les boites sont incubées en anaérobiose dans des jarres à 37°C pendant 5 à7 jours en utilisant des sachets générateurs d'anaérobiose (GENbag, GENbox) et le dessiccateur.



Figure 11 : préparation des dilutions (photo originale).

- ✓ **Atmosphère anaérobie**

L'anaérobiose peut être obtenue de différentes manières. Elle permet de cultiver les bactéries les plus sensibles à l'oxygène. D'excellents résultats sont néanmoins obtenues, pour les bactéries rencontrées en clinique humaine, avec les jarres anaérobies .des sachets générateurs d'anaérobiose sont introduits dans ces jarres **(Grollier et *al.* ,2004) (figure 14).**

- ✓ **les GENbox :**

Avant de déposer les boites pétri dans la jarre, il faut la nettoyée et désinfectée à l'aide de l'alcool dans une zone stérile ;

Après on place les boites pétri ensemencées dans la jarre ;

On ouvre le sachet d'aluminium et on sort le générateur d'anaérobiose **(Voir figure 12**), on le place dans la jarre immédiatement, par ce que une fois sorti de son emballage protecteur, le sachet s'active au contact de l'air ; avant de fermer le jarre on utilise l'huile de paraffine

On ferme la jarre tout en positionnant et on ajustant son couvercle. Et on l'incube à 37C° pendant 5à7 jours.

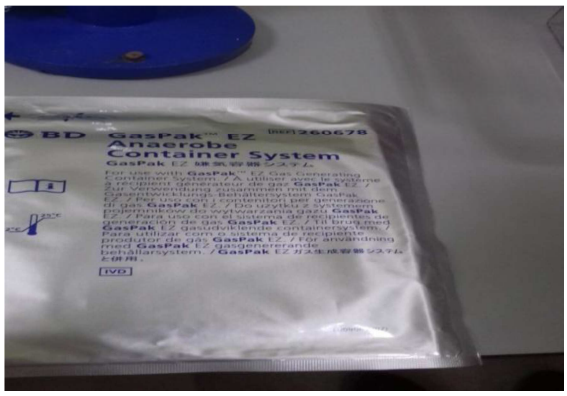


Figure 12: sachet d'aluminium comporte le générateur GENbox

- ✓ **les GENbag :**

Dans une zone stérile on ouvre la poche (le système à poche anaérobie GasPak EZ anaérobie), on place les boites de pétri ensemencées à l'intérieur de cette poche qui peut contenir de 1 à 4 boites ; Ouvrir le sachet d'aluminium ; sortir le générateur d'anaérobiose ; on le place dans la poche dans l'immédiat pour que l'atmosphère recherchée dans le sachet sera complet (**voir figure 13)**

On place le générateur dans la poche réformable avec les boites de pétri à l'intérieur. Après on ferme la poche tout pressant sur les parties de la fermeture à glissière l'une contre l'autre incuber le système à poche à 37C° pendant 5 à 7 jours.

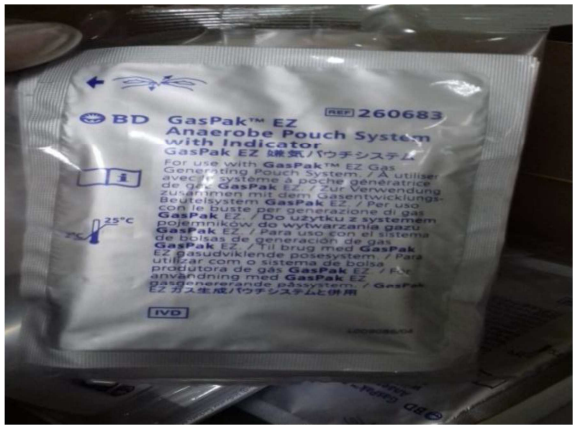


Figure 13: sachet d'aluminium comporte le générateur GENbag.

✓ **Mode d'emploi de la jarre**

- Placer les boîtes de Pétri dans la jarre ;
- Ajouter l'indicateur d'anaérobiose ;
- Ouvrir le sachet aluminium, sortir le générateur et le mettre immédiatement dedans ;
- Fermer immédiatement la jarre et incuber.



Figure 14 : à gauche un dessiccateur (remplace la jarre) contenant un sachet générateur d'anaérobiose Genbox et à droite une poche stérile contenant un Genbag (photo personnelle)**.**

II.2.3. Repiquage

Le repiquage consiste à isoler les colonies pour obtenir des cultures pures à partir d'un mélange de colonies bactériennes comme suit :

-A partir des boites de pétri incubées, on effectue plusieurs repiquages en se basant sur l'aspect macroscopique des colonies.

-prélever chaque colonie d'aspect distinct à l'aide de l'anse de platine stérile (ou Pipette pasteur stérile).

-ensemencer les milieux de cultures (gélose au sang) par les colonies prélevées selon le méthode des quadrants, qui ont ensuite incubées dans la jarre en anaérobiose à 37C° pendant 5à7 jours.

Notre étude concerne les bactéries pigmentées en noir appartenant au genre *Porphyromonas sp. , Bactéroides sp. et Prévotella sp.*

II.2.4. Deuxième repiquage (subculture)

Après incubation, les milieux gélosés seront contrôlés visuellement pour éliminer les boîtes contaminées. Ensuite, un deuxième repiquage concerne les boites contaminées pour obtenir des boites de cultures bactériennes pures qui vont être analysées pour identifier les espèces bactériennes de la plaque supra-gingivale.

II.3. Identification phénotypiques des isolats

L'identification bactérienne est basée sur l'examen microscopique et macroscopique, les tests biochimiques et le test de sensibilité aux antibiotiques **(Mégraud ,1994).**

Les tests suivants ont été réalisés pour chaque boite de culture pure obtenue:

II.3.1. Caractères microscopiques

Les techniques d'examen microscopique permettent d'établir une pré-identification pour le microorganisme étudié.

II.3.1.1. L'état frais

Cet examen permet d'apprécier la forme et la mobilité. Il faut éviter de confondre la mobilité d'une bactérie avec les mouvements browniens.

Une goutte de l'eau distillée est déposée au centre de la lame, puis ensemencé par une pipette Pasteur contenant la culture pure de colonies suspectes puis la recouvrir par une en évitant de créer de bulles d'air. L'observation se fait par microscope optique (grossissement × 100).

II.3.1.2. Coloration de Gram

L'examen au microscope du prélèvement après coloration de Gram permet de repérer quelque fois la prédominance d'un type bactérien (cocci ou bacilles) et d'orienter le diagnostic **.**

-Les bactéries à Gram positif apparaissent en violet (Gram+).
-Les bactéries à Gram négatif apparaissent en rose (Gram-).

- Réalisation d'un frottis
- Coloration de Gram
- Observation

La préparation des réactifs et Mode opératoire **(voire annexe 03).**

II.3.2. Caractères macroscopiques

L'étude macroscopique consiste à une observation à l'œil nu des colonies bactériennes Présentes dans les boites de pétri afin de décrire ses caractéristiques :

- Odeur fétide caractéristique des anaérobies
- Aspect morphologique des colonies
- Présence de pigmentation noire des colonies

L'aspect macroscopique des colonies est déterminé après incubation à 37°C sur gélose Columbia au sang pendant 2 jours.

II.3.3. Caractères biochimiques

II.3.3.1. Test de catalase

Le test de catalase est utilisé pour détecter la présence de l'enzyme catalase. La catalase est une enzyme qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H2O2) en oxygène gazeux et en eau, un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase.

Pour mettre en évidence cette enzyme, une partie de la colonie suspecte est diluée dans une goutte d'eau oxygénée sur une lame stérile .Le dégagement de bulles de gaz indique la présence de la catalase **(Allen et *al*.).**



Figure 15 : Test de catalase (photo personnelle).

2.3.3.2. Test de cytochrome- oxydase

Ce test permet de déterminer si un micro-organisme possède le système enzymatique (cytochrome c) lui permettant d'utiliser l'oxygène libre (O2) comme accepteur final d'électron dans la chaine respiratoire. Il est réalisé à l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactifN-diméthylparaphénylène diamine **(Leyral et** *al*. **,2007 ; Joffin et** *al* **.,2006) :**

- A l'aide de pinces placer un disque d'oxydase sur une lame porte objet.
- 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 stérilisée.
- Frotter doucement la colonie sur le disque et observer l'apparition d'une coloration
- violette dans un délai de 30 secondes.

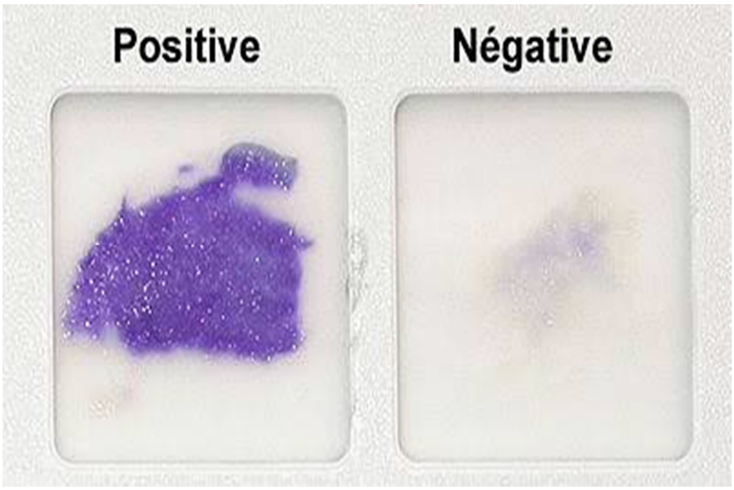


Figure 16 : Teste oxydase

II.3.4. Test de sensibilité aux antibiotiques

II.3.4.1. Principe

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques sur milieu Columbia au sang. Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'un germe à un ou plusieurs antibiotiques pour établir un tableau thérapeutique. Dans la présente étude l'antibiogramme est un critère ultime d'identification qui nous a permis de différencier entre les trois genres *Porphyromonas sp., Prévotella sp. et Bactéroides sp.*

II.3.4.2. Technique

-A partir de la colonie bactérienne incubée

-Avec un écouvillon essoré, ensemencer toute la surface de la gélose Columbia au sang en stries serrées (successivement 3 orientation décalées de 60C°)

Déposer les disque à la surface de la gélose en les appliquant délicatement à la pince stérile (**CASFM, 2015).**

-Il faut incubée les boiter à4C° pendant 4h.

Puis incuber les boiter en anaérobiose à 37C°pendant 48 heures.

En raison de la non disponibilité des API 20 A utilisées pour l'identification des bactéries anaérobies, on a pu se baser sur une autre alternative d'identification qui est le test de sensibilité aux antibiotiques ; sachant que les bactéries pigmentées en noir sont soit *Porphyromona sp., Bactéroides sp. ou Prévotella* sp. et pour ces trois genre on peut faire la discrimination entre les trois genre par les trois antibiotiques : kanamycine, vancomycine et la colistine.**et** amoxicilline .

II.3.4.3. Lecture

Les souches bactériennes peut être définie comme sensible(S), intermédiaire(I) ou résistance(R) **(CA-SFM ,2005**)

II.4. Les méthodes d'étude de la formation de biofilm

Dans le cas des maladies à biofilm mixte. Il s'agit d'étudier les facteurs de virulence/persistance de bactéries vivant en biofilm, dans des environnements soumis à différents paramètres **(Bouchard et *al.*,2015).**

Bien que la standardisation des méthodes d'étude des biofilms soit aujourd'hui nécessaire. Plusieurs stratégies in vitro permettent de modéliser les biofilms. La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture. C'est- à - dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de microorganisme.

Les méthodes utilisées sont soit des méthodes statiques (culture en plaques de micro titrages et analyse après coloration au Crystal violet) Soit des méthodes dynamiques comme des chambres en flux.

II.4.1. Méthodes des microplaques de titration

Les microplaques utilisées étaient en polystyrène comportant 96 puits sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former un biofilm. La méthode des microplaques detitration au cristal violet, mise au point par **O'Toole et Kolter (1998)** est une technique très utilisée, pour la formation de biofilms **(Niu et Gilbert, 2004 ; Pierce et *al.*, 2008).** C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm **(Niu et Gilbert, 2004).**En effet cette technique de coloration permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées **(Pratt et Kolter, 1998).**On a effectué la technique de microplaque de titration en utilisant deux milieux (BHIB ET BHIB additionné de 2% de saccharose) pour tester l'effet de saccharose sur le pouvoir de formation de biofilm

2.4.1.1. Technique

-A partir des colonies isolées (*Porphyromonas sp., Prévotella sp., Bactéroides sp.*) effectuer des cultures d'une nuit dans les milieux BHIB et BHIB+2% saccharose.

-Après 24 heures, ajuster le DO des suspensions bactériennes à 0.5 McFarland(l'équivalent de 10^8 UFC/ml) à la longueur d'onde 600 nm.

-Inoculer chaque puits de la microplaque de titration (96 puits) avec 200µl de la suspension ajustée

-Incuber les microplaques en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures ou **(Al-Ahmad, 2012)**

-laver les microplaques 3 fois par la solution PBS (phosphate -buffered saline pH=7) pour éliminer les cellules bactériennes non adhérentes

-sécher les plaques à 60°C pendant 10 mn remplir les puits par le Crystal violet à 0.1% pendant 10 mn **(Al -Ahmad, 2012)**

-laver les microplaques 3 fois par l'eau distillée

-laisser les microplaques sécher à 60°C pendant 10min.

-introduire dans chaque puit 200µl de l'éthanol et la laisser 15 min

2.4.1.2. Lecture

La lecture de densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques (bioTek, Allemagne) à 570 nm

2.4.1.3. Calcul de la valeur seuil de DO minimale et DO maximale

D'après (**Al-Ahmad et** al.**2014)**, les valeurs seuil de DO minimale (DO Min)et DO maximale (DO Max) ont été calculées selon les formules suivantes:

DO_{Min}=$DO_{moyenne}$ du témoin+ (3 ·δ de DO du témoin).

$DO_{Max} = 3\times DO_{Min}$

δ: l'écart type.

Selon ces deux valeurs seuils, les souches bactériennes isolées ont été classées en trois catégories:

C1:souches non productrices de biofilm si DO<DOMin

C2:souches modérément productrices de biofilms DO_{Min}<DO<DO_{Max}.

C3 : souches fortement productrices de biofilm si DO>DO_{Max}

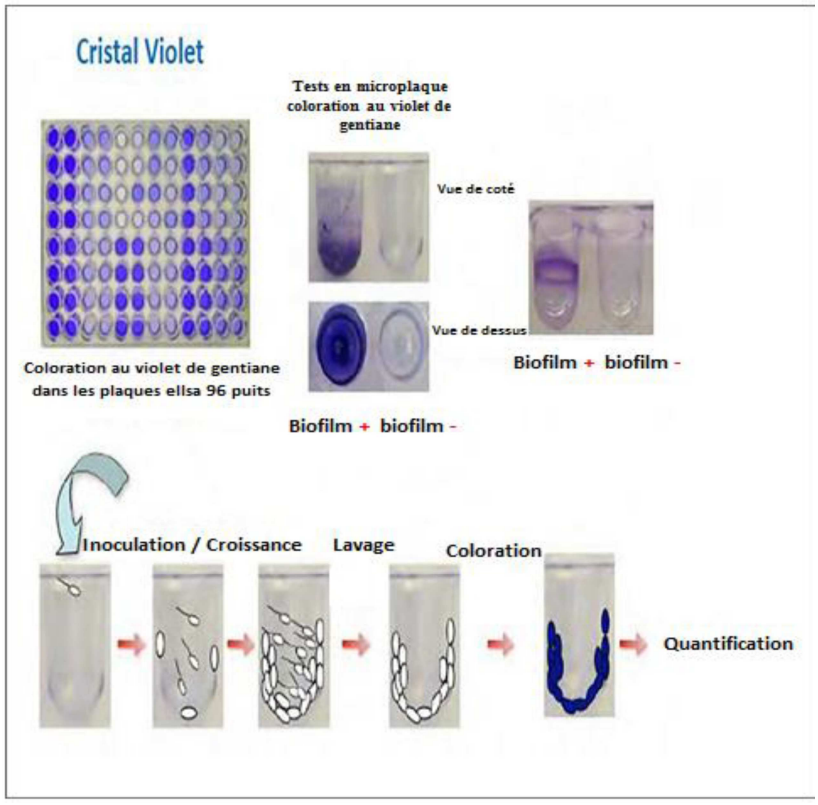


Figure 17 : Formation de biofilm en microplaque **(Bellifa, 2014)**

II.4.2. Méthode de Rouge Congo

La méthode du Rouge Congo est une méthode qualitative**(Freeman et** *al*.**, 1989).** La gélose Rouge Congo est un milieu très convenable pour la détection de souches productrices de slime. Sur ce milieu, les souches exprimant le PIA (polysaccharide intercellularadhesin) donnent des colonies noires avec une surface rugueuse contre des colonies de couleur rouge et à surface lisse pour les souches PIA négatif **(ZiebuhretaI. ,2001).**

II.4.2.1. Technique

-Préparer la gélose Rouge Congo en utilisant:

Le bouillon BHIB 37 g/L, saccharose 50 g/L, agar 10 g/L et l'indicateur Rouge Congo 0.8 g/L.

-Ensemencer en stries une colonie à la surface d'une boite de gélose Rouge Congo (RCA).

-Incuber les boites en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures

II.4.2.2. Lecture

Les souches productrices de biofilm donnent des colonies noires à surface rugueuse contre des colonies rouges à surface lisse pour les souches non productrices debiofilm.



Figure 18 : Culture sur la gélose Rouge Congo **(Hou *et* al.*,* 2012).**
(A) RCA-positive (colonies noires), **(B)** RCA-positive (colonies noires),**(C)** RCA-négative (colonies rouges)**.**

I. Résultats de l'analyse statistique des données du questionnaire :

20 sujets présentant des poches parodontales et 15 indemnes de parodontite qui habitent la région Médéa ont répondu aux critères d'inclusion et d'exclusion, parmi ces prélèvements nous avons analysé 09 patients ayant des lésions parodontales et 06 indemnes de parodontite

L'âge moyen de la population est de 27ans, avec une amplitude de 23à 30 ans.

I.1.Les paramètres sociodémographiques et l'hygiène bucco-dentaire de l'échantillon :

Les fréquences de différents paramètres sociodémographiques, et les fréquences d'hygiène sont présentés dans le (**Tableau 1 annexe 4)**

I.1.1. Répartition selon l'âge et sexe

Ce travail a concerné 35 adultes des deux sexes âgés de 23 à 30 ans. Avec une moyenne d'âge de27 ans. La répartition des participants selon l'âge est présentée dans la figure suivante:

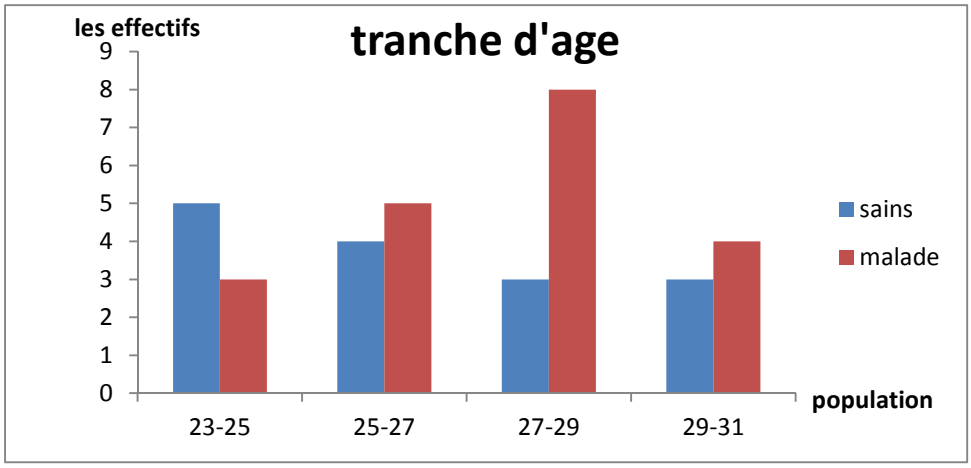


Figure 20 : représente la répartition des deux populations selon tranche d'âge

Nos résultat sont révélé que dans le groupe des sujets indemnes de parodontite,9 (60%) personnes appartiennent à la tranche d'âge 23-27 ans. Et 6 (40%) appartiennent à la tranche d'âge 27-30.

Dans le second groupe 20 sujets ont été incriminés dans cette étude, 8d'entre eux sont âgés de 23 à 27 ans, 4 appartiennent à la tranche d'âge 29-30 ans et 8 sujets sont âgés de 27-29 ans qui est la tranche d'âge la plus représentée dans ce groupe

Une étude rapportée par **Alban dar et ramas (2002)** sur des étudiants ougandais, a montré que le taux de prévalence des parodontites est deux fois plus élevé chez les adultes que chez les enfants âgés de 13 à 15 ans.

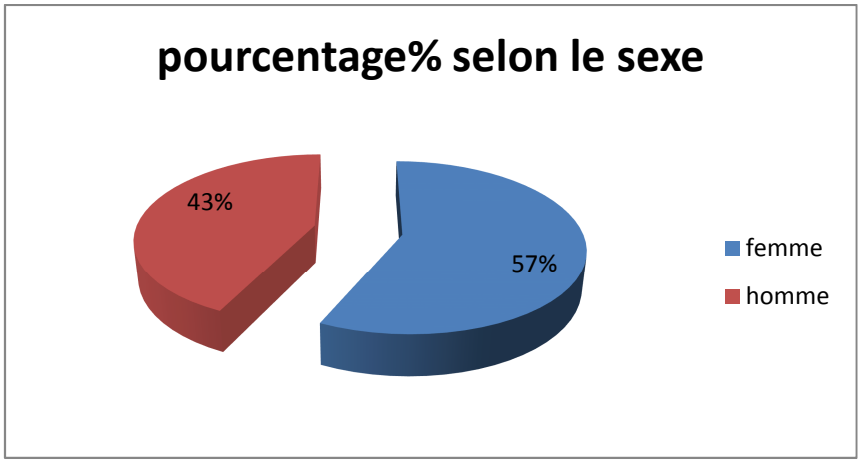


Figure 21 : la répartition des deux populations selon le sexe

Dans notre échantillon 43% des patients étaient de sexe masculin et 57 % de sexe féminin. On note une nette prédominance féminine. Cette observation milite en faveur de l'hypothèse de la prédisposition des patientes de sexe féminin a développé une parodontite par rapport aux patients de sexe masculin. Les résultats rapportés par **Benoist (2004)** ont mis en évidence une prédilection pour le sexe féminin. Il considère que les individus de sexe féminin ont un risque de parodontite plus élevé dans une période autour de la Puberté, mais que cette prédisposition, par rapport aux individus de sexe masculin baisse avec l'âge.

En outre, **Politis et Badawi (2010)** ont réalisé une étude rétrospective dont l'objectif est de déterminer la prévalence de la parodontite Sur 49 sujets présentant une parodontite, Le rapport hommes atteints de parodontite / femmes atteintes de parodontite est égale à 0,63 (61% de femmes face à 39% d'hommes).

1.2. Les paramètres cliniques :

Les fréquences des différents paramètres cliniques pour les sujets avec et sans lésions parodontales sont présentées dans **(le tableau 01 annexe 04).**

1.2.1 Répartition selon fréquence de brossage des dents :

Les fréquences de brossage des dents des deux populations sont présentées dans la **figure (22).**

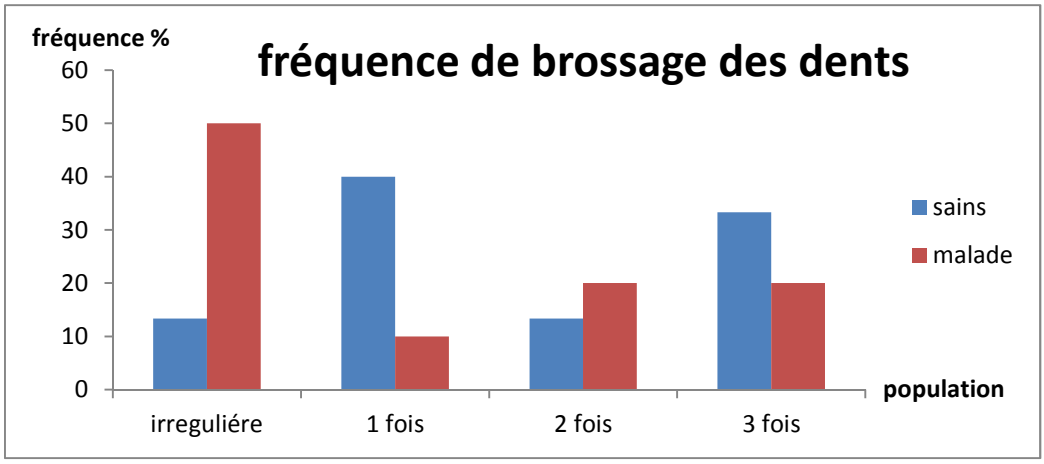


Figure 22 : Les fréquences de brossage des dents pour les deux population

Les fréquences de brossage des dents pour les deux populations sont révélé **que** (86 %) des sujets indemnes des lésions parodontales se brossaient quotidiennement les dents. Parmi eux, (40%) indiquent se brosser les dents une fois par jours et (13.33%) deux fois par jour Alors que, 50% des sujets à une lésion parodontale se brossaient les dents Irrégulièrement et 20% qui se brosse deux foins par jours ce qui est insuffisant pour assurer une bonne hygiène bucco-dentaire

Il est admis aujourd'hui que pour agir efficacement contre l'accumulation de la plaque, le brossage doit être effectué après les repas. Le brossage du soir est également le plus important dans la mesure où, durant la nuit, la sécrétion salivaire diminue ; or la salive participe entre autres à la protection des dents. L'hygiène bucco-dentairea pour objectif d'éliminer la totalité de la plaque bactérienne dont la présence est indispensable au développement de la parodontite **(Muller et *al.*, 1997).**De ce fait, l'hygiène bucco-dentaire influence directement sur la maladie parodontite.

En effet, une bonne hygiène bucco-dentaire et un apport en fluor, en particulier en application local grâce à des dentifrices qui en contiennent, diminuent l'influence de l'alimentation dans la formation de la parodontite **(Minnig, 2002).**

1.2.2 Répartition selon saignement de la gencive :

Les fréquences de saignement de la gencive des deux populations sont illustrées dans la **(figure 23.)**

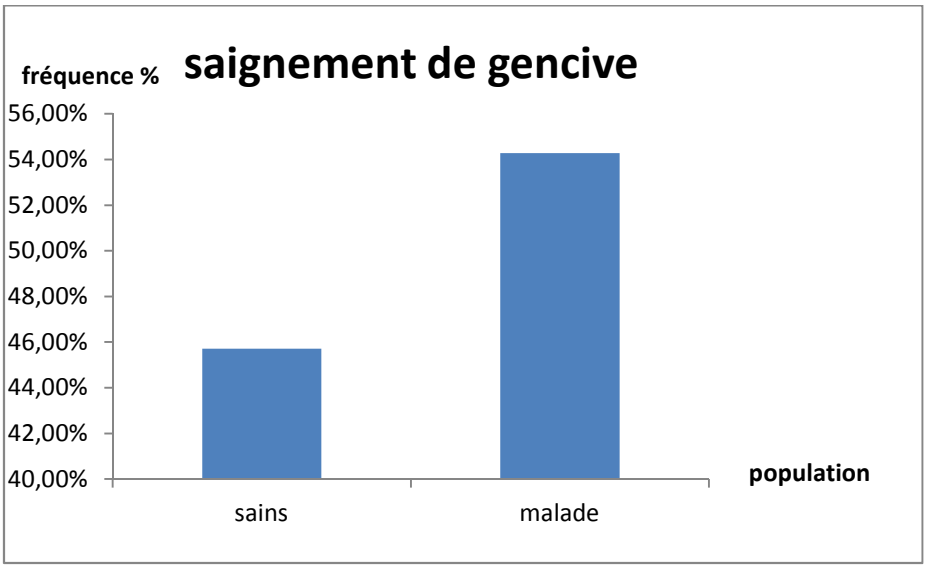


Figure 23 : Réparation de fréquence de saignement de gencive lors de brossage des dents chez les deux populations

La fréquence de saignement de la gencive lors de brossage est plus importante chez les sujets ayant des poches parodontales (71%) que chez le sujet indemne de parodontite (29%).
L'examen clinique effectué par le dentiste indiqué la présence des poches parodontales à leur début ou bien associées à une gingivite.
Le saignement de la gencive lors de brossage des dents peut être un signe de gingivite. Les facteurs à l'origine de la transition de la santé parodontale à la gingivite sont une combinaison d'exposition bactérienne, de colonisation et un enrichissement en bactéries Gram - dont, le taux passant de 15 à 50% **(Darverau ,1997).** Il est indiqué dans plusieurs travaux antécédents que la prédominance des bactéries Gram – en cas de gingivite engendre le développement d'une parodontite par la suite.

1.2.3. La répartition selon la fréquence de tabagisme et d'alcoolisme :

Les fréquences de tabagismes et alcoolisme des deux populations sont figurées par la suite :

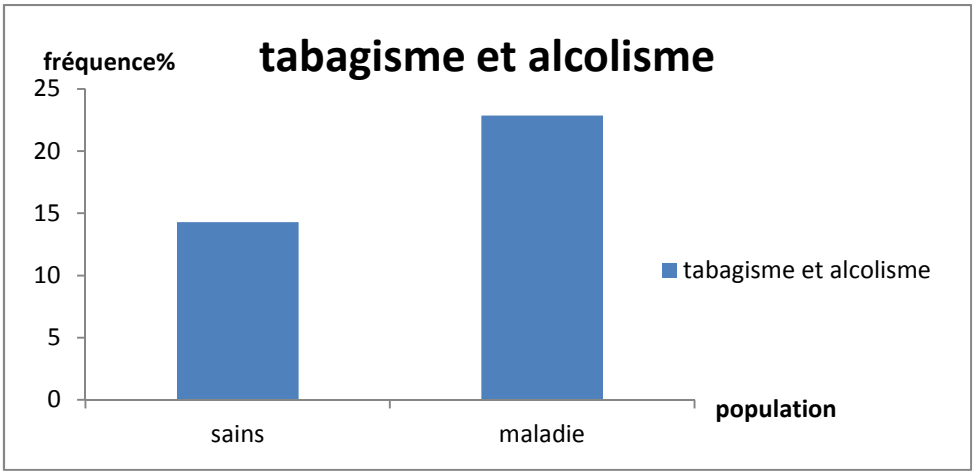


Figure : 24les fréquences de tabagisme et alcoolisme pour les deux populations**.**

Nous remarquons que la fréquence de consommation d'alcool et de tabac chez les sujets malades est peu élevée par rapport les sujets indemnes de lésions parodontales. Ces fréquences moins importantes sont dues à la prédominance féminine dans la présente étude avec 9 femmes contre 6 hommes pour le groupe de sujets indemnes de lésions et 11 femmes contre 9 hommes pour les sujets avec parodontite. Et il est connu que les femmes qui fument sont mal vues et maudites par notre société.

Le tabagisme reste un facteur de risque de maladie parodontales de fait que : Le monoxyde de carbone contenu dans la fumée de la cigarette favorise la croissance bactérienne. De plus, la nicotine entraine une oxydation cellulaire, diminue la vascularisation gingivale et inhibe la production de collagène **(Tenenbaumet ,2003; Calas *al*., 2005 ; Tenernbaum, 2003).**

Les fumeurs présentent des variation qualitatives de la flore sous-gingivale, avec une augmentation de la prévalence et la proportion des bactéries Gram négatif pigmentés en noir *(porpyromonas* .sp ,*Prevotella*.sp *et Bacteroides*.sp) **(Sixo *et al*.,1996.).**En outre, le tabagisme est un facteur de risque de gingivite ulcéro-nécrotique aigue et est associé à une augmentation de la profondeur des poches parodontales, de la perte détache de parodontale et de la perte d'os alvéolaire.

1.2.4. La répartition des fréquences de la mauvaise haleine :

Les fréquences de la mauvaise haliene chez les deux populationssont ilustrées dans la **figure(25)**

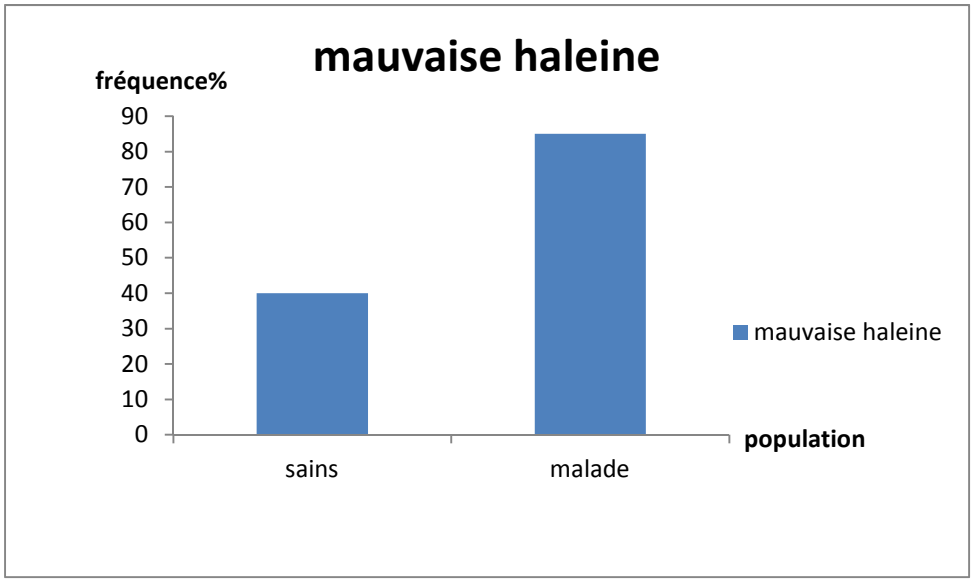


Figure : 25 La répartition de fréquence de mauvaise haleine chez les deux populations.

La fréquence de mauvaise haleine est plus élevée chez les sujets présentant des lésions parodontales (63%) que chez les sujets indemnes de lésions (37%). Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **HOCEINI (2016)** notant un pourcentage très bas des sujets indemnes de lésions ayant une mauvaise haleine.

La maladie parodontale est un facteur potentiel qui contribue à la mauvaise haleine. Le manque d'hygiène bucco-dentaire, y compris le manque de brossage dentaire, la non utilisation des bains de bouche anti-plaque et la soie dentaire, est un facteur de risque de la mauvaise haleine **(Pratibba et *al.*, 2006) .**

La mauvais haleine est relativemnet associée à la présence des microflore bactériennes. Une étude réalisée par (**Faryavi et *al.* en 1999)** a révélé des fréquences d'isolement du genre *Prevotella* (bactérie anaérobie Gram -) significativement plus élevées chez les enfants qui ont une mauvaise haleine (19%) par rapport à ceux qui n'ont pas ce problème.

2. Résultats de l'analyse des prélèvements :

Les prélèvements de la plaque sous gingivale de 15 sujets (9) présentant une parodontite et 6 indemnes de parodontite) ont été réalisés par Dr MESBAOUI (médecin dentiste privés-Médéa-), ils sont transportés au laboratoire de la faculté des sciences -Université Yahia Farés de Médéa-. Pour la caractérisation phénotypique des souches Gram – , anaérobies et à pigmentation noire à savoir des *porpyromonas.* sp *,prévotella.* sp *et bacteroide.* sp qui sont responsable de la parodontite.

2 .1.Résultats de l'identification phénotypique des isolats

2.1. 1.Résultats de l'examen microscopique de prélèvement

2.1.1.1. L'états frais

L'état frais de tous les prélèvements des plaques sous-gingivales des deux Populations nous a permis de constater que la microflore bactérienne de ces derniers est immobile. Des études antérieures ont considéré que le grand nombre des bactéries anaérobies à Gram négatif immobiles est un signe de lésions parodontales (**Noiri et *al.* ,2001),** cela justifie probablement la présence de ces bactéries dans nos prélèvements.

2.1.1.2. Coloration de gram

L'observation par la coloration de Gram nous a permis de recenser la coloration de Gram des prélèvements dentaires des sujets ayant ou indemnes des lésions parodontales sont colorées par la couleur rose ce qui signifiées que les souches bactériennes sont des Gram(-) ce qui est en accord avec les résultats d'une étude antérieure **(Rozkiewicz, 2006).** De même, les Bacilles étaient prédominants par rapport aux coccobacilles pour tous les prélèvements analysés **(Voir Figure 26et le tableau 4).**

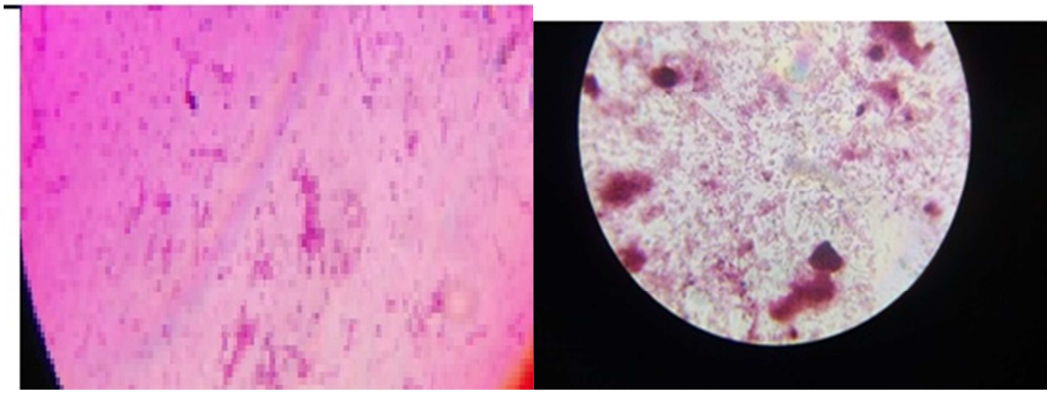


Figure 26: observation microscopique de coloration de gram (photo personnelle) (Grossissement ×100).

Tableau 04 : les résultats de la forme, la mobilité et Coloration de Gram de différents isolats.

Isolats	Forme	Mobilité	Coloration de Gram
A1	Bacille	Immobile	Gram -
A2	Court Bacille	Immobile	Gram -
A3	Bacille	Immobile	Gram -
A4	Coccobacille	Immobile	Gram-
A5	Coccobacille	Immobile	Gram -
A6	Coccobacille	Immobile	Gram -
A7	Bacille	Immobile	Gram -
A8	Bacille	Immobile	Gram -
A9	Court Bacille	Immobile	Gram-
A10	Coccobacille	Immobile	Gram-
A11	Court Bacille	Immobile	Gram-

2.1. 2.Résultats de l'examen macroscopique de prélèvement.

Les bactéries ont été cultivées, repiquées sur le milieu Columbia au sang en anaérobiose à 37C° / 5-7 jours pour les deux populations. Après cette période incubation les colonies à pigmentation noire ont été poussées sur le milieu avec des tailles différentes (petite, moyenne et grande) et de forme variable (lisse, bombé, à bord..) .(voir les figure 27,28)



Photo 27: Représente les colonies bactériennes après l'isolement chez les sujets présente un lésions parodontal.

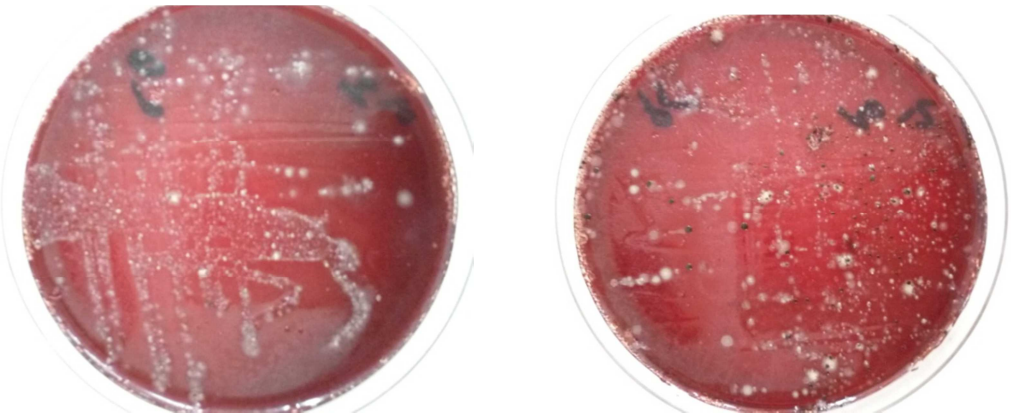


Photo 28 : Représente les colonies bactériennes après l'isolement chez les sujets sains

Après le repiquage sur milieu Columbia additionné de sang dansles mêmes conditions de croissance, les colonies obtenues sont des colonies pures et noires (Voir la figure 29).

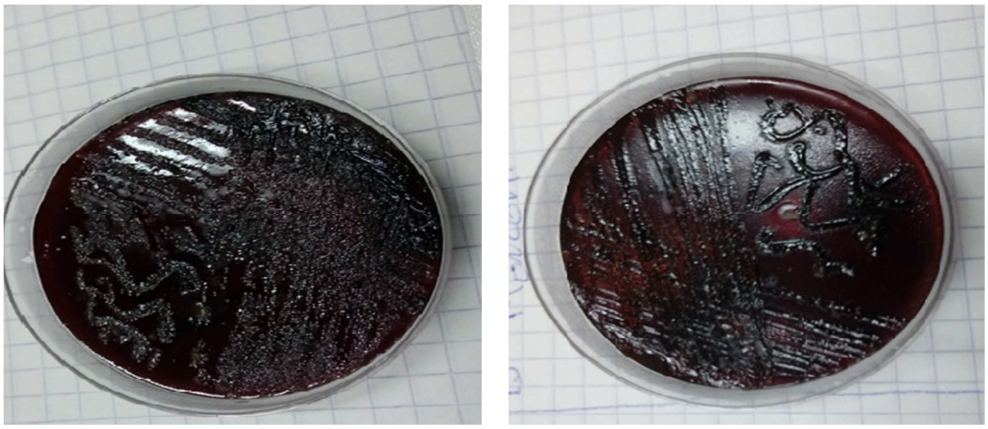


Photo 29 : Représente les colonies bactériennes après le repiquage chez les sujets maladie (photo personnelle)

- **Comparaison entre les colonies obtenues des deux populations :**

D'après les colonies présente dans les **(figure 27, 28,29)** précédentes nous remarquons que plusieurs morphotypes identiques ont été isolés à partir des plaques sous-gingivales des deux populations, la différence entre le pourcentage des bactéries des deux populations est illustrée dans la figure suivante **(Figure 30).**

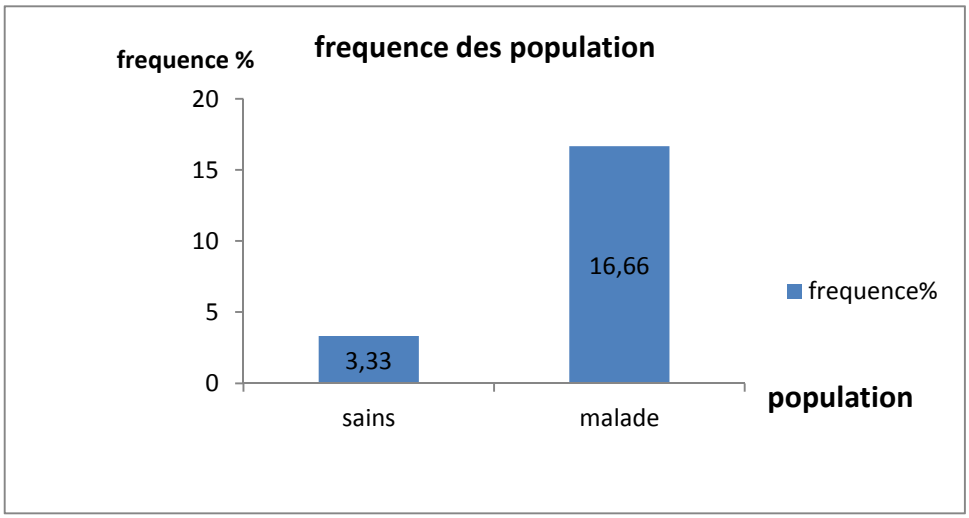


Figure 30 : fréquence d'isolement des bactéries chez les deux populations.

La fréquence d'isolement des bactéries anaérobies pigmentées en noir (*Porphyromonas* sp. *Prévotella* sp., *Bactéroides* .sp) était plus importante en cas d'une atteinte parodontale (16.66%) par rapport à la plaque sains (3.33%) ce qui indique que la composition de la flore sous-gingivale des sujet présentant un parodonte sains diffère de celle des sujets présentant

une parodontopathie. Les grandes différences se situent au niveau des espèces des complexes rouge et orange ; en effet, le nombre de bactéries appartenant à ces deux complexes est significativement plus élève chez les individus avec parodontite **(Socrasnsky ,2005).**La culture bactérienne en anaérobiose sur gélose au sang des prélèvements des plaques sous - gingivales a permis l'isolement des bactéries anaérobies Une étude réalisée sur la microflore des maladies parodontales **(Darveau ,1997)**a montré une forte ressemblance avec la composition bactérienne des prélèvements de plaques de notre étude**.**

2.1.3. Résultat de l'identification biochimique.

- **Test de la catalase**

Les résultats du test catalase indiquent que la plus part des isolats ne possèdent pas l'enzyme catalase, donc catalase (-), et certaines d'autre possèdent l'enzyme donc sont des Catalase positive(+) ce qui est d'accord avec les résultats antérieure **(Verner., 2006).**

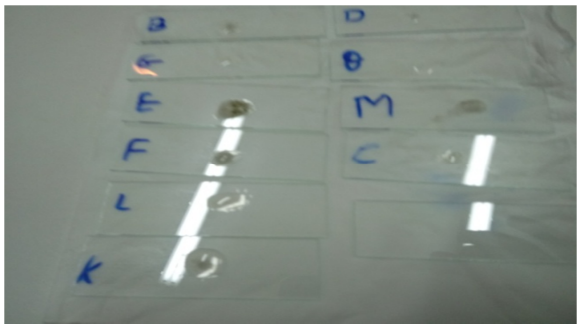


Figure 31 : Résultat de teste Catalase

- **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 donc sont des oxydases(-) ce qui d'accord avec les études de **(Verner., 2007).**

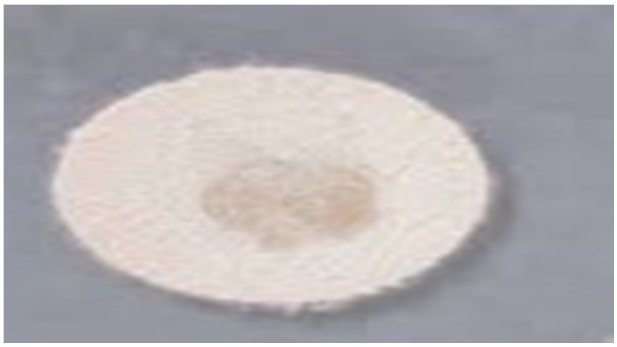


Figure 32 : Résultats de test oxydase

Tableau 05: Résultats des testes catalase et oxydase des isolats

Isolats	Catalase	Oxydase
A1	+	-
A2	-	-
A3	+	-
A4	-	-
A5	-	-
A6	-	-
A7	+	-
A8	+	-
A9	-	-
A10	-	-
A11	-	-

2.1.4. Résultats d'identification des isolats par la Sensibilité aux antibiotiques

L'antibiogramme est classiquement utilisé en bactériologie médicale afin de déterminer la sensibilité bactérienne à différentes molécules antibiotiques. Cette méthode permet également de contrôler immédiatement la présence d'un mutant ou d'une résistance inductible, de distinguer l'effet antagoniste ou synergique d'une association de deux antibiotiques de cet examen appliqués aux bactéries anaérobies et capnophiles de la cavité buccale apportent des informations importantes au clinicien afin qu'il puisse choisir l'antibiotique ou l'association de molécules antibiotiques la plus appropriée.

Tableau 06 : Représente l'ensemble des résultats de la sensibilité et la résistance des souches étudie par antibiogramme **:**

Les souches	AMX	VA	KAN	COL
A1	S	S	R	R
A2	S	S	R	S
A3	S	S	R	R
A4	S	S	R	R
A5	S	R	R	R
A6	S	S	R	S
A7	S	R	R	R
A8	S	S	R	R
A9	S	R	R	R
A10	S	S	R	S
A11	S	S	R	S

AMX : Amoxicille, VA : Vancomycine, KAN :Kanamycine, COL :Colistine.

S : souche sensible R : souche résistante .

La détermination de la sensibilité des souches isolées aux antibiotiques choisis nous a permis de regrouperles 11 isolats en trois (03) espèces *Prevotella* sp., *Bacteroides* sp., *Porphyromonas sp*. Les résultats sont détaillé par la Suite *:*

2.1.4.1. Porphyromonas :

Ce sont des coccobacilles de petite taille, Gram négatif ; immobile, non sporulé, anaérobie strict.

Les colonies de 1-3nm, ronde, crémeuse, bord irrégulier, lisse, hémolytique et marron Catalase négatif, Oxydase négatif **(Verner, 2007).**

Les résultats des sensibilités aux antibiotiques sont figurent dans le tableau suivante :

Tableau 07 : Résultats de la sensibilité de *porphromonas .sp* aux antibiotiques :

Souches	AMX	VA	KAN	COL
Porpyromonas	S	S	R	R

AMX : Amoxicille, VA : Vancomycine, KAN :Kanamycine, COL :Colistine.

S : souche sensible.R : souche résistante

Dans cette étude, le genre *Porphyromonas sp.* était aussi présent dans les plaques sous-gingivales des deux populations, avec des fréquences différentes. Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques confirment la résistance de *Porphyromonas* sp. à la Colistine **(CA-SFM, 2015).**Des études antécédentes ont révélé une prévalence élevée de *Porphyromonas* sp.et d'autres bactéries anaérobies appartenant au phylum du Bacteroides (*Prevotella* sp. *Capnocytophaga ,et Bacteroides* sp.) dans la plaque sous-gingival des sujets malades ayant une parodontite et ils étaient moins fréquents chez les sujets sains (**Keijser et *al*., 2008**), ces souches colonisent la plaque dentaire en interagissant avec d'autres bactéries, tels que le groupe des streptocoques oraux **(Daep et *al.*,2008)** et elle ont été liées à diverses maladies orales telles que les maladies parodontales et la carie dentaire **(Nadkarni et *al.* 2004).**

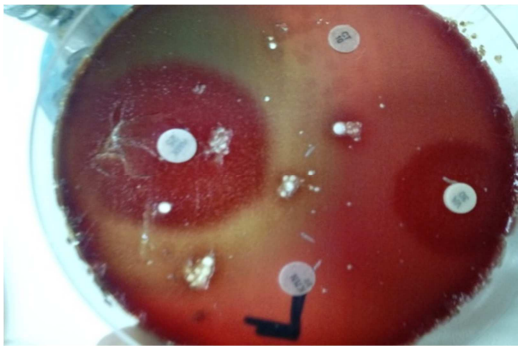


Photo 33 : antibiogramme de *porhyromonas*.sp

2.1.4.2. Bactéroides

Ce sont des bacilles, Gram-, catalase+, oxydase-, immobile, anaérobies, non pigmentées.

Les résultats des sensibilités aux antibiotiques figurés dans le tableau suivantes :

Tableau 8:Résultats de la sensibilité de *Bactéroides* sp. aux antibiotiques :

Souches	AMX	VA	KAN	COL
*Bacteroides*sp.	S	S	R	S

AMX : Amoxicille, VA : Vancomycine, KAN :Kanamycine, COL :Colistine.

S : souche sensible.R : souche résistante .

La souche *Bacteroides* sp. Était présente dans les prélèvements des plaques issus des deux populations conformément aux résultats des études précédentes **(Preza et *al*., 2008),** le test de Sensibilité aux antibiotiques confirme la résistance de cette souche à la Kanamycine **(Dubreuil, 2006).**

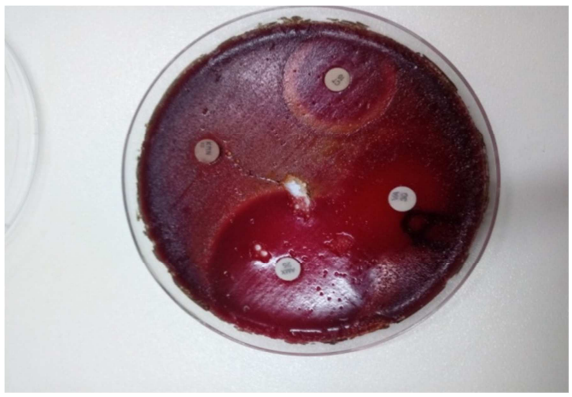


Photo 34 : antibiogramme de *bacteroides*.sp

2.1.4.3. Prévotella

Ce sont des courts bacilles, Gram-, catalase-, oxydase-, immobile, anaérobies, non sporule .

Colonie de 1-4nm, lisse, bombé, bords, irréguliers, non hémolytique beige fonce opaque.

Catalase -, oxydase-

Tableau 9 : Résultats de la sensibilité de *Prevotella* sp. Aux antibiotiques :

Souches	AMX	VA	KAN	COL
Prevotella	S	R	R	R

AMX : Amoxicille, VA : Vancomycine, KAN :Kanamycine, COL :Colistine.

S : souche sensible R : souche résistante

L'identification phénotypique des prélèvements incubés en anaérobiose a révélé la présence de la souche *Prevotella* sp. Dans les plaques sous-gingivales des deux populations, le test de Sensibilité aux antibiotiques confirme qu'il s'agit du genre *Prévotella* à cause de sa résistance à la Vancomycine et la colistine conformément aux résultats de l'antibiogramme établi dans D'autres travaux **(Dubreuil, 2006 ; CA-SFM, 2015).**

Le genre Prevotella sp. se trouve dans les plaques dentaires supra et sous-gingivales, la salive, la

Muqueuse buccale et dans la zone de l'amygdale de la cavité buccale**,** elles sont fréquemment observées chez les individus sains et ne sont pas souvent associées à des maladies. Cette bactérie est l'une des colonisateurs précoces de la bouche des enfants, par agrégation avec d'autres espèces bactériennes **(Haraldsson, 2005),** et son isolement à partir des prélèvements dentaires des deux populations étudiées est en corrélation avec les résultats cités par d'autres auteurs **(Tanner et *al*., 2011).**



Photo 35 : antibiogramme de *prévotella* sp.

La répartition de *Porphyromonas* sp.,*Prévotella* sp.*etBactéroides* sp. Isolées en cas de parodontite :

Les fréquences des souches isolées chez les sujets présentant des parodontites sont présentées dans la figure suivante **(Voir figure 36).**

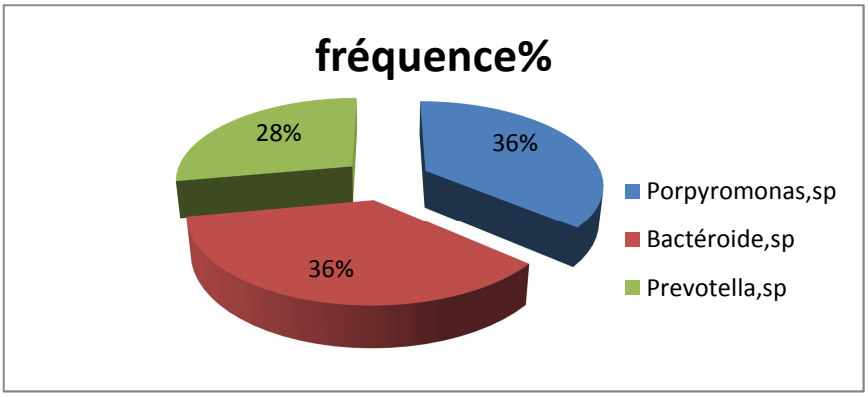


Figure 36 : Répartition des isolats en cas de parodontite

Les résultats ont indiqué que les souches appartenant aux genres *Porphyromonas* et *Bactéroides* sont les plus fréquemment isolées suivies par les souches appartenant au genre Prévotella .

Des études antécédentes ont révélé une prévalence élevée de *Porphyromonas* sp. et d'autres bactéries anaérobies appartenant au phylum du Bacteroides (*Prevotella* sp, *Capnocytophaga*, *et Bacteroides* sp) dans la plaque sous-gingival des sujets malades ayant une parodontite et ils étaient moins fréquents chez les sujets sains (**Keijser et** al., **2008**). En outre, Porphyromonas est fortement corrélé à la parodontite à cause de sa capacité à éluder le système immunitaire de l'hôte sans inhiber l'ensemble des réponses inflammatoires qui vont s'avérer bénéfiques contre les autres bactéries parodonto-pathogènes (**Hajishengallis, 2011).**

2.2. Résultats de l'évaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm :

Les souches *porpyromonas* sp. ,*prevotelle* sp. *et bacteroides* sp. isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former un biofilm par des techniques différentes : méthode de Rouge Congo (RCA) et la méthode des microplaques de titration.

2.2.1. Méthode de microplaques de titration à 96 puits :

Suite aux nombreuses études rapportant l'effet de la composition du milieu de croissance sur La production du biofilm, il nous a semblé utile d'étudier la formation de biofilm par la technique de microplaques de titration décrite précédemment en utilisant le milieu BHIB seul et supplémenté de 2% de saccharose.

Le cristal violet a été utilisé pour colorer le biofilm, et après séchage, le colorant a étésolubilisé avec l'alcool. Et cela conduit à une turbidité homogène du colorant ***(*Stepanovic et *al*., 2000)**

Les différents isolats cliniques ont été divisés en 3 catégories, y compris les non producteurs de biofilm ou **C1**, les modérément producteurs de biofilm ou **C2**, et les fortement producteurs de biofilm ou **C3**. Sachant que :



Figure 37 : la microplaque de titration et le lecteur de microplaque utilisés dans la méthode PMT**.**

2.2.1.1. Les valeurs seuils pour l'essai de bouillon BHIB sans saccharose :

DO_{min}=0.104+(3×0.038)

DO_{min}= 0.22

DO_{max}= 3 × 0.22

DO_{max} = 0.66

Les valeurs inférieure à 0.22 représentent les souches non productrices de biofilm , les valeurs comprises entre 0.22-0.66 ont été associées avec les souches modérément productrices de biofilm et les valeurs DO supérieures à 0.66 correspondent aux souches fortement productrices de biofilm.**(Voir figure 38).**

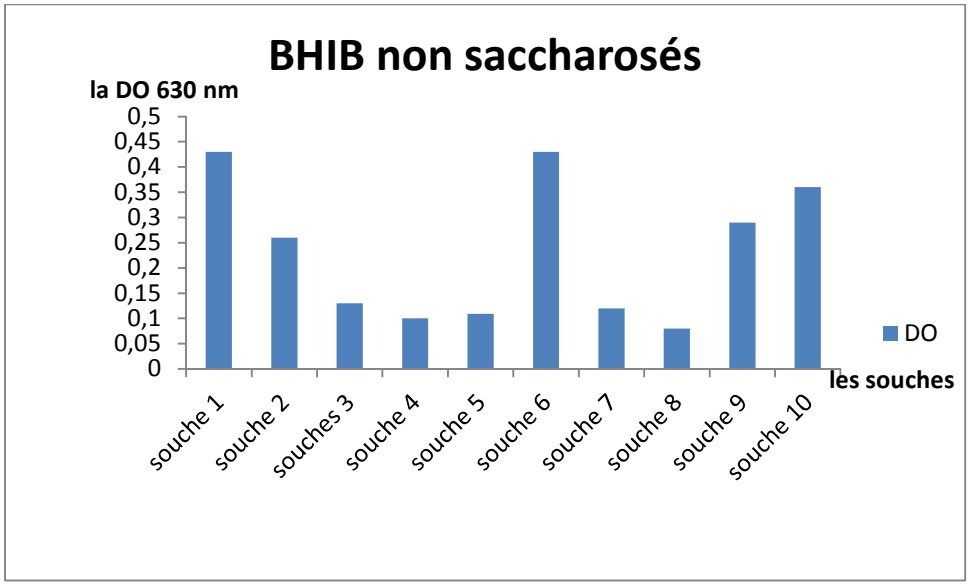


Figure 38 : Répartition des souches selon la production de biofilm sur le milieu BHIB non saccharoses

La détermination quantitative de la formation de biofilm chez toutes nos souches a été réalisée par la technique sur microplaques PMT **:**

L'essai de BHIB non saccharosé a revélé que 40% des souches sont moyennement productrice de biofilm à savoir *Bacteroides* .sp ,*porpyromonas*.sp *et prevotella.* sp *et 60%* des espèces de ces genres n'ont pas la capacité de produire un biofilm .Les résultats obtenus par la technique PMT sont en accord avec les observations d'autres auteurs qui montrent que peu de souches sont formatrices de biofilms dans un milieu de croissance sans supplément (sucre, antibiotiques ou Nacl) **[(Cho *et al*., 2002); (Johannes *et al*., 2002) ; (Mathur *et al*., 2006)**.

2.2.1.2.. Les valeurs seuils pour l'essai de bouillon BHIB additionné de 2% saccharose O

DO_{min}=0.210+ (3×0.054)

DO_{min}= 0.37

DO_{max}= 3 × 0.37

DO_{max} = 1.116

Les valeurs inférieures à 0.37représentent les souches non productrices de biofilm , les valeurs compris entre 0.37-1.16 ont été associées avec les souches modérément productrices de biofilm et les valeurs DO supérieurs à 1.16.correspondent aux souches fortement productrices de biofilm.

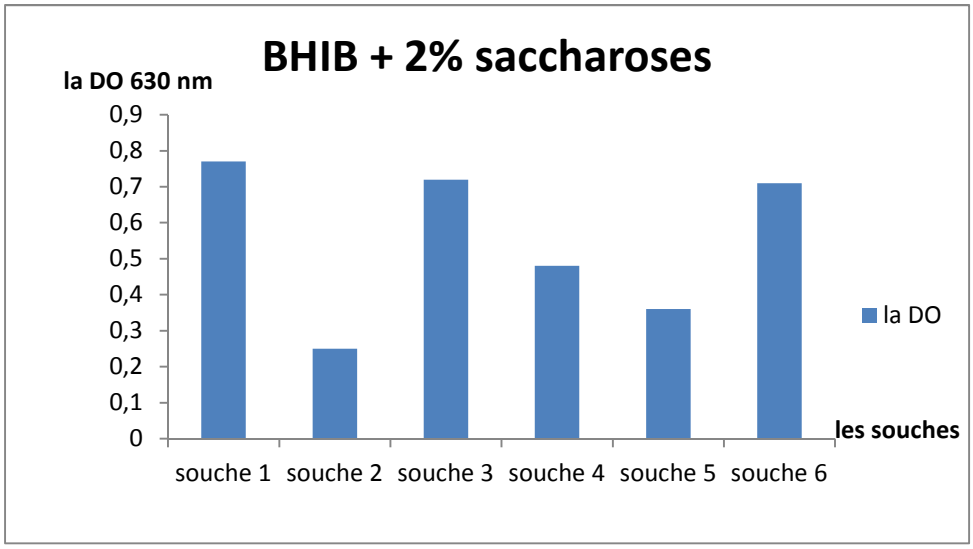


Figure 39 : Répartition des souches selon la production de biofilm sur le milieu BHIB saccharoses

L'essai sur milieu BHIB +2% de saccharose a révélé que 50%(3/6) des *Bacteroides* sp. ,*porpyromonas* sp. *et prevotella* sp. sont fortement productrices de biofilm, *33.33 % (2/6)* des espèces de ces genres sont moyennement productrices de biofilm et 16.67% (1/6) n'ont pas la capacité de produire un biofilm **.**

Pour évaluer l'impact des conditions environnementales sur la formation de biofilm par la méthode PMT nous avons utilisant le milieu de croissance (BHIB) additionné de 2% de saccharose et non additionné de supplément. Il en résulte une augmentation en nombre de souches capables de former un biofilm par la technique PMT avec 30% (3/6) des souches produisant un biofilm en présence d'un de ces suppléments. Par contre la technique PMT de BHIB saccharosé a donné un pourcentage de 40% (4/10) moins que l'essai de BHIB saccharosé. Le saccharose semble stimuler plus la formation du biofilm, l'étude de **Rasha (2012)** et ses collaborateurs ainsi que celle **d'Agarwal, et Jain en 2013** ont montré une augmentation de la production de biofilm par des isolats cliniques lorsqu'ils sont exposés à des concentrations de saccharose différentes.

D'autre part **Vuong et Ottoen., (2002**) expliquent que l'addition de grandes quantités de sucre au milieu de croissance induit un état de stress qui à son tour stimule une fermentation, ce qui augmente la production de PIA et par conséquent la production de biofilm**.** Cette hypothèse pourrait expliquer la formation de biofilm chez les *porphyromoas* sp. ,*bacteroides* sp. *et prevotelle* sp. dans le milieu BHIB saccharosés.

2.2.2. La méthode de culture sur Rouge Congo Agar (RCA)

Les trois souches isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à produire de slime sur milieu rouge Congo, Les souches productrices de slime avaient un phénotype variable ou positif. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure et le tableau suivant :

Tableau 10 : Résultats de la production de slime par la méthode RCA.

Souches	Couleur de colonies	Phénotype (slime)
A2	Noire fort	Positive (+++)
A3	Rouge	Positive (-)
A5	Noire fort	Positive (+++)
A6	Rouge	Négative (-)
A7	Noire	Positive (++)
A8	Noire	Négative (+)
A9	Rouge	Négative (-)
A11	Rouge fort	Négative (- - -)

+Souches moyenne productrices, ++ Souches fortement productrice, – Souches NP .

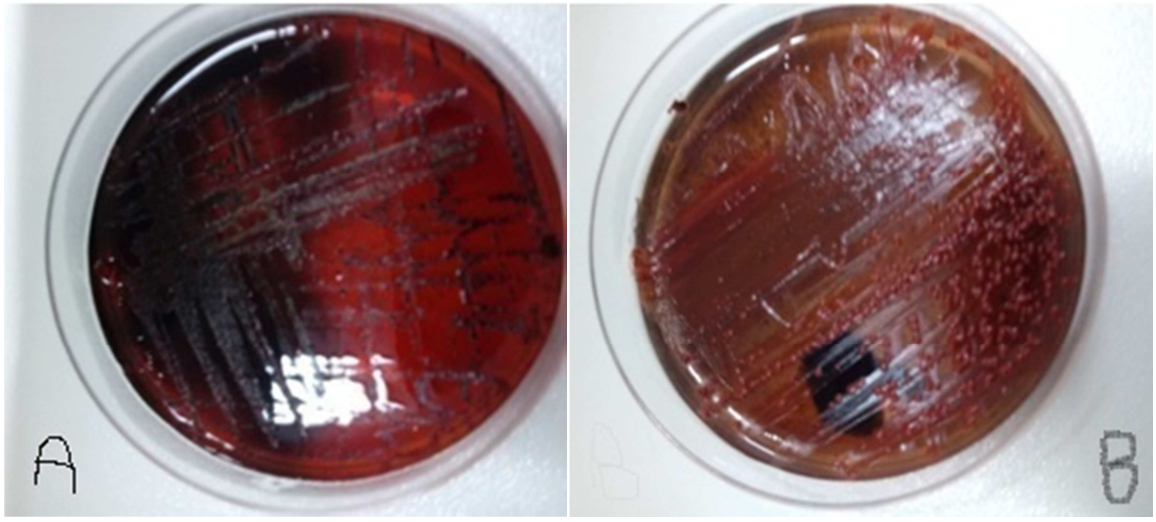


Photo 40: Résultats de formation de biofilm par la méthode de Rouge Congo

A : productrice de biofilm B **:** non productrice de biofilm

Après 48 heures d'incubation, la production de slime est remarquée chez les genres comme suit : Les souches de *prevotella* sp. sont fortement productrice de slim e (colonies de couleur noire foncée). Les souches de *porphyromonas* sp. *et bactéroides* sp. sont moyennement productrices par contre les non productrices donnent des colonies de couleur rouge. Comme la montre la figure suivante :

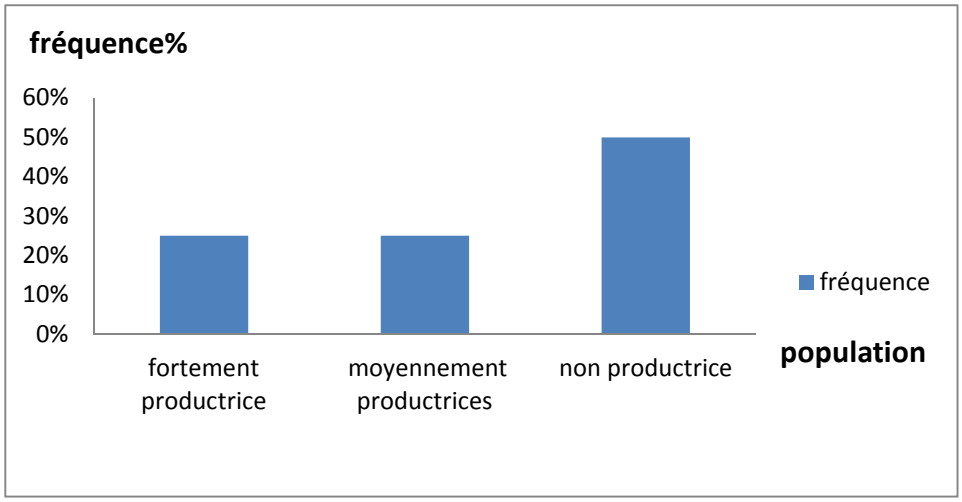


Figure 41: Répartition de la fréquence des souches selon le pouvoir de formation de biofilm par méthode de Rouge Congo.

La recherche de la production de slime sur milieu rouge Congo a révèlé que (25%) des *prevotella* sp. parmi les souches étudiées sont fortement productrices de biofilm ,25% de *porpyromonas* sp. *et bacteroides* sp. sont moyennement productrices de biofilm et 50% des autre espèces sont non productrices de biofilm.

- **Comparaison entre les deux techniques (PMT, et RCA)**

Nous avons étudié l évaluation de formation de biofilm par deux méthodes PMT et RCA pour évaluer l'aptitude de formation de biofilm des souches de *porpyromonas* sp. , *prevotella* .sp. *et bacteroide* sp. et pour estimer la bonne technique de formation de biofilm.

Tableau 11: représente le pourcentage de formation de biofilm par deux méthodes.

Pourcentage de production de biofil	PMT(BHIB nonsaccharosé) N/b: 10	PMT (BHIB saccharosé) N/b : 4	RCA N/b:6
Fort production	0%	50%	25%
Production moyenne	40%	33.33%	25%
Pas de production	60%	16.67%	50%

N /b : nombre des bactéries teste.

Nos résultats ont révélé qu'il n ya aucune corrélation entre les résultats obtenus par les deux techniques , et que le saccharose joue un rôle important dans l'amélioration de pouvoir de formation de biofilm des isolats étudié par technique PMT.

La technique PMT est la plus largement utilisée et est considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm. Cette méthode a été rapportée comme étant la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la formation de biofilm Elle permet une détermination quantitative pour comparer l'adhésion des différentes souches et aussi examiner un grand nombre d'isolats simultanément **(Rasha*et al* ., 2012).**

Enfin, la détection précoce de formation de biofilm chez les souches *porphyromonas* sp. , *prevotella* sp. *et bactéroides* sp. en pratique peut être l'une des étapes essentielles pour la prévention et la gestion des infections causées par ces pathogènes .La lutte efficace contre les biofilms nécessite la connaissance approfondie possible des mécanismes de leur formation rendue abordable par l'utilisation des méthodes fiable.

Conclusion :

La flore bucco-dentaire varie dans le temps et d'un site à l'autre chez le même individu et constitue ce qu'on appelle le biofilm dentaire qui assure la croissance de nombreuses populations qui y trouvent l'entraide nécessaire et les conditions écologiques.

L'étiologie de la maladie parodontale est bactérienne, et plus précisément poly bactérienne. Ces bactéries sont regroupées au sein du biofilm dentaire sous-gingivale qui est une partie intégrante de l'écosystème parodontal. La parodontite résulte d'un déséquilibre de cet écosystème. Les bactéries du biofilm sont regroupées en complexes dont la présence est plus ou moins corrélée à la santé ou à la maladie. Les bactéries les plus associées à la parodontite sont celles du complexe rouge et orange c'est-à-dire *porphyromonas* sp. *,prevotelle* sp.
Et bacteroides sp.. Ces microorganismes sont des bacilles à Gram - anaérobie stricte possédant de nombreux facteurs de virulence

De nombreuses méthodes de caractérisation de la flore sous-gingivale ont été mise au point au fil du temps dont la culture reste une méthode de référence. L'identification des complexes bactériens de la plaque sous-gingivale montre la prédominance des souches de *porphyromonas sp.,prevotelle sp.et bacteoidessp.* chez les sujets atteints de parodontite par rapport ceux qui sont indemnes de parodontite.

A titre statistique, la parodontite semble être liée à l'âge et au sexe,les données des fiches de questionnaire ont révélé la prédominance de parodontite chez les sujets de sexe féminin âgés de 27 ans. De plus, le manque d'hygiène bucco-dentaire favorise l'accumulation des bactéries de la plaque sous gingivale.

L'étude de l'aptitude de formation de biofilm par les deux méthodes (méthode PMT en présence et en absence de saccharose et la méthode RCA) montre que le pourcentage des souches productrices de biofilm par la méthode (PMT) en présence de BHIB saccharosé est plus élevé que la méthode de RCA et la méthode PMT absences de saccharose.

Ces résultats confirment l'effet de saccharose dans l'amélioration de la capacité de formation de biofilm ainsi que la fiabilité de la technique (PMT) et par rapport à la méthode RCA.

Conclusion

L’identification des complexe bactéries à l’origine de parodontite est devenue un nouvel enjeu. Elle permettrait non seulement de mieux comprendre l'étiopathogénie, mais essentiellement de proposer de nouvelles perspectives thérapeutiques afin de prévenir la pathologie, de rationaliser les traitements, et d'éviter les récidives.

A

- **Afssaps** (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé).Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie, Juillet 2001, http /afssaps.sante.fr.
- **Al-Ahmad.A., Ameen.H., Pelz.K., Karygianni.L., Wittmer A.,** Anderson A.C., Spitzm€uller B. et Hellwig E., 2014. Antibiotic Resistance and Capacity for Biofilm Formation of Different Bacteria Isolated from Endodontic Infections Associated with Root-filled Teeth. J Endod., 40: 223–230.

- **Albandar, J. M., et Rams, E. T.** Risk factors for periodontitis in children and young persons. *Periodontol. 2000*-2002.

- **ALBERT, Olivier.** *Conseils à l'officine dans le domaine de l'hygiène buccodentaire.* Thèse pour le diplôme d'état de Docteur en Pharmacie. Toulouse : Université Paul Sabatier, 1994.

- **Allen S., Washington C., Winn Jr., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger B., and Woods G. (2006).** Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 6ème édition: 644.

- **Annous, B., Fratamico, P. and Smith, J. L**. **(2009), —**Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do‖, *Journal of Food Science*, Vol. 74 No. 1, pp. 24–37.

B

- **Barboni, S.** Données actuelles sur la composition du tartre et ses implications biologiques. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire, faculté de chirurgie dentaire : Université Henry Poincare-Nancy 1, 2004, p 2-3.
- **Behlou.I et Gilmore MS.(2008).**Microbiol biofilms in ophthalmologie and infectious diseases.Arch Ophthalmol 126,1572-1581.
- **Bellifa, 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.

- **Beloin.C ., Roux.A ., Svanborg.C.(2005)** .Escherichia coli, biofilms.Curr Top Microbiol Immunol 322,249-289.
- **Benoist Christophe, Ann E Herman, Gordon J Freeman, Diane Mathis, 2004** Journal of Experimental Médicine 199 (11),1479-1489.
- **Bercey., Tenembaum.** Parodontologie de diagnostic à la pratique. Bruxelles : De Boeck Supérieur, 1996, p 50- 97-98-107-108-128-195 -197-199-200.
- **Berger, L.** Le biofilm bactérien endodontique. Thèse pour le diplôme d'etat de docteur en chirurgie dentaire, faculté de chirurgie dentaire : Université Henry Poincare-Nancy 1, 2010, p21-22-42.
- **Boschin.F., Boutigny.H., et Delcourt-Debuyne.E.** Maladies gingivales induites par la plaque. Encyclopédie Médico-chirurgicale 23-440-A-107. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier .2004. **(33)**
- **Bouchard P.** Parodontologie et dentisterie implantaire, volume 1: medecine parodontale. Paris: Lavoisier; 2015**.**
- **Burnichon.N., Texier.A. (2003).** L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques.

C

- **Calas-Bennasar I., Bousquet p. Jame O., et coll.** Examen clinique des parodontites. Odontologie. Elsevier, 2005.
- **CA-SFM, 2015.** comite de l'antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. recommandations 2015 (édition de janvier 2015).
- **Castro Melo P., Ferreira L .M., Filho.A., N., Zafalon L. F., Godoy Vicente H .I., de Souza V.(2013).** Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis.*Brazilian journal of microbiology.*44 (1): 1517-8382
- **Cavézian R., Pasquet G., Bel G. et Baller G., 2006.** Imagerie dento-maxillaire, approche radioclinique. Elsevier Masson, Paris, 3e édition.
- **Chaieb K., Mandouani K., Bakhrouf A. (2005**). Detection of icaA and icaD loci by Polymerase chain reaction and biofilm formation by Staphylococcus epidermidis isolated from dialysate and needlesin à dialysis unit, Journal of Hospital Infection, (61) 225-230.

- **Chardin.H, Barsotti.O ,Bonnaure-Mallet.M** .Microbiologie en odontosmatologie paris :maloine ,2006,p 141-144-269-270-271-274-305-308-311-312.
- **Charon J et al.** Parodontie médicale, innovations cliniques. Reuil-Malmaison :
- **Cho S., Naber K., Hacker J., Ziebuhr W. (2002).** Detection of the *ica ADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 19:570-/575.

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

- **Costalonga M, Herzberg mark C.** the oral microbiome and the immunobioogy of periodontal disease and caries. October. 2008;141(4):520–9.

D

- **Daep C.A., Lamont R.J. et Demuth D.R., 2010.** Interaction of Porphyromonas gingivalis with Oral Streptococci Requires a Motif that Resembles the Eukaryotic Nuclear Receptor Box Protein-Protein Interaction Domain. Infection and Immunity, 76(7): 3273-3280.

- **Danielle Roquier Charles, Monique Seiller.** *Hygiène et soins bucco dentaires. Prévention et traitement des affections courantes.* Pharmathèmes édition-communication santé, 2005, 63 p.
- **Darveau R, Tanner A** et **Page R.** the microbial challenge in periodontitis, periodontal2000 1997 ; 14 :12-32.
- **Devals, Anne.** *Le conseil du pharmacien d'officine dans le domaine bucco dentaire.* Thèse pour le diplome d'état de Docteur en Pharmacie. Toulouse : Université Paul Sabatier, 2003.
- **Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002)**. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Applied And Environnemental Microbiology; Vol. 68, No. 6 : 2950– 2958

- **Dubreuil L., 2006.** Bactéries anaérobies à Gram positif. (EMC Elsevier Masson, SAS Paris), biologie médicale, 90-05-00-45

- **Dufour,T .,Svoboda,J-M** .,**Askainen S., Jousmes-Omer.H** the earlycolonisation of gram negative anaerobic bacteriai in edentulous infants Oral microbiol Immunol 1992 ;7(2) :2B-311.)
- **Dufour, T., Svoboda, J-M**. Pathogénie bactérienne des parodontolyses. Elsevier SAS, 2005, p 6-7..Our le diplôme d'état de docteur en chirurgie dentaire ,faculté de chirurgie dentaire :Université Henry Poincare-Nancy 1,2010,p21-42.6.

- **Dujardin, S.** Données récentes sur la réaction inflammatoire.Le fil dentaire. N°58.Octobre, 2010, p57.

E

- **Elyajouri A. (2012).**Actualités des infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Thèse de doctorat. Université Mohammed V- Souissi faculté de médecine et de pharmacie –

- **Espinasse,f., Page,B. & Cottard-Bouelle,B.(2010).**Risques infectiaux associés aux dispositifs médicaux invasifs. Revue Francophone des Laboratoires 426,51-63..

- **Expertise-collective, INSERM. (1999).** Rapport : Maladies Parodontales Thérapeutiques et prévention.

F

- **Filloux, A. et Vallet, I.(2003**).risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.Med Sci (Paris) 19, 77-83.
- **Flemming TF.** Periodontitis, Ann Periodontol1999 ; 4 :32-37.
- **Folkesson, A., Haagensen, J. A. J., Zampaloni, C., Sternberg, C. and Molin, S. (2008).** Biofilm induced tolerance towards antimicrobial peptides‖, *Public Library of Science*, Vol. 3 No. 4, pp. 1-11
- **Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989.** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol., 42:872–874.

G

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

H

- **Hallett K.B. et O'Rourke P.K., 2002.** Early childhood caries and infant feeding practice. Community Dent Health .,19:237-242
- **Haraldsson G., 2005.** Oral commensal Prevotella species and Fusobacterium nucleatum: Identification and potential pathogenic role. (Academic Dissertation) University of Helsinki, Finland.
- **Henri Michel Benoist, H. M. B.** Caracteristiques cliniques et facteurs de risque des parodontites agressives (dakar –sénégal) these pour Obtenir le grade de docteur es sciences odontologiques Universite cheikh anta diop de dakar. 23 janvier 2004. **(23)**

- **Herbert F, Wolf., Edith, M., Klaus, H Rateitschak**. Parodontologie, 3eme édition. [s.I] : Elsevier Masson, 2004, p 30-145-146-147-150-151-152-153-244-246-247-292-293.
- **Høiby,N., Ciofu,O., Johansen,H.K., Song,Z.J., Moser,C., Jensen, P. and Bjarnsholt,T. (2011),—**The clinical impact of bacterial biofilms, *International Journal of Oral Sciences*, Vol. 3 No. 2, pp. 55-65.
- **Hou W., Sun X., Wang Z. et *al*.**, (2012), Investigative Ophthalmology& Visual Science, the Association for Research in Vision and Ophthalmology. (53) : 9. 5624.5631.

  ISBN : 978- 2 -84444-558 -2.

  ISBN : 978-27440-7209-3.

I

- **Imamurat**. The role of gingipains in the is of periodontitisis of periodontal disease .J Periodontal 2003 ; 74(1) :111-8

J

- **Jacobsen,S.M., Stickler,D.J.Mobley,M.L.& shitiliff,M.E.(2008).**Complicated Catheterassocited urinary tract infectious due to Echerichia coli and Proteus mirabilis.Clin Microbiol Rev 21,26-59.
- **Jain. A ., Marsili .E. and Bhosle, N. B. (2011), —**The Biofilm Returns: Microbial Life at the Interface‖, *Microbes and Microbial Technology*, Springer, New York, pp. 59-85

- **Joffin. J. N., Leyral G. (2006**). Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques, 4e édition.
- **Joshi, P., Wadhwani, T., Bahaley, P. and Kothari, V. (2010), ―**Microbial Chit-Chat: Quorum Sensing‖, *The IUP Journal of Life Sciences*. Vol. 4 No. 1, pp. 59-72

K

- **Kang M.S., Oh J.S., Lee H.C., Lim H.S., Lee S.W., Yang K.H., Choi N.K., Kim S.M.,2011.** Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri*on periodontopathic and cariogenic bacteria.J.Microbiol., 49: 193–199.

- **Kang M.S., Oh J.S., Lee H.C., Lim H.S., Lee S.W., Yang K.H., Choi N.K., Kim S.M.,2011.** Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri*on periodontopathic and cariogenic bacteria.J.Microbiol., 49: 193–199.

- **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.

- **Kudva P, Tabasum ST, Sharma S, Gupta S.**Role of Saliva as a Diagnostic Tool in Periodontal Disease. Arch Dent Sci Orig Res 2010; 1:16-20
- **Kuffer, R., et Lombardi, T.** La muqueuse buccale de la clinique au traitement *Edition Med'com, Paris:* 2009**.**

L

- **Laffargue, P., Soliveres, S., Challot, E., Jame, F., Gibert, P.** Détartrage et surfaçage radiculaire. Encyclopédie Médico-chirurgicale 23-445-E-12 Elsevier SAS, 2003, p 1-2.
- **Leyral G., and Vierling E .(2007).** Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques. Wolters Kluwer ,France.

- **Löe H, E Theilade**. Experimental Gingivitis in Man. J Periodontol 1965; 36: 177-87.

- **Li C. et Yu-mei W., 2011.** The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies.Int J Oral Sci., 3: 66-73.

- **Loomer PM.** Microbiological diagnostic testing In the treatment of periodontal diseases. *Periodontology 2000* 34, 49-56 (2004).

- **Lorimier.S., P. Kemoun.** "Histophysiologie du parodonte". Article 28-115-P-10. *EMC médecine buccale*, Elsevier Masson SAS, décembre 2012. Vol. 7, N6, pp. 1-23.

M

- **Mahejabeen R., Sudha P., Kulkarni S.S. et Anegundi R., 2006.** Dental caries prevalence among preschool children of Hubli: Dharwad city. J Indian Soc Pedod Prev Dent ., 24:19-22.

- **Mary BATH-BALOGH, Margaret J.FEHRENBACH**. *Illustrated dental embryology, histology and anatomy Third edition.* s.l. : Saunders, an imprint of Elsevier Inc, 2011, 2006, 1997
- **Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T. et Rattan A., 2006.** Detection Of Biofilm Formation Among The Clinical Isolates Of Staphylococci: An Evaluation Of Three Different Screening Methods. Indian J. Med. Microbiol., 24(1):25-29.

- **Mattout P et Mattout C.** Les thérapeutiques parodontales et implantaires.Paris: Quintessence international; 2003:85-91
- **Mégraud F. (1994)**. Méthodes diagnostiques directes et indirectes de *Helicobacter pylori*. Gastroenterol. Clin. Bio. 18 :217-222.

- **Meurman J.H., Kari K., Waltimo T., Kotinanta A., Keri J., Le S. (2006).** In vitro antifungal effect of amine fluoride – Stannousfluoride combination on oral *Candida albicans* specices. Oral diseases ; 12: 45-50.
- **Minnig P.,2005.** CARIES : PREVENTION SSP–SGP, paediatrica, 12(2).

- **Muller M., Lupi L., Medioni E. et Bolla M., 1997.** Epidemiolologie de la carie dentaire .Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Elsevier, Paris), Odontologie, 23 010-A-20, 8 p.

- **Musk D.J., Banko D.A., and Hergenrother P.J. (2005)**. Iron salts perturb biofilm formation and disrupt existing biofilms of *Pseudomonas aeruginosa.* Chemistry & Biology; Vol. 12: 789– 796.

N

- **Nadkarni M. A., Caldon C. E., Chhour K. L., Fisher I. P., Martin F. E., Jacques N. A. et *al.*, 2004.** Carious dentine provides a habitat for a complex array of novel Prevotella-like bacteria. *J. Clin. Microbiol*., 42, 5238–5244.

- **Niu C. et Gilbert E.S., 2004.** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Appl Environ Microbiol., 70: 6951–6956.
- **Noiri Y., Li L. et Ebisu S., 2001.** The localization of periodontal-disease-associated bacteria .

O

- **OMS, 1987.** L'examen clinique de chacun de ces sujets a été effectué par un médecin dentiste qui applique les recommandations de l'organisation mondiale de santé.
- **Ouhayoun, J-P.** Le traitement parodontal en omnipratique. Quintessence international, 2012, p 38-77-122.

P

- **Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley Jr. F.L., Mowat E., Ramage G. et Lopez-Ribot J.L., 2008.** A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. Nat Protoc., 3: 1494–1500

- **Pierrard L, Braux J, Chatté F, Jourdain M, Svoboda J**. Étiopathogénie des maladies parodontales. 2015;10(15):1–9.
- **Pratibha P.K., Bhat K.M. et Bhat G.S., 2006.** Oral Malodor: A Review of the Literature. Source: Journal of Dental Hygiene, 80(3).

- **Pratt L.A. et Kolter R., 1998.** Genetic analysis of Escherichia coli biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Molecular Microbiology, 30 : 285– 293.
- **Preza D., Olsen I., Aas J.A., Willumsen T., Grinde B. et Paster B.J., 2008.** Bacterial profiles of root caries in elderly patients. J.Clin.Microbiol., 46(6): 2015 2021.

- **Politis, R., Badawi, N. (2010)** La parodontite agressive et sa prévalence *Editions. Article scientifique, IAJD* Vol. 1 - Issue 1. **(29)**

R

- **Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012)**.Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci. *Egyptian Journal of Medica. Human and Genetic* .13: 269–2
- **Rozkiewicz D., Daniluk T., Zaremba M.L., Cylwik-Rokicka D., Luczaj-Cepowicz E., Milewska R., Marczuk-Kolada G. et Stokowska W., 2006.** Bacterial composition in the supragingival plaques of children with and without dental caries. Adv Med Sci., 51(1):182-6.

S

- **Sansone C., van Houte J., Joshipura K., Kent R. et Margolis H.C., 1993.** The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. J Dent Res ., 72:508 -516.

- **Shang X.H, LI D.L., Huang Y., Chen H. et Sun R.P. , 2008.** Prevalence of dental caries among preschool children in Shanghe County of Shandong Province and relevant prevention and treatment strategies Chin Med J ., 121(22):2246- 2249.

- **Siboukeur A. (2011).** Etude de l'activité antibactérienne des bactériocines (type nisine) produites par *Lactococcus lactis sub sp lactis*, isolée à partir du lait camelin. Mémoire de magister d'Université d'Ouargla: 25, 30, 31.

- **Sixou M., DiRienzo J.M., Slots J., Sixou M., Sol M.A., Harmon R., McKay T. (1994).** Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with localized juvenile periodontitis. Infection and Immunity, 62 (8) : 3058 - 3065.
- **Socransky S.S. et Haffajee A.D., 2005.** Periodontal microbial ecology.Periodontol., 38:135- 187

- **Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. et Svabic-Vlahovic M., 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods, 40: 175–179
- **Struillou x.** Classification des maladies parodontales ,JParodontol Implantol Oral 2003 ; 22:23-28.
- **Sufia S., Chaudhry S., Izhar F., Syed A., Mirza B.A., Khan A.A., 2011.** Dental caries experience in preschool children: is it related to a child's place of residence and family income? Oral Health Prev Dent ., 9(4):375–379 .

T

- **Taba Jr M, Souza SLS de, Mariguela VC.** Periodontal disease: a genetic perspective. Braz Oral Res. janv 2012;26(SPE1):32-38.

- **Tabak S., Bensoltane A. (2012)**. L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus, Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis-à- vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales. Nature & technologie, N° 06 : 71-73.
- **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.

- **Talaro, Kathleen, Park (2008**), *Foundation in Microbiology: Basic Principles*, McGraw-Hill, New York
- **Tanner A. C. R., Mathney J. M. J., Kent R. L. , Chalmers N. I., Hughes C. V., Loo C. Y., Pradhan N., Kanasi E., Hwang J., Dahlan M. A., Papadopolou E. et**

Dewhirst F. E., 2011. Cultivable Anaerobic Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol.*, 49(4) : 1464-1474.

- **Tenke,P .Kovacs,B .,Jackel,M.& Nagy,E.(2006).**The role of biofilm infection in urology.World J Urol 24,13-20.
- **Tenenbaum, H .**pathologie générale et parodonte. Encycl MédChir. Paris :Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS,2003.23-447-A-10**.**
- **Tenenbaum P. ,Bercy H.** Parodontologie du diagnostic à la pratique.s .l. :De Boeck,2003.
- **O'Toole G.A., Kolter R., 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary fo Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Mol Microbiol., 30:295-304.
- **Tonetti MS et Mombelli A**.Early-onset periodontitis ,ann periodontol 1999 ;4 :39-52.
- **Trautner,B.W.& Darouiche,R.O.(2004).**catheter-associated infection.pathogenesis affects prevention.Arch Intern Med 164-842-850.

V

- **Vernerc,Lemaitrep, Daniela et Coll . carpegen** real –time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathgen identification Oral Microbiol 1979 ; 10 :844-84
- **Verner c, LEMAITER P,DANIL A et coll.** Carpegen real-time polymerase chain reaction vs.anaerobic culture for periodontol pathogen identification.Oral Microbiol Immunol 2006 ;21 :341-346.
- **Verner C, 2007** utilisation des prelevements bacteriens lors de la prise en charge des maladies parodontales these pour le doctorat d'université nature ,2007
- **Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J. and Ivanova, E. P. (2009), —**Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation‖, *Molecules*, Vol. 14 No. 7, pp. 2535-2554.
- **Vuong C, Otto M. (2002).** Staphylococcus epidermidis infections. *Microbiology and Infectiology*. 4:481-489. 74.

W

- **WoelfeL.JB ., R.C. Scheid.RC,** *Anatomie dentaire, Application à la pratique de la chirurgie dentaire.* Paris : Maloine, 2007.

- **Wolf,HF 2005.**Parodontologie Paris : Masson ,2005.

- **Wiebe SH, Hafezi M, Sandhu HS, Sims SM, Dixon SJ**. Osteoclast activation in inflammatory periodontal diseases. Oral Dis. 1996; 2(2):167-80.

Y

Yannick D.N., Skander T., Mario Jacques H. (2014). Les biofilms bactériens : leurimportance en santé animale et en santé publique. Can. J. Veterinary. Res. **78**:110-11.

Z

- **Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J., 2001.** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. Methods in Enzymology, 336: 195-203.
- **Zijnge V., Ammann T., Thurnheer T. et Gmür R.,2012.** Subgingival biofilm structure. Front Oral Biol., 15:1-16.

ANNEXE 01 :

Fiche de questionnaire

Nom et prénom……

Date de naissance……. Lieu……

Adresse……

……..

Sexe mme me

Professions……

Conditions socioéconomiques…….

Le motif de la consultation

Soins ntrôle

Fréquence de brossage des dents

-Régulière

1fois fois 3 fois

-Irrégulière

Nettoyage inter dentaire :

Soie dentaire(s) Cure-dent(cd) brosse inter-d

Combinaison (s+cd) en utilisé

Type de dentifrice :

Marque……..

Non fluorée florée

Régime alimentaire glucidique

Oui on

Grignotage entre les repas

Oui ☐ Non ☐

Tabagisme et alcoolisme

Oui ☐ Non ☐

Présence de mauvaise haleine

Oui ☐ Non ☐

Saignement de la gencive lors du brossage des dents

Oui ☐ Non ☐

Douleurs des dents

Oui ☐ Non ☐

Hygiènes

Acceptable ☐ on acceptable ☐

Nombre de dents

Dents Cariées ☐

Dents Absentes ☐

Dents Obturées ☐

Indice CAO =

Douleur lors de la mastication

Oui ☐ Non ☐

Date de prélèvement : / /

Signature

ANNEXE :2 LES composition des différents milieu utilisées :

Composition du milieu de culture BHIB :

Pour 1000ml de l'eau distille :

- Beef heart infusion frome…… . ……..250 mg/l
- Calf brain infusion frome……. ……..200 mg/l
- Proteose peptone……. ……10 mg/l
- Sodium chloride…… ……..5mg/l
- Di-sodium phosphate…… …….2.5 mg/l
- Dextrose…… ……..2 mg/l
- Ph…… …… 7.4+0.2 at 25C°

Composition du milieu Columbia au sang

- Polypeptones ……..17,0 g /L
- Peptone pancréatique de cœur ……*3,0 g/L*
- Amidon de maïs …… ……*1,0 g/L*
- Chlorure de sodium ……*5,0 g/L*
- Extrait de levure ……*3,0 g/L*
- Agar ……..*13,5 g/L*
- pH……. ……*7,3* +/- 0,2

Préparation gélose Columbia au sang :

1. Liquéfier la base au bain-marie bouillant.

2. Attendre son refroidissement à 45°C (milieu en surfusion). 3. Y ajouter stérilement, à l'aide d'une seringue 5%, la quantité de sang nécessaire pour obtenir une concentration finale en sang de 5%.

Le sang□ ne doit pas être sorti au dernier moment du réfrigérateur, sinon il y a prise en masse du milieu au moment de l'addition du sang. 4. Homogénéiser en faisant rouler le tube entre les mains, en évitant la formation de bulles. 5. Couler en boîte de Pétri en évitant la formation de bulles.

Composition de milieu Rouge Congo

Dans 500 ml d'eau distillé

BHIB…….....18.5g

Rouge Congo…….. ……..0.4 g

Saccharose……...25 g

Aga……5 g

Composition du milieu de dilution PBS :

- Pour 500 ml de l'eau distillée :
- NaCl……..4 g
- KCl…….0,1 g
- Ma2HPO4…….0, 7 g

KH2PO4……..0,1g.

ANEXEXE 03 : Préparation des réactifs de coloration de gram :

1. Violet de gentiane – adaptation de Hucker

Solution A :

-Violet de gentiane 2 g

-Alcool à 95° 20 ml

Solution B :

-Oxalate d'ammonium : 0,8 g

-Eau distillée 80 ml

Mélanger les solutions A et B,

Laisser reposer 24 heures avant l'emploi,

Verser à travers un papier filtre dans un flacon.

2. Solution iodée de gram

-Iode 1 g

-Iodure de potassium 2 g

-Eau distillée 300 ml

Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans environ 30 ml d'eau distillée,

Ajouter l'iode et mélanger jusqu'à dissolution.

Ajouter le reste d'eau distillée, mélanger.

Conserver dans un flacon en verre brun ou en plastique opaque (à l'abri de la lumière).

3. Solution de safranine

Solution A :

-Safranine O 2,5 g

-Alcool à 95° qsp 100 ml

Solution A bis :

- Solution A 10 ml
- Eau distillée 90 ml

4. Décolorant

-Mélanger à parties égale alcool à 95 ° et acétone.

ANNEXE 04 : tableau représente les paramètres de fiches question chez les deux populations

Les paramètres de fiche questionnaire	Les sujets indemnes des lésions parodontales	Les sujets ayant des lésions parodontales
-1. La tranche d'âge		
23-25	3	4
25-27	3	6
27-29	4	10
29-31	5	0
-2.le sexe		
Femme	9	11
Homme	6	9
-3.fréquence de brossage les dents		
Irrégulière	2	10
1 fois	6	2
2 fois	2	4
3 fois	5	4
-4.saignement de la gencive	10	25
-5.le présence de mauvaise haleine	11	22
-6.tabagisme et alcoolisme	25	10

Annexe 05 : Matériels et méthode



Etuve



Vortex



Spectrophotomètre



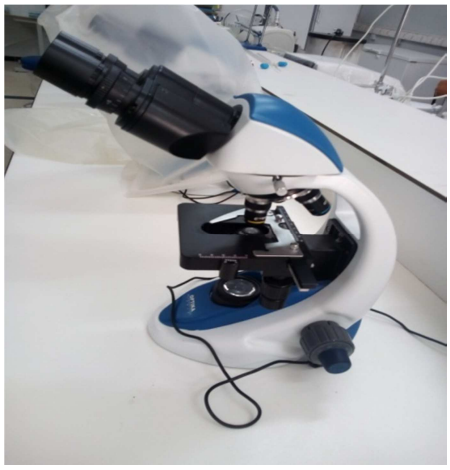
Autoclave



Balance de précision



Plaque chauffant



Microscope



Bec benzène