

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة أبو بكر بلقايد – تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEN

كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de BIOLOGIE

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



MÉMOIRE

Présenté par

Zidani Bouchra

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En sciences biologiques, **Option : Biochimie**

Thème

Contribution à l'étude des bactéries à Gram positif isolées de la cavité buccale des enfants sains dans la région de Tlemcen

Soutenu le 26/06/2023, devant le jury composé de :

Président	Mme Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	M. Seghir Abdelfettah	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme Baba Ahmed-Kazi Tani Zahira Zakia	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux:

*"Louange à Allah à qui appartient tout ce qui est dans les
cieux et tout ce qui est sur la terre. Et louange à lui dans l'au-delà. Et c'est lui le Sage, le Parfaitement
Connaisseur"*

*Seigneur, accorde ta prière, ta paix et tes bénédictions, à
notre Prophète Mouhammad, ainsi qu'à sa famille et ses
compagnons, une prière et une paix permanentes*

ملخص :

يمثل تجويف الفم مقرا للعلاقات الحيوية المعقدة، حيث يضم آلاف أنواع البكتيريا. تعد هذه الكائنات الدقيقة مسؤولة عن انواع مختلفة من امراض الفم بالأخص تسوس الأسنان عند الأطفال الذي يحدث عادة بسبب *Staphylococcus* التي تصبح انتهازية عند حدوث اضطراب في التوازن الجرثومي. الهدف من هذه الدراسة هو معرفة أصناف البكتيريا موجبة الجرام في تجويف الفم ودراسة مدى حساسيتها للمضادات الحيوية المختلفة. ومعرفة قدرتها على تكوين الأغشية الحيوية في المختبر. تم جمع العينات خلال الفترة الممتدة من فبراير إلى أبريل 2023 من أطفال اصحاء في تلمسان تتراوح اعمارهم بين السنة و16سنة.

اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أنه من بين 12 عينة، 83% منها احتوت على بكتيريا، تتوزع بين (*Staphylococcus spp* (50%) و *Staphylococcus aureus* (50%)

من عوامل تسوس الاسنان العمر وإهمال الاعتناء بهم و خاصة عند فئة الذكور. كما بينت اختبارات الحساسية للمضادات الحيوية على هذه الكائنات الدقيقة بأن أغلبية السلالات كانت حساسة لها. بالإضافة الى ان جميع *Staphylococcus* المعزولة لها القدرة على تكوين أغشية حيوية بدرجات متفاوتة. حيث أن كميتها وبناءها يتغير حسب السلالة والصنف.

الكلمات الرئيسية: تجويف الفم، عدوى الفم، مضاد حيوي، *Staphylococcus* غشاء حيوي.

Résumé :

La cavité buccale est le siège d'un écosystème très complexe. Elle abrite plus d'un millier d'espèces bactériennes différentes. Plusieurs de ces microorganismes sont responsables de divers types de pathologies buccodentaires, en particulier les caries dentaires, qui sont extrêmement fréquentes chez les enfants. Elles sont généralement dues à la prolifération des *Staphylococcus* qui peuvent devenir opportunistes lors d'une perturbation de l'équilibre microbien. L'objectif de la présente étude est d'établir l'épidémiologie des bactéries gram positives dans la cavité buccale, d'étudier leur sensibilité aux différents antibiotiques et de tester leur pouvoir de formation de biofilms bactériens *in vitro*. Les prélèvements ont été effectués pendant trois mois, de février à avril 2023, sur des enfants sains âgés de 1 à 16 ans à Tlemcen.

Les résultats obtenus ont montré que parmi les 12 prélèvements effectués, 83 % sont altérés par les bactéries, principalement *Staphylococcus aureus* (50 %) et *Staphylococcus spp* (50 %). Le sexe masculin, l'âge et la mauvaise hygiène sont les facteurs de risque favorisant la carie dentaire.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques appliqués à ces microorganismes ont montré que la plupart des souches sont sensibles aux antibiotiques utilisés. De plus, toutes les souches de *Staphylococcus* isolées étaient formatrices de biofilm à des degrés différents. Cependant, cette biomasse formée variait d'une espèce à une autre ainsi qu'entre les souches de la même espèce.

Mots-clés : Cavité buccale, infection buccodentaire, *Staphylococcus*, antibiotique, biofilm.

Abstract:

The oral cavity is the seat of a very complex ecosystem. It is home to over a thousand different bacterial species. Lot of these microorganisms are responsible for various types of oral pathologies especially dental caries, which are extremely common in children. They are generally due to the proliferation of *Staphylococcus* which can become opportunistic during a disturbance of the microbial balance. The objective of this study is to establish the epidemiology of gram-positive bacteria in the oral cavity and to study their sensitivity to different antibiotics and test their ability to form bacterial biofilms *in vitro*. Samples were taken for three months from February to April 2023 on healthy children aged 1 to 16 in Tlemcen.

The results obtained showed that between the 12 samples taken, 83% were altered by bacteria, mainly *Staphylococcus aureus* (50%) and *Staphylococcus spp* (50%). Male sex, age and poor hygiene are the risk factors that promote tooth decay.

Antibiotic sensitivity tests applied to these microorganisms have shown that most strains are sensitive to the antibiotics used. In addition, all isolated *Staphylococcus* were biofilm formators to varying degrees. However, this formed biomass varied from one species to another as well between strains of the same species.

Keywords: Oral cavity, oral infection, *Staphylococcus*, antibiotic, biofilm.

Dédicaces

C'est avec un énorme plaisir et une immense joie que je dédie mon travail

À mes très chers parents qui m'ont soutenue tout au long de ma vie.

Mes parents, Si je suis là aujourd'hui, c'est grâce à vous ! Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

À mon cher fiancé,

À mes deux très chers frères et ma sœur,

À mes grands-mères et mon grand-père,

À mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses, à mes chers cousins et cousines,

À tous les membres de ma grande famille et ma belle-famille,

À toutes mes amies.

Zidani Bouchra

Remerciements

La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude :

Monsieur Seghir Abdelfettah, Maître de conférences de classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté de diriger ce travail et pour son aide précieuse.

Madame Boucherit-Otmani Zahia, Professeur au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma soutenance et pour l'ensemble des enseignements.

Madame Baba Ahmed-Kazi Tani Zahira Zakia, Maître de conférences de classe A au département de Biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr Belkaïd Tlemcen, pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mademoiselle Lakhel Hafsa, doctorante en biochimie, pour son aide et ses encouragements.

À l'ensemble du personnel du laboratoire "Antibiotiques Antifongiques: Physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab)".

À tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour la réalisation de ce travail

Sommaire

Première partie : Synthèse bibliographique.....	2
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	7
1. Prélèvements	7
1.1.Le questionnaire.....	7
1.2.Protocol.....	7
2. Isolement et purification.....	7
3. Identification des souches.....	8
3.1.Test catalase.....	8
3.2.Test oxidase.....	8
3.3.Bacitracine.....	8
3.4.Test TSI.....	9
3.5.Test coagulase.....	9
3.6.Test DNase.....	9
4. Antibiogramme.....	9
5. Evaluation de la capacité des souches isolées à former un biofilm.....	10
6. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet.....	10
Troisième partie : Résultats et discussion.....	12
1. Prélèvements.....	13
1.1.Distribution des prélèvements positifs selon le sexe.....	14
1.2.Répartition des enfants en fonction des affections buccales.....	15
1.3.Répartition des enfants en fonction des tranches d'âges.....	16
1.4.Répartition des enfants en fonction de la fréquence de brossage des dents.....	17
1.5.Répartition des enfants en fonction de la nature des dentifrices utilisés.....	18

2. Identification.....	19
3. Antibiogramme.....	21
4. Formation des biofilms bactériens sur milieu BHIB.....	24
Quatrième partie : Conclusion.....	27
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	30
Sixième partie : Annexes.....	46

Liste des tableaux

Tableau N°1 :	Charge bactérienne endogène de la cavité bucco-dentaire.....	5
Tableau N°2 :	Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe.....	14
Tableau N°3 :	Répartition des enfants selon l'hygiène bucco-dentaire.....	17
Tableau N°4 :	Types et marques des dentifrices utilisés par les enfants.....	18
Tableau N°5 :	Répartition des souches isolées en fonction des résultats des tests d'identification.....	19
Tableau N°6 :	Antibiogramme des souches bactériennes isolées de la cavité buccale.....	22

Liste des figures

Figure N°1 :	Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale.	3
Figure N°2 :	Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale démontrant une gamme de micro-organismes.....	3
Figure N°3 :	Taux d'altération bactérienne de la cavité buccale des enfants en bonne santé.....	13
Figure N°4 :	Répartition des enfants en fonction des pathologies bucco-dentaires.....	15
Figure N°5 :	Répartition des enfants affectés par la carie dentaire selon leur âge.....	16
Figure N°6 :	Biomasses des biofilms bactériens formés sur BHIB.....	24

Liste des abréviations

BHIB : Brain Heart Infusion Broth

TSI: Triple Sugar Iron Agar

CASFM : Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie

DO: Densité optique

Première partie
Synthèse bibliographique

La cavité buccale, qui marque l'entrée du tube digestif, joue un rôle crucial dans le processus de digestion des aliments (**Jung, 2018**). Elle est également impliquée dans des fonctions telles que la phonation, la mastication, la déglutition et la respiration, qui sont toutes des indicateurs de la santé générale. Ainsi, il est essentiel de protéger la santé buccale pour préserver la qualité de vie des individus (**Secci, 2006**).

Il s'agit d'une cavité corporelle encadrée par des os et des muscles, tapissée par un épithélium stratifié squameux. Cette cavité est principalement occupée par un organe très mobile, la langue, qui est une structure musculaire striée couverte de papilles gustatives (**Grant et Waugh, 2003**). On y trouve également les arcades dentaires maxillaire et mandibulaire (**Romerowski et Boccara, 2017**).

La chambre pulpaire contient des vaisseaux sanguins, des vaisseaux lymphatiques et des nerfs, entourés de dentine. L'émail est la substance dure qui recouvre la surface de la couronne dentaire. (**Grant et Waugh, 2003**).

La cavité buccale est continuellement humidifiée grâce à la salivation, qui est une fonction vitale pour les processus physiologiques. Cette fonction est assurée par deux types de glandes salivaires : les glandes majeures, qui produisent plus de 90% de la sécrétion salivaire, et les glandes mineures, qui en sont responsables des 10% restants [(**Lautrou, 1998**) ; (**Vidailhet et coll., 2008**)].

La cavité buccale abrite un écosystème microbien complexe comprenant plus de 700 espèces qui coexistent et interagissent entre elles (**Lignon et coll., 2015**). Ces micro-organismes sont généralement attachés à une surface et entourés d'une matrice extracellulaire (**Monroe, 2007**; **Zawadzki et coll., 2001**; **Takane et coll., 2018**). (**Figure 1 et 2**)

En effet, chez les individus en bonne santé, la cavité buccale est principalement colonisée par des bactéries Gram-positives, notamment les *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus mitisbiovar* (**OMS, 2012**).

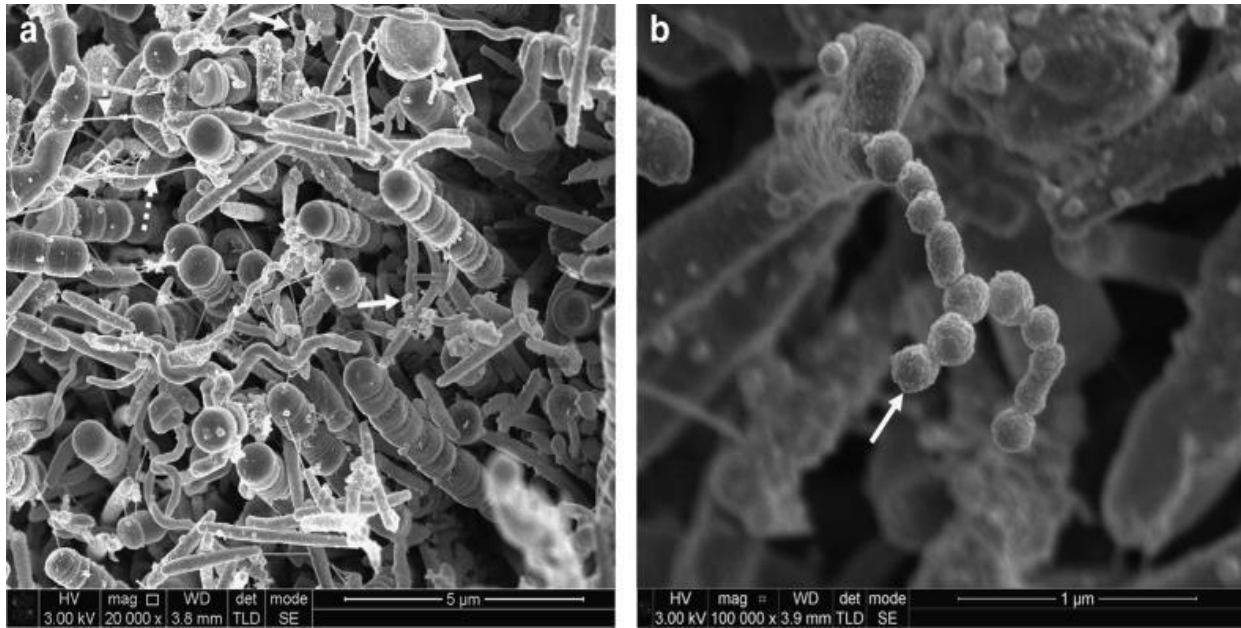


Figure N°1 : Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale. (Holliday et coll., 2015).

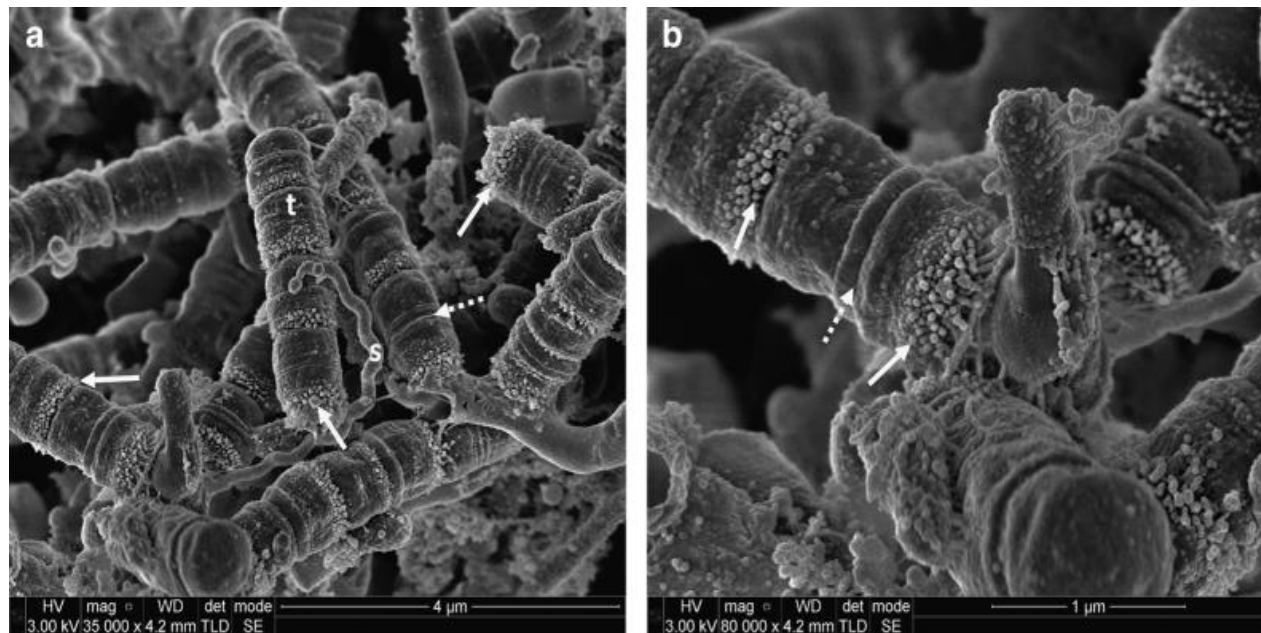


Figure N°2: Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale démontrant une gamme de micro-organismes, (Holliday et coll., 2015).

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a publié une liste de pathogènes prioritaires et les a classés en tant que bactéries résistantes aux antibiotiques nécessitant de toute urgence des recherches et le développement de nouveaux traitements. Parmi ces pathogènes, les bactéries Gram-positives peuvent causer des infections graves et sont considérées comme un problème majeur de santé, en particulier les bactéries multirésistantes (MDR) telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), *Enterococcus faecium* résistant à la vancomycine (VRE) et *Streptococcus pneumoniae* résistant à la β -lactamase (Asokan et coll., 2019 ; Cornaglia, 2009).

La composition de la flore buccale varie d'un individu à l'autre en fonction de plusieurs facteurs écologiques tels que l'humidité, la température, le pH, la capacité redox, la disponibilité en nutriments, la surface et le flux de salive dans la cavité buccale (Tableau 1). Ces paramètres sont influencés par l'hôte lui-même, son hygiène buccale et son régime alimentaire (Chardin et coll., 2006 ; Philip et coll., 2009).

Selon Mouton et Robert (1997), lorsque l'écosystème buccal est équilibré, la flore commensale établit une relation stable avec l'hôte humain. Toutefois, en cas de perturbation de l'environnement, certaines bactéries peuvent devenir pathogènes et causer des infections opportunistes, comme l'ont souligné Boudjellal et coll., (2020).

Les infections bucco-dentaires représentent un problème majeur de santé publique et figurent parmi les maladies non transmissibles les plus répandues, selon l'OMS (2018). Elles touchent toutes les tranches de la population à différents niveaux, (Sanogo, 2015), et peuvent refléter l'état de santé général, voire révéler des maladies systémiques (Garcia, 2017).

En règle générale, les infections dentaires bactériennes peuvent être classées en deux catégories : celles qui sont spécifiques à la cavité buccale et celles qui sont liées à des maladies générales. Les maladies parodontales et les caries dentaires sont les formes les plus courantes de ces infections (Muller et coll., 1997).

L'organisation mondiale de la santé (OMS, 2012) a révélé que les maladies carieuses sont la quatrième maladie la plus courante dans le monde. C'est une maladie multifactorielle qui se

caractérise par une déminéralisation acide de l'émail dentaire. Les acides organiques produits par les bactéries cariogènes, comme les *Streptococcus mutans* et les *Streptococcus sobrinus*, sont les principaux responsables (Marsh, 2004).

Tableau N°1: Charge bactérienne endogène de la cavité bucco-dentaire (OMS, 2012).

<p>Bactéries à Gram+ Cocci aérobies anaérobies facultatifs: <i>Streptocoques alpha hémolytiques</i> <i>Streptocoques bêta hémolytiques</i> <i>Streptocoques non hémolytiques</i> <i>Staphylocoques</i> Cocci anaérobies <i>Bacilles aérobies anaérobies facultatifs:</i> <i>Actéramyces</i> <i>Lactobacilles</i> <i>Diphthéroïdes</i></p> <p>Bactéries à Gram- Cocci aérobies anaérobies facultatifs Cocci anaérobies Bacilles aérobies anaérobies facultatifs Bacilles anaérobies : <i>Bacteroides</i> <i>Precoctella, Perperymonas sp.</i> <i>Fucobactereos sp.</i></p> <p>Spirochètes Levures Virus</p>	<p>permanentes et majoritaires transitoire et minoritaires permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires</p> <p>permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires permanentes et majoritaires</p> <p>permanentes et majoritaires permanentes et majoritaires transitoire et minoritaires</p> <p>permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires permanentes et minoritaires</p> <p>?</p>
--	---

Les enfants sont plus exposés aux risques des pathologies bucco-dentaires en raison de l'hygiène bucco-dentaire et la consommation excessive des sucres. Les caries dentaires, la gingivite et les douleurs dentaires sont les affections buccales les plus fréquentes chez l'enfant [(Slade, 2001) ; (Botero et coll., 2015) ; (Pacorel, 2015)].

En prenant en compte les informations exposées précédemment, notre étude avait pour objectif d'isoler et d'identifier les bactéries Gram-positif présentes dans la cavité buccale d'enfants en bonne santé de la région de Tlemcen. Nous avons également étudié la sensibilité de ces souches aux antibiotiques ainsi que leur capacité à former des biofilms.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été mené au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'Université Aboubekr Belkaïd de Tlemcen, pendant trois mois de février à avril 2023. Les échantillons ont été prélevés chez des enfants du grand Tlemcen, filles et garçons, en bonne santé âgés de 1 à 16 ans.

1. Prélèvements

Nous avons réalisé une étude portant sur 12 échantillons. Pour chaque sujet, nous avons utilisé un écouvillon stérile pour frotter les surfaces dentaires, inter-dentaires et la cavité buccale.

1.1.Le questionnaire

Au début de notre démarche, nous avons soumis tous les patients à un interrogatoire minutieux afin de recueillir les informations les plus importantes telles que le sexe, l'âge et les pathologies (**Annexe N°1.1**).

1.2.Protocol

Après les prélèvements, nous avons recueilli immédiatement les écouvillons dans des tubes secs stériles auxquels nous avons ajouté 3 mL d'eau physiologique. Les tubes ont été agités au vortex pendant 2 minutes.

Nous avons commencé par prélever 100 μ L de chaque échantillon auxquels nous avons ajouté 900 μ L de BHIB destiné à la recherche des bactéries, puis nous avons procédé à une incubation pendant 24 à 72 heures à 37°C.

2. Isolement et purification

À partir des échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri préalablement coulées avec de la gélose Chapman destinée à l'isolement des bactéries Gram-positif sontensemencées par stries, puis incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures. Ensuite, une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans un milieu liquide stérile et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Chaque souche pure estensemencée sur une gélose inclinée en tube, puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à +4 °C.

3. Identification des souches

L'identification des souches isolées est réalisée par plusieurs tests

3.1. Test catalase

Il s'agit d'une enzyme qui catalyse la conversion du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, comme le montre la réaction suivante : $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (**Reiner, 2010**).

Pour réaliser ce test, une goutte de H_2O_2 est placée sur une lame en contact avec une colonie isolée. La formation de bulles d'air indique que les bactéries possèdent l'enzyme catalase.

L'objectif de ce test est de différencier les *Staphylococcus* et les *Micrococcus*, qui sont catalase positifs, des *Enterococcus* et des *Streptococcus*, qui sont catalase négatifs (**Decoster, 2008**).

Pour différencier les *Staphylococcus* des *Micrococcus* nous avons réalisés les tests suivants : (Kocur et coll., 2006 ; Bannerman et Peacock, 2007).

3.2. Test oxydase

Le test de l'oxydase est utilisé pour détecter la présence de l'enzyme cytochrome chez les bactéries (**Bailey et Scott's, 2014**). Pour réaliser ce test, un disque d'oxydase est placé dans un tube à vis contenant une suspension bactérienne. Après 30 secondes, la présence d'une coloration violette indique un résultat positif.

3.3. Bacitracine

C'est un antibiotique utilisé pour différencier les *Staphylococcus spp* des *Micrococcus spp*. L'étude de la sensibilité des bactéries à la bacitracine est effectuée par la méthode de diffusion sur gélose Müller-Hinton selon le protocole (**CASFM, 2010**). Des diamètres des zones d'inhibition ≤ 25 mm indiquent que les bactéries sont résistantes à la bacitracine, c'est-à-dire qu'elles appartiennent au genre *Staphylococcus*, alors que des diamètres > 25 mm indiquent que les isolats sont sensibles à la bacitracine, donc il s'agit de *Micrococcus spp* (**Baker et coll., 1986**).

3.4. Test TSI (Triple Sugar Iron Agar)

C'est un test qui est basé sur la fermentation avec ou sans production de gaz du glucose, du lactose et du saccharose. Ce test est réalisé par une méthode d'ensemencement par piqûre profonde du culot en ligne droite et par des stries serrées sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur, puis il est incubé à 37 °C pendant 24 heures (**Lebres, 2004 a,b**). Une coloration jaune du culot ainsi que de la pente indique que les isolats appartiennent à *Staphylococcus spp.* Tandis qu'une coloration rouge indique que les bactéries sont des *Micrococcus*.

3.5. Test Coagulase

Ce test consiste à incuber un tube de plasma avec les bactéries à 37°. Tout degré de coagulation est considéré comme un résultat positif, même s'il prend 24 heures. Cette méthode est décrite dans l'article de **Brown et Smith (2015)**.

3.6. Test de DNase

Le test de la DNase consiste à incuber des isolats bactériens sur une gélose spéciale DNase pendant 24 heures à une température de 37 °C. Ensuite, environ 15 ml d'acide chlorhydrique (HCl) à 1 N est ajouté en excès sur la gélose pour dénaturer les protéines bactériennes. Après un certain temps, l'excès d'acide est éliminé. Des zones claires autour des colonies bactériennes indiquent la présence de l'enzyme DNase, ce qui signifie que la bactérie est DNase positive. Ce test est utile pour différencier les souches de staphylocoques, car *S. aureus* est souvent DNase positif, tandis que les autres espèces de staphylocoques sont DNase négatives. (**Kateete et coll., 2010**).

4. Antibiogramme

Les tests d'antibiogramme sont effectués en utilisant la méthode de diffusion sur gélose selon le protocole du Comité d'Antibiogramme- Société Française de Microbiologie- (**CASFM, 2010**),

Après avoir cultivé les bactéries pendant 24 heures à 37 °C sur un milieu d'isolement approprié, nous avons prélevé quelques colonies pour les placer dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.

Ensuite, nous avons homogénéisé le mélange et ajusté la densité optique à 10^8 UFC/mL en lisant la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm, qui devait être comprise entre 0,08 et 0,1.

Après ensemencement, des disques imprégnés de concentrations déterminées d'antibiotiques ont été placés à la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Muller-Hinton. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à 37 °C. La comparaison des diamètres des zones d'inhibition avec les valeurs critiques a permis de classer les bactéries dans l'une des catégories suivantes : sensible, intermédiaire ou résistante à l'antibiotique.

5. Evaluation de la capacité des souches isolées à former un biofilm

Les pré-cultures bactériennes sont réalisées dans 1 ml de BHIB. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la suspension est centrifugée à 1000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le culot est lavé deux fois avec du PBS (pH 7,4 0,1M) puis resuspendu dans le milieu de culture choisi pour former le biofilm (BHIB à pH 7,4) à raison de 10^7 cellules/ml (**Christensen et coll., 1985**).

100 µl de la solution bactérienne sont repartis dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits. Le dernier puits contient le milieu BHIB seul et sert de témoin négatif. Ensuite, la plaque est scellée puis mise à incuber à 37°C pendant 24 heures.

6. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet

La technique de coloration au cristal violet permet de mesurer la quantité de biomasse présente à l'intérieur du biofilm (**Christensen et coll., 1985**). Le cristal violet se lie aux molécules extracellulaires chargées négativement, telles que les molécules de la surface cellulaire ou les polysaccharides de la matrice exopolymérique des biofilms (**Li et coll., 2003**). Une fois le biofilm formé, le milieu est aspiré et les puits sont lavés à trois reprises avec du PBS (pH 7,4 0,1M) stérile afin d'éliminer les cellules planctoniques et/ou les cellules non adhérentes.

Pour fixer le biofilm, 100 µL de méthanol absolu sont ajoutés aux différents puits de la microplaque. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et 100 µL d'une solution de cristal violet sont ajoutés. Les microplaques sont ensuite laissées pendant 20 minutes à température ambiante. Le cristal violet lié est libéré par l'addition de 150 µL d'acide acétique (33%). Enfin, la densité optique est lue à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Biochrom Asys UVM340).

Troisième partie
Résultats et discussion

La cavité buccale abrite divers micro-organismes tels que les bactéries et les levures, qui coexistent en équilibre et entretiennent des relations stables avec l'hôte.

La perturbation de cet équilibre entraîne l'émergence de la pathogénicité de certaines espèces, notamment les Staphylocoques, qui sont responsables de diverses infections buccodentaires, telles que la carie, la gingivite et la parodontite.

Les enfants sont les plus touchés par ces infections en raison d'une mauvaise hygiène buccale, et d'une alimentation riche en sucre.

Dans ce contexte, nous allons établir l'épidémiologie des bactéries gram-positif isolées de la cavité buccale des enfants en bonne santé dans la région de Tlemcen, étudier le profil de résistance des souches isolées et tester leur capacité à former des biofilms *in vitro*.

1. Prélèvements

Entre février et avril 2023, nous avons effectué 12 prélèvements buccaux sur des enfants en bonne santé âgés de 1 à 16 ans, dont 7 garçons et 5 filles.

Les prélèvements ont été mis en culture sur le milieu Chapman, et les résultats obtenus sont regroupés dans la **Figure N°3**.

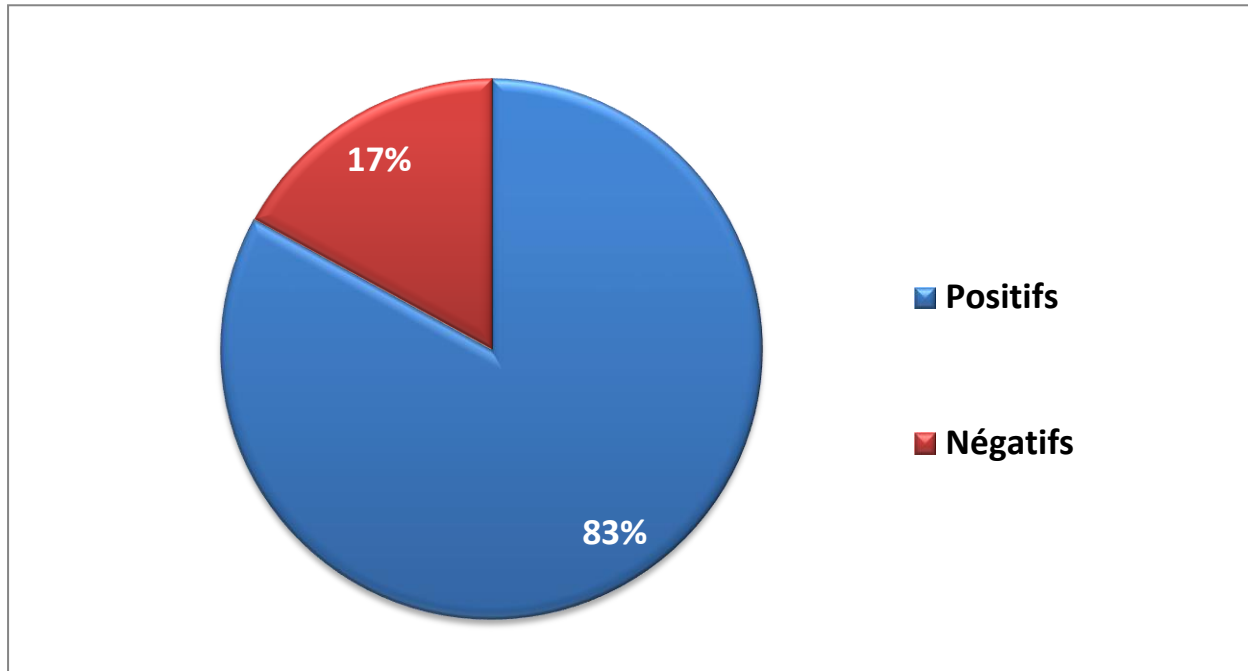


Figure N°3 : Taux d'altération bactérienne de la cavité buccale des enfants en bonne santé.

Nous avons observé que la fréquence d'altérations buccales causées par *Staphylococcus spp* était de 83% chez les enfants inclus dans notre étude. Dans une étude menée par **Miyake et coll., (1991)** sur 307 enfants en bonne santé, il a été démontré que le taux d'altération était de 84%.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* sont fréquemment isolées de la flore buccale et elles jouent un rôle majeur dans le processus infectieux des pathologies buccales (**Robertson et Smith, 2009**).

1.1. Distribution des prélèvements positifs selon le sexe

Les résultats relatifs à la répartition des prélèvements positifs par sexe sont représentés sur le **tableau N°2**.

Tableau N°2 : Répartition des prélèvements positifs en fonction du sexe

	Nombre des prélèvements positifs (%)
Garçons n=7	6 (86%)
Filles n=5	4 (80%)
Total n=12	10 (83%)

Le **tableau N°2** montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les garçons et les filles. Ces résultats concordent avec d'autres études menées par **Benkacher et Hamoud, (2018)** sur 15 prélèvements effectués auprès de volontaires sains, comprenant 8 hommes et 7 femmes. La mise en culture des prélèvements sur milieu Chapman a révélé que 10 d'entre eux étaient positifs, dont 5 hommes et 5 femmes.

1.2. Répartition des enfants en fonction des affections buccales

Les résultats relatifs à la répartition des enfants en fonction des pathologies bucco-dentaires sont représentés sur la **figure N°4**.

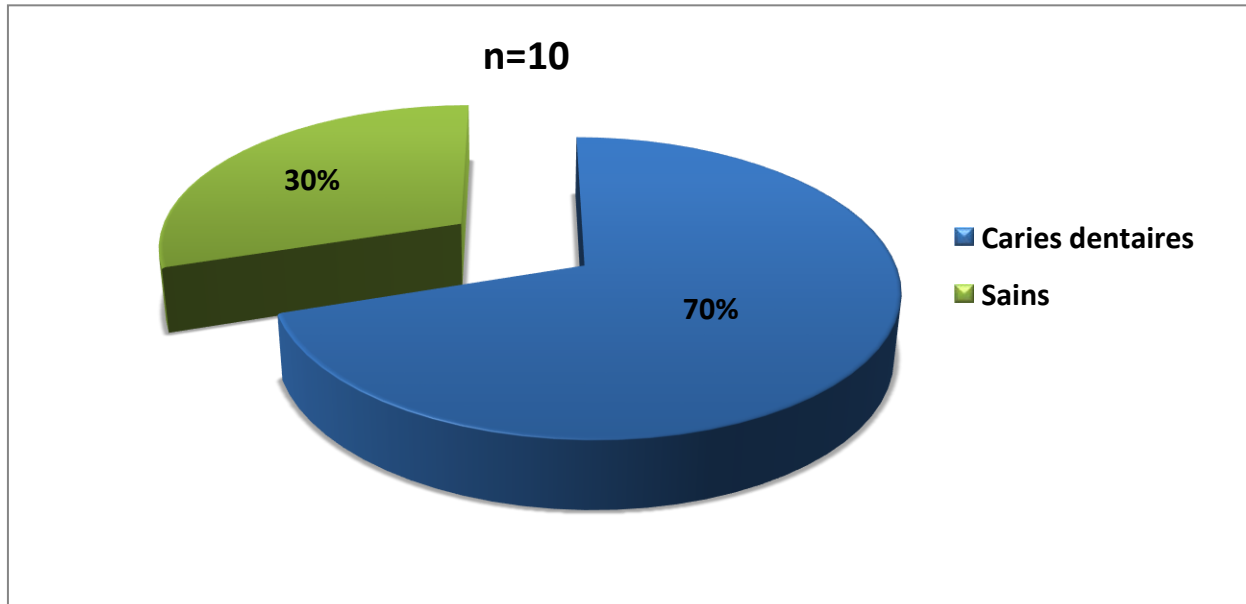


Figure N°4 : Répartition des enfants en fonction des pathologies bucco-dentaires.

Nous avons remarqué que la carie dentaire est la pathologie bucco-dentaire la plus fréquente (70 %) chez les enfants inclus dans notre étude. En effet, selon l'**OMS (2014)**, elle affecte plus de 80 % de la population mondiale et touche entre 60 et 90 % des enfants d'âge scolaire. Ces données corroborent l'étude menée par **Ştirb et Petruş-Vancea, (2021)**.

De plus, **Keys (1960) et Newbrune (1978)** ont mis en évidence le fait que la carie dentaire ne se manifeste qu'en présence de plusieurs facteurs, à savoir une alimentation riche en sucre, un hôte susceptible, une microflore buccale spécifique et le facteur temps.

Les caries dentaires sont également liées à d'autres facteurs tels que les facteurs génétiques, comportementaux et environnementaux, comme l'ont souligné **Selwitz et coll., (2007)**.

1.3. Répartition des enfants en fonction des tranches d'âges

Les résultats concernant la répartition des enfants atteints de caries en fonction de leur âge sont présentés sur la **figure N°5**.

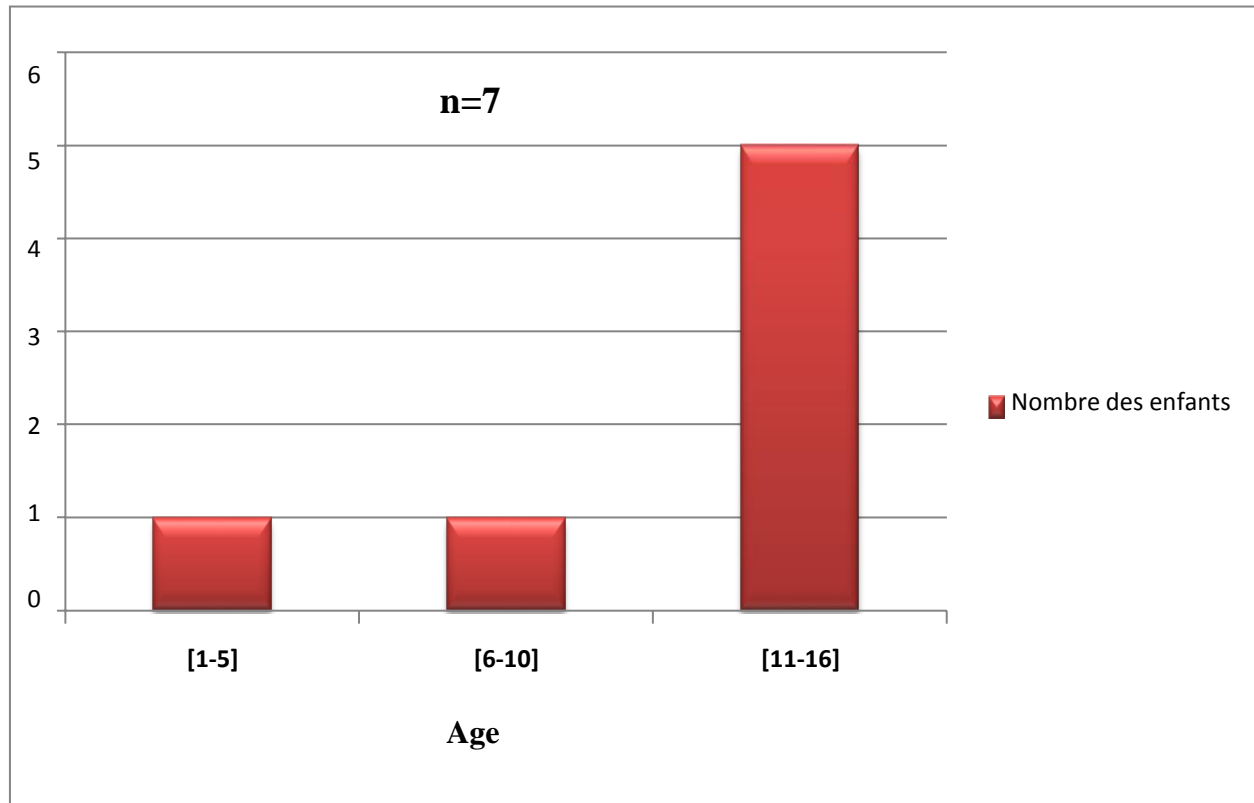


Figure N°5: Répartition des enfants affectés par la carie dentaire selon leur âge.

Les résultats obtenus mettent en évidence une prévalence élevée de la carie dentaire chez les enfants âgés de 11 à 16 ans. Ces résultats concordent avec les conclusions des enquêtes précédemment réalisées par l'OMS en 1987 et 1997

1.4. Répartition des enfants en fonction de la fréquence de brossage des dents

Les résultats de l'état de l'hygiène bucco-dentaire chez les enfants sont présentés dans le **tableau N°3**.

Tableau N°3 : Répartition des enfants selon l'hygiène bucco-dentaire

Fréquence de brossage dentaire par jour	Enfants avec carie	Enfants sains
Irrégulière	5	1
1 fois	2	1
2 fois	0	1

Selon les données présentées dans le tableau précédent, une différence notable est observée entre les enfants atteints de caries et ceux qui sont en bonne santé en termes d'hygiène bucco-dentaire. L'étude menée par **Kumar et coll., (2016)** a révélé qu'il existe une incidence plus élevée de lésions carieuses chez les individus se brossant les dents de manière occasionnelle par rapport à ceux qui se brossent fréquemment. Cette observation rejoint les résultats obtenus dans les études menées par **Löe et coll., (1965)**.

D'après l'étude menée par **Muller et coll., (1997)**, l'hygiène bucco-dentaire, comprenant une technique de brossage efficace, visent à réduire de manière significative l'incidence des caries.

1.5. Répartition des enfants en fonction de la nature des dentifrices utilisés.

Les résultats concernant la répartition des enfants en fonction des dentifrices utilisés sont présentés dans le **tableau N°4**.

Tableau N°4: Types et marques des dentifrices utilisés par les enfants.

Marque de dentifrice	Fluoré	Non Fluoré	Nombre des enfants
Miswak [®]		X	01
Extra Kids [®]		X	02
Colegette [®]	X		03
Signal [®]	X		03
Gencyl skills [®]	X		01

Ces résultats démontrent que 70 % des enfants utilisent un dentifrice contenant du fluor. En effet, maintenir une bonne hygiène bucco-dentaire et utiliser régulièrement des dentifrices fluorés semble être la méthode la plus efficace pour favoriser le processus de reminéralisation. Plus particulièrement, l'application locale de dentifrices fluorés réduit l'impact de l'alimentation sur la formation des caries dentaires, comme l'ont souligné **Minnig (2005) et Shetty et coll., (2016)**.

2. Identification

Sur les 10 cultures positives, nous avons enregistré 4 cultures mixtes composées d'une association de deux espèces bactériennes, contre 6 monocultures.

Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures des cultures sur milieu Chapman, nous avons pu isoler 7 souches de *Staphylococcus aureus* et 7 souches de *Staphylococcus* blanches

Les souches isolées ont été soumises à plusieurs tests d'identification, et les résultats obtenus sont représentés dans le **tableau N°5**.

Tableau N°5: Répartition des souches isolées en fonction des résultats des tests d'identification

	Test catalase	Test oxydase	Test TSI	Test coagulase	Test DNase
Souche 1	+	-	+	+	+
Souche 2	+	-	+	-	-
Souche 3	+	-	+	+	+
Souche 4	+	-	+	-	-
Souche 5	+	-	+	-	-
Souche 6	+	-	+	+	+
Souche 7	+	-	+	-	-
Souche 8	+	-	+	-	-
Souche 9	+	-	+	+	+
Souche 10	+	-	+	-	-
Souche 11	+	-	+	+	+
Souche 12	+	-	+	+	+
Souche 13	+	-	+	-	-
Souche 14	+	-	+	+	+

Les résultats obtenus révèlent que tous les isolats bactériens sont catalase positifs, oxydase négatifs et TSI positifs, ce qui indique qu'ils appartiennent au genre *Staphylococcus*. Les résultats du test de coagulase et de DNase permettent de distinguer deux groupes de *Staphylococcus* : *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus* à coagulase négative. Ainsi, 50% de nos souches sont des *Staphylococcus aureus*. Ces résultats sont en accord avec des recherches précédemment publiées par **Suzuki et coll., (1997)**, qui ont montré que 56% des souches isolées chez 103 enfants en bonne santé étaient des *Staphylococcus aureus*. Dans une autre étude, l'incidence de *Staphylococcus aureus* était de 33% chez 307 enfants (**Miyake et coll., 1991**).

3. Antibiogramme

Nous avons évalué la sensibilité des souches isolées à la pénicilline G, à l'érythromycine, à la bacitracine, à la tétracycline et à la vancomycine par la méthode des disques (antibiogramme). Les résultats obtenus sont regroupés dans le **tableau N°6**.

Tableau N°6: Antibiogramme des souches bactériennes isolées de la cavité buccale.

	Pénicilline G		Erythromycine		Bacitacine		Tétracycline		Vancomycine	
	Profil de résistance (10µg)	Diamètre (mm)	Profil de résistance (15µg)	Diamètre (mm)	Profil de résistance (10µg)	Diamètre (mm)	Profil de résistance (30µg)	Diamètre (mm)	Profil de résistance (5µg)	Diamètre (mm)
<i>S.aureus</i> 1	R	9	R	7	R	21	S	26	R	5
<i>Staph.spp</i> 2	R	11	R	7	R	22	S	32	S	17
<i>Staph.aureus</i> 3	R	9	S	25	R	25	S	27	S	15
<i>Staph.spp</i> 4	R	14	R	11	R	10	S	30	S	21
<i>Staph.spp</i> 5	R	16	R	14	R	25	S	31	S	22
<i>Staph.aureus</i> 6	R	7	S	25	S	30	S	33	S	19
<i>Staph.spp</i> 7	R	6	S	24	R	20	S	24	S	22
<i>Staph.spp</i> 8	S	31	S	30	R	19	S	30	S	18
<i>Staph.aueus</i> 9	R	6	R	24	R	18	R	10	S	16
<i>Stap.spp</i> 10	R	6	S	30	R	22	R	10	S	18
<i>Staph.aureus</i> 11	R	8	S	24	R	18	S	28	S	17
<i>Staph.aureus</i> 12	R	6	R	20	R	15	S	25	S	15
<i>Staph.spp</i> 13	R	10	S	24	R	19	R	11	S	15
<i>Staph.aureus</i> 14	R	9	R	23	R	17	S	26	S	16

Selon le tableau N°7, 93 % des *Staphylococcus* isolés ont présenté une résistance à la pénicilline G. Ce résultat est en accord avec ceux de **Kerbouci et coll., (2022)**, qui ont rapporté respectivement une résistance globale à la pénicilline G de 97 % et de 100 %.

Nous avons observé également une sensibilité de 50 % à l'érythromycine, ce qui concorde avec l'étude menée par **Bertrand et coll., (2004)**, qui ont démontré une augmentation progressive du taux de sensibilité à l'érythromycine, passant de 7 % à 32 %. Par ailleurs, **Hamze et coll., (2003)** ont rapporté dans leur étude une sensibilité de 93 % à cet antibiotique.

De plus, nous avons observé dans cette étude que la résistance à la bacitracine était de 93%, tandis que l'étude menée par **Falk et Guering, (1983)** rapportait un taux de résistance de 100%. Nous avons observé également que 78% des isolats se sont révélés sensibles à la tétracycline et 93% à la vancomycine. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par **Vellappally et coll. (2017)** et **Garbacz et coll., (2021)**, qui ont rapporté des taux de sensibilité de 54% pour la tétracycline et 43% pour la vancomycine.

L'un des facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques est la capacité des bactéries à former des biofilms. Certaines espèces de bactéries, telles que *Staphylococcus*, sont particulièrement connues pour leur aptitude à développer ces structures multicellulaires (**Kryvtsova et coll., 2020**).

1. Formation des biofilms bactériens sur milieu BHIB

Les staphylocoques sont des agents pathogènes bactériens, et parmi eux, *Staphylococcus aureus* est le plus souvent associé aux infections humaines. Des études antérieures ont révélé que la biomasse et la structure des biofilms produits peuvent varier en fonction de la souche, de l'espèce, de la composition du milieu et du pH (Seghir et coll., 2015).

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de formation de biofilms pour 14 souches isolées, comprenant 7 souches de *Staphylococcus aureus* et 7 souches de *Staphylococcus spp.*

Les souches isolées ont été examinées en utilisant la méthode de coloration au crystal violet, et les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure N°7**.

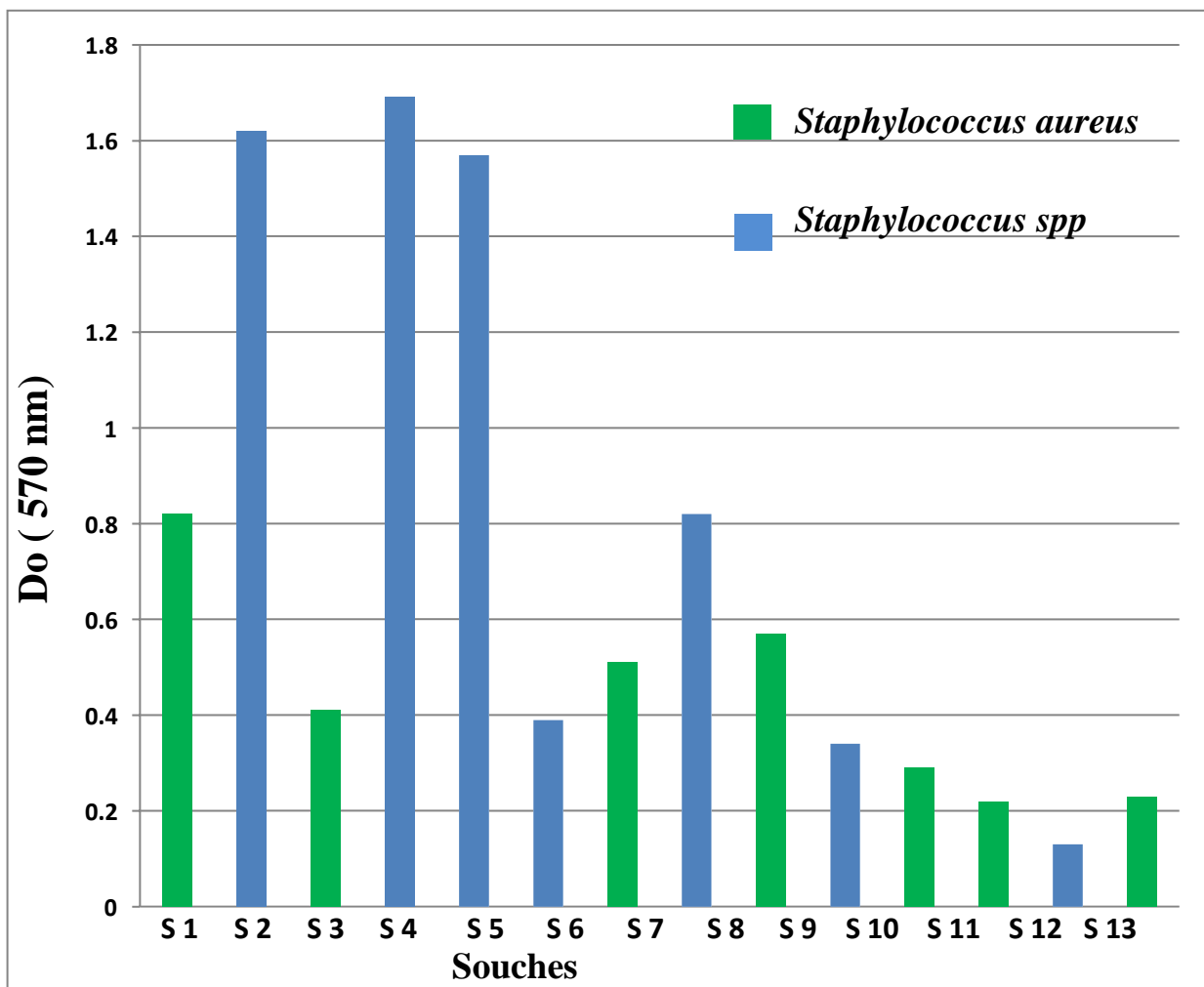


Figure N°7 : Biomasses des biofilms bactériens formés sur BHIB

Nous remarquons que toutes les souches forment des biofilms. Cependant, la biomasse de ces structures formées varie d'une souche à une autre.

Nous pouvons identifier trois groupes de souches en fonction de la biomasse produite. Le premier groupe comprend les souches 2, 4 et 5, qui ont un potentiel relativement élevé pour former des biofilms, avec une densité optique supérieure à 1,5. Cependant, aucune de ces souches n'appartient à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Le deuxième groupe comprend les souches 1, 3, 7, 8 et 9, qui présentent un potentiel moyen avec des valeurs d'absorbance comprises entre 0,4 et 0,8. Les autres souches ont un faible potentiel pour former des biofilms.

En effet, nos résultats concordent avec ceux de **Kuhn et coll. (2002)** et **Li et coll., (2003)**, qui indiquent que la quantité de biofilms varie à la fois entre les espèces étudiées, entre les différentes souches d'une même espèce, ainsi qu'en fonction du milieu de culture.

Quatrième partie
Conclusion générale

La formation de biofilms à la surface des dents, tels que la plaque dentaire, revêt une importance cruciale dans l'apparition des infections bucco-dentaires liées à une mauvaise hygiène buccale. Cette réalité pousse la communauté scientifique à orienter ses recherches vers une meilleure compréhension de ce mode de vie microbien

Dans le cadre de notre étude, notre objectif principal était de :

- Dans un premier temps, identifier les germes à Gram positif les plus abondants dans la cavité buccale des enfants en bonne.
- Dans un deuxième temps, évaluer la sensibilité des souches bactériennes isolées à plusieurs antibiotiques.
- Enfin, évaluer le potentiel de formation de biofilms des souches isolées sur milieu BHIB.

Les résultats obtenus nous ont permis de tirer les conclusions suivantes:

- Premièrement, parmi les 12 prélèvements effectués, une prévalence de 83 % de Staphylococcus a été observée, ce qui en fait les micro-organismes les plus abondants dans la cavité buccale des enfants en bonne santé.
- Deuxièmement, parmi les 10 prélèvements positifs, 14 souches de Staphylococcus ont été isolées, dont 7 souches (50 %) étaient des Staphylococcus aureus.
- Troisièmement, toutes les souches isolées ont démontré la capacité de former des biofilms. Cependant, il a été remarqué que la biomasse des biofilms produits variait en fonction des espèces et des souches au sein de la même espèce.
- Enfin, la plupart des bactéries se sont révélées sensibles aux antibiotiques testés. Néanmoins, la résistance aux antibiotiques présentait des variations entre les différentes espèces et souches du genre Staphylococcus.

Pour compléter cette étude, les suggestions suivantes peuvent être envisagées :

- Effectuer une identification plus précise des souches isolées.
- Étudier un plus grand nombre d'échantillons.
- Mettre en évidence l'architecture des biofilms en utilisant des techniques de microscopie électronique.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. **Asokan, G. V., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019).** WHO global priority pathogens list: a bibliometric analysis of Medline-PubMed for knowledge mobilization to infection prevention and control practices in Bahrain. *Oman medical journal*, 34(3), 184.
2. **Bailey., Scott's. (2014).** *Diagnostic Microbiology*. China: Elsevier, 13th ed.
3. **Baker J. S., Hackett M. F., et Simard D. J. (1986).** Variations de la sensibilité à la bacitracine observées chez les espèces *Staphylococcus* et *Micrococcus*. *Journal of clinical microbiology*, 23(5), 963-964.
4. **Bannerman T.L., Peacock S. J. (2007).** *Staphylococcus, Micrococcus, and Other Catalase- Positive Cocci*. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 390-404). Washington, USA: ASM Press
5. **Benkacher S., Hamoud N. (2018).** Isolement, Identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries des caries dentaires, 70-72
6. **Bertrand X., Mulle, A., Thouverez M., et Talon D. (2004).** Retour vers la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM): relation entre génotype et antibiotype. *Pathologie Biologie*, 52(8), 480-485.
7. **Boudjellal A., Melzi H., Berouaken M.A., Meddah S., Abdi S., Bounedjar S. (2020).** Le Profil Bactériologique de la flore buccale des Patients Totalelement Edentés à la Clinique Dentaire de Blida. *Faculte de Medecine, Univ, Blida 1 :25*.
8. **Botero J. E., Rösing, C. K., Duque, A., Jaramillo, A., & Contreras, A. (2015).** Maladie parodontale chez les enfants et les adolescents d'Amérique latine. *Periodontology 2000*, 67(1), 34-57.
9. **Brown A., Smith H. (2015).** *Benson's microbiological applications: laboratory manual in general microbiology*. New York: McGraw-Hill, short version, 13th edition. ISBN: 978-0-07- 340241-3.
10. **CASFM. (2010).** Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
11. **Chardin H., Barsotti O., Bonnaure-Mallet M. (2006).** *Microbiologie en odontostomatologie*. Paris : éditions Maloine.
12. **Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., Beachey E.H. (1985).** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic

- tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
13. **Cornaglia, G. (2009).** Fighting infections due to multidrug-resistant Gram-positive pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(3), 209-211.
 14. **Decoster. (2008).** Les streptocoques - Cours de Anne Decoster, FLM, page : 1 ; 6. Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Lavoisier. Editions TEC and DOC.
 15. **Falk D., Guering S. J. (1983).** Differentiation of *Staphylococcus* and *Micrococcus* spp. with the Taxo A bacitracin disk. *Journal of clinical microbiology*, 18(3), 719-721.
 16. **Grant A., Waugh A. (2003).** Anatomie et physiologie normales et pathologiques. Traduit de la 9ème édition anglaise, Paris: Maloine, 289-293.
 17. **Garbacz K., Kwapisz E., Piechowicz L., Wierzbowska, M. (2021).** *Staphylococcus aureus* isolated from the Oral Cavity: Phage Susceptibility in Relation to Antibiotic Resistance. *Antibiotics* (Basel, Switzerland), 10(11), 1329.
 18. **Garcia Chloé. (2017).** Etude et prévention bucco-dentaire chez une population autochtone colombienne : "Les U'was". Thèse d'exercice en chirurgie dentaire, Univ, Toulouse III - Paul Sabatier: 13.
 19. **Hamze M., Dabboussi F., Daher W., et Izard D. (2003).** Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* au Nord du Liban: place de la résistance à la méticilline et comparaison des méthodes de détection. *Pathologie biologie*, 51(1), 21-26
 20. **Holliday R., Preshaw P. M., Bowen, L. et Jakubovics, N. S. (2015).** L'ultrastructure de la plaque dentaire sous-gingivale, révélée par la microscopie électronique à balayage à émission de champ à haute résolution. *BDJ ouvert*, 1, 15003 : 3-4.
 21. **Jung C. (2018).** Les infections bactériennes bucco-dentaires : conseil du pharmacien. *Sciences pharmaceutiques* : 16.
 22. **Kateete D. P., Kimani C. N., Katabazi F. A., Okeng A., Okee M. S., Nanteza A., et Najjuka F. C. (2010).** Identification de *Staphylococcus aureus*: La DNase et la gélose au sel de mannitol améliorent l'efficacité du test de coagulase tubulaire. *Annales de microbiologie clinique et antimicrobiens*, 9(1), 1-7.

23. **Kerbouci N. E. H. K., Bouchenafa M., Esselimani H., et Belkacem I. (2022).** Isoloment, identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries de la cavité buccale (Doctoral dissertation); p103
24. **Keys P.H. (1960).** The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Finding and implications. *Arch. Oral Biol.* 1 (4): 304-320.
25. **Kocur M., Kloos W. E., Schleifer K. H. (2006).** The Genus *Micrococcus*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes* (3rd ed., pp. 961-971). New York: Springer
26. **Kryvtsova M.V., Király J., Koščová J., Kostenko Ye.Ya., Bubnov R.V., Spivak M.Ya. (2020).** Determination of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* genus isolated from the oral cavity under inflammatory periodontal diseases. *Studia Biologica*: 14(3); 49–64.
27. **Kuhn D.M., Chandra J., Mukherjee P. K., & Ghannoum, M. A. (2002).** Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and immunity*, 70(2), 878-888.
28. **Kumar S, Tadakamadla J, Johnson N.W. (2016).** Effet de la fréquence du brossage des dents sur l'incidence et l'augmentation des caries dentaires: une revue systématique et une méta-analyse. *Journal of Dental Research*; 95(11):1230-1236.
29. **Lautrou A. (1998).** Anatomie dentaire. Paris, Milan, Barcelone, Editions Masson, 2ⁿ édition.
30. **Lebres, E. (2004a).** Entérocoques et Streptocoques. Institut Pasteur d'Algérie
31. **Lebres, E. (2004b).** Identification biochimique des micro-organismes, Institut Pasteur d'Algerie.
32. **Lignon G, Dure-Molla MD La, Dessombz A, Berdal A, Babajko S. (2015).** L'émail: un auto-assemblage unique dans le monde du minéral. *Médecine/Sciences*:31(5):515–21
33. **Li X., Yan Z., Xu J. (2003).** Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. *Microbiology*, 149(2), 353-362.
34. **Löe H., Theilade E. et Jensen S.B. (1965).** Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 36(3):177-187.
35. **Marsh P.D. (2004).** Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, 38 :204-21.
36. **Minnig P. (2005).** CARIES: PREVENTION SSP–SGP, *paediatrica*, 12(2).

37. **Miyake Y., Iwai T., Sugai M., Miura K., Suginaka H. et Nagasaka N. (1991).** Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. *Journal of Dental Research* 70: 1045-1047.
38. **Monroe D. (2007).** Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol*:5 (11):e307.
39. **Mouton C., Robert J .C. (1997).** Bactériologie bucco-dentaire. Paris: Masson. (Abrégés d'odontologie et de Stomatologie) : 184.
40. **Muller M., Lupi L., Medioni E., Bolla M. (1997).** Epidémiologie de la carie dentaire. Encyclopédie Médicaux-Chirurgicale (Elsevier, Paris), Odontologie, 23-010-A- 20, p 8.
41. **Newbrune E. (1978).** Cariology. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 326.
42. OMS. Rapport : Santé bucco-dentaire. 2018.
43. **Organisation mondiale de la Santé (OMS). (1987).** Enquêtes sur la santé buccodentaire. Méthodes de base Genève.
44. **Organisation mondiale de la Santé (OMS). (1997).** Enquêtes sur la santé buccodentaire. Méthodes de base Genève.
45. **OMS (Organisation mondiale de la Santé). (2012).** Santé bucco-dentaire Aide-mémoire, Genève, N 318. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/fr/>
46. **OMS (Organisation mondiale de la santé). (2014).** Santé bucco-dentaire – Aide-mémoire 2012. Genève.
47. **Pacorel C. (2015).** Santé bucco-dentaire du jeune enfant: connaissances et pratiques des professionnels de santé de périnatalité. En chirurgie dentaire, Université de lorraine, P 31-39
48. **Philip D., Marsh and Michael V., Martin. (2009).** Oral Microbiology, fifth edition. S.I.: Churchill Livingstone Elsevier, Elsevier limited.
49. **Reiner K. (2010).** Protocole de test catalase. Société américaine de microbiologie, 1-6.
50. **Robertson D., Smith A.J. (2009).** The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.*, 58(2):155-62.
51. **Romerowski J., Boccara E. (2017).** Comprendre l'anatomie dentaire. *Actualités Odonto-Stomatologiques*, (282), 2.
52. **Sanogo Y.T. (2015).** Etat de santé bucco-dentaire des élèves de 6 à 12 ans dans les écoles publiques de Mancourani à Sikasso : 521 cas. These de médecine FMOS Bamako : p111 .

53. **Secci G. (2006).** Manuel d'hygiène bucco-dentaire, Destiné à la formation de prophylaxistes, SDI 2006 / 2007, Ed. n°1 :1.01
54. **Selwitz R.H., Ismail A.I. et Pitts N.B. (2007).** Dental caries. *Lancet*, 369:51–59.
55. **Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Boucherit K., Sari-Belkharroubi L., Anselme-Bertrand I. (2015).** Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre *Candida albicans* et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen. Première étude en Algérie. *Journal of Medical Mycology*, 25(2), 123-129.
56. **Shetty K.P., Satish S.V., Gouda V., Badade A.R., Gouda B., Patil S. (2016).** Comparative evaluation and effect of organic and inorganic fluoride dentifrices on enamel microhardness: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent*: 6(2):130-3.
57. **Slade G. D. (2001).** Épidémiologie de la douleur dentaire et des caries dentaires chez les enfants et les adolescents. *Community dental health*, 18(4), 219-227.
58. **Ştirb, L., et Petruş-Vancea, A. (2021).** Etude préliminaire sur l'optimisation des connaissances, des attitudes et des compétences pratiques saines en santé bucco-dentaire, chez les collégiens des zones rurales. *Acta Didactica Napocensia*, 14(2), 1-13.
59. **Suzuki J., Komatsuzawa H., Sugai M., Suzuki T., Kozai K., Miyake Y., Suginaka H., et Nagasaka N. (1997).** A long-term survey of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children. *Microbiology and Immunology* 41(9): 681-686.
60. **Takane VV., Jatti R., Bhat K., Keshan D., Keluskar K., et al. (2018).** Microbiological Evaluation of Biofilm Formation on the Fixed Twin Block Appliance: A Clinical Trial *International Journal of Oral and Dental Health*, 4:1-2.
61. **Vellappally S., Divakar D. D., Al Kheraif A. A., Ramakrishnaiah R., Alqahtani A., Dalati M. H. N., Anil S., Khan A. A., et Harikrishna Varma P. R. (2017).** Occurrence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of patients with dental caries. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 64(3), 343–351.
62. **Vidailhet B., Robin O., Olo A, Bravetti P., Mahler P. (2008).** « Salivation ». EMC - Médecine Buccale, p. 1-8;
63. **Zawadzki P.J., Perkowski K., Starościak B., Baltaza W., Padzik M., Pionkowski K., Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V., Hacker J. (2001).** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*. 336: 195-203

Annexes

1. prélèvement

Annexe N°1.1

Questionnaire

Fiche de renseignement pour un prélèvement bucco-dentaire

Date de prélèvement :

Age :

Sexe : Fille Garçon

Adresse :

Fréquence de Brossage des dents (jours) :

Heure de prélèvement :

Irrégulière

1 fois/ jour

2 fois/ jour

Douleurs des dents : Oui Non

Régime alimentaire glucidique :

Pathologies buccodentaires :

caries dentaires

candidose

Autres pathologies

Apport d'antibiotiques (dernier mois avant le prélèvement) : Oui Non

Annexe N°1.2

Nature et période de prélèvement

P	Age	Sexe	Site de prélèvement	Date et l'heure	Lieu de prélèvement et pathologies
01	11	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	19.02.2022 à 08 :00.	Chetouane, Tlemcen Caries dentaires
02	5	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	19.02.2022 à 07 :00	Boudjlida, Tlemcen Caries dentaires
03	12	F	Surfaces dentaires et cavité buccale	19.02.2022 à 09 :00	400, Tlemcen Aucune pathologie
04	12	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	26.02.2022 à 07 :00	Chetouane, Tlemcen Caries dentaires
05	10	F	Surfaces dentaires et cavité buccale	26.02.2022 à 08 :00.	Makhoukh, Tlemcen Caries dentaires
06	11	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	26.02.2022 à 08:30	400, Tlemcen Caries dentaires
07	1	F	Surfaces dentaires et cavité buccale	02.03.2022 à 09 :00	Beni snous, Tlemcen Aucune pathologie
08	11	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	05.03.2022 à 08 :30	Chetouane, Tlemcen Caries dentaires
09	5	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	05.03.2022 à 07 :00	Makhoukh, Tlemcen Caries dentaires
10	9	F	Surfaces dentaires et cavité buccale	05.03.2022 à 07 :15	Makhoukh, Tlemcen Aucune pathologie
11	13	G	Surfaces dentaires et cavité buccale	05.03.2022 à 07 :30	Makhoukh, Tlemcen Caries dentaires
12	8	F	Surfaces dentaires et cavité buccale	05.03.2022 à 08 :00	Maghnia, Tlemcen Caries dentaires

2. Identification :

Annexe N°2.1

Différence entre les Staphylococcus et les Micrococcus

Tests	Staphylococcus	Micrococcus
Oxydase	-	+
Bacitracine	(R)	(S)
TSI	+	-

R: Résistant

S: Sensible

Annexe N°2.2

Caractères macroscopiques des souches bactériennes isolées de la cavité buccale.

Prélèvements positifs	Aspect macroscopique des souches
01 et 02	<ul style="list-style-type: none">• Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés• Colonies blanches de petite taille, d'aspect lisse
03	Petites colonies blanches d'aspect lisse
04	Petites colonies blanches d'aspect lisse
05	Colonies blanches, de petite taille et d'aspect lisse
06 et 07	<ul style="list-style-type: none">• Petites colonies blanches, d'aspect lisse• Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés
08	Petites colonies blanches, d'aspect lisse
09 et 10	<ul style="list-style-type: none">• Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés• Colonies blanches, de petite taille et d'aspect lisse
11	Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés
12 et 13	<ul style="list-style-type: none">• Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés• Colonies blanches, de petite taille et d'aspect lisse
14	Colonies jaunes de petite taille, lisses et bombés

Annexe N°2.3

Cultures de *Staphylococcus* spp sur gélose Chapman.

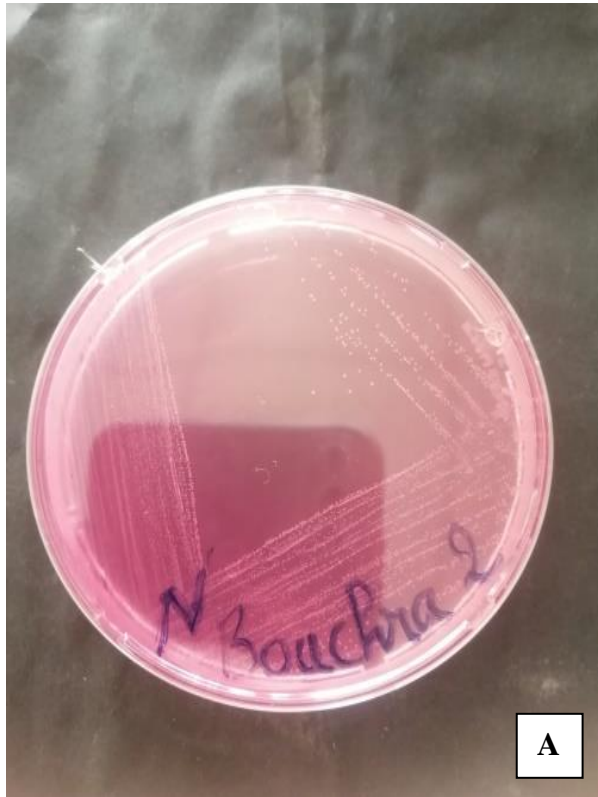


Photo N°1: Staphylocoques blanches

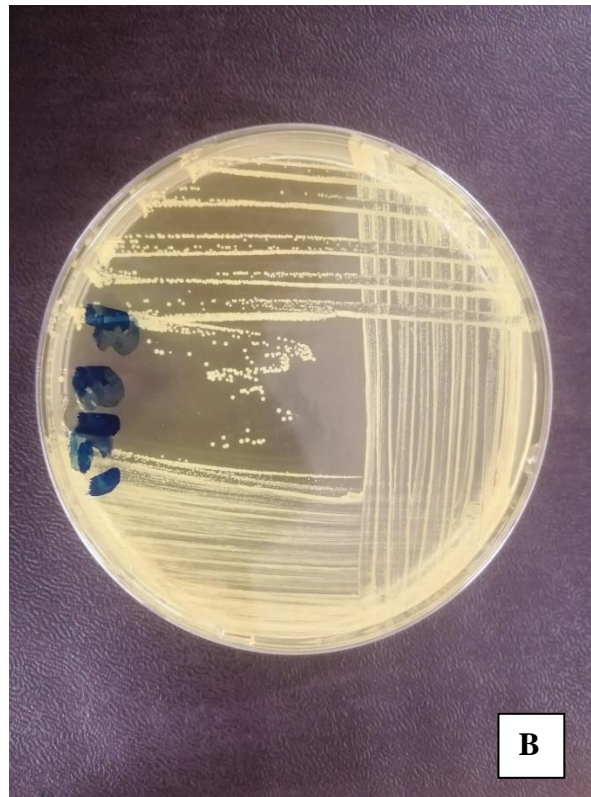


Photo N°2: Staphylocoques dorées

Annexe N°2.4

Résultats des différents tests d'identification



Photo N°3: test catalase positif.



Photo N°4: test TSI positif.



Photo N°5: test coagulase positif.

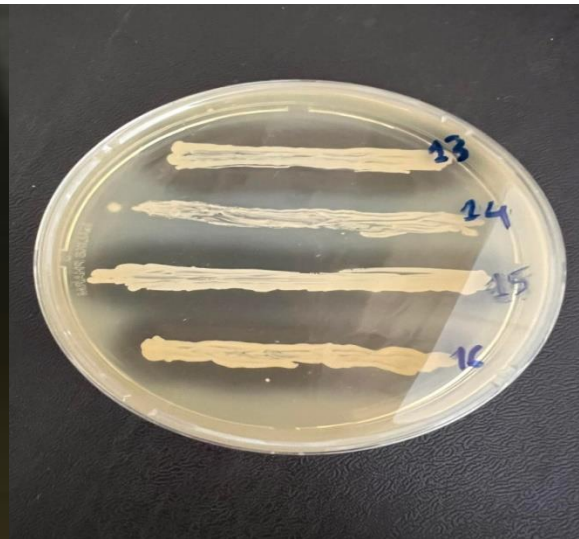


Photo N°6: test DNase

3. Antibiogramme

Annexe N°3.1

Liste des antibiotiques testés

<i>Staphylococcus</i>	
Antibiotique testé	Charge des disques
Pénicilline G	10 μ g
Vancomycine	5 μ g
Erythromycine	15 μ g
Bacitracine	10 μ g
Tétracycline	30 μ g

Annexe N°3.2

Antibiogramme

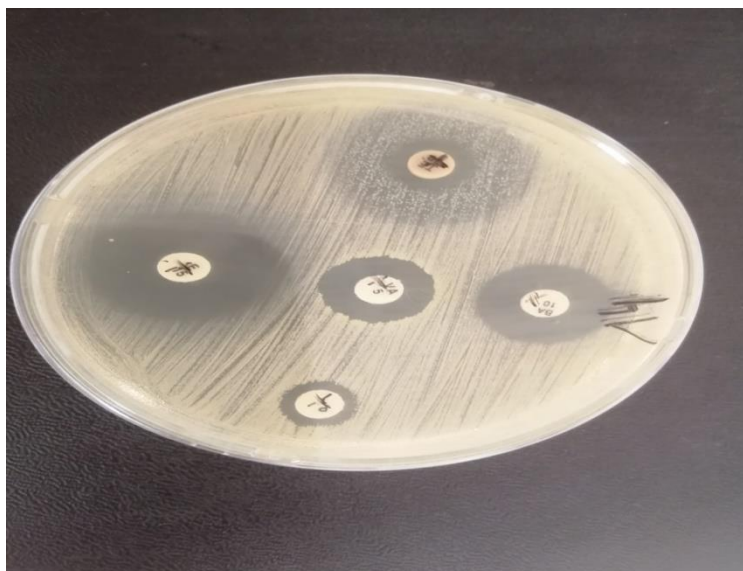


Photo N°7 : Antibiogramme de *Staphylococcus aureus*.

4. Formation de biofilm in vitro

Annexe N°4.1

Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet

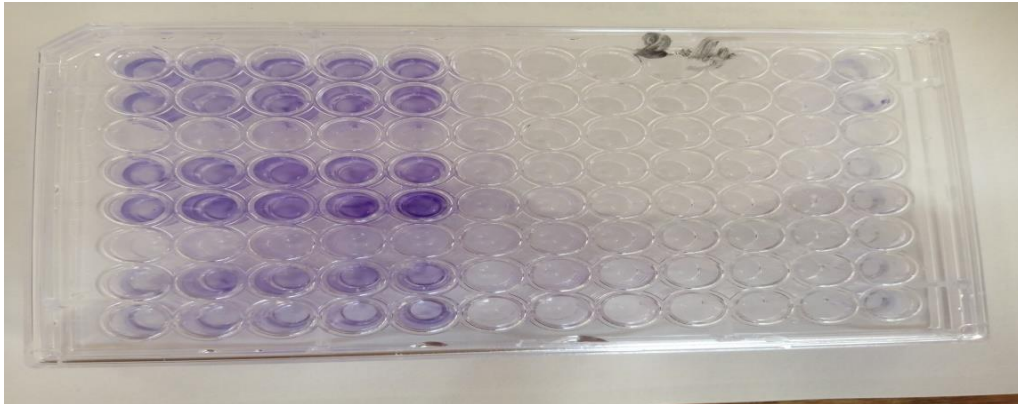


Photo N°8 : Biomasse de biofilm bactérienne par la méthode de Crystal violet