République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr Belkaïd Tlemcen

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

Département de Biologie

Laboratoire :

Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique

Mémoire

Présenté Par

Mlle. RABAHI Fatouma

En vue de l'obtention du :

Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Contribution à l'étude de la flore microbienne de la cavité buccale chez les enfants de la région de Maghnia.

Soutenu le 03 / 07 /2024, devant le jury composé de :

Présidente	Pr Boucherit-Otmani Zahia	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	Dr Seghir Abdelfettah	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr Merghache-Bouhafsi Djamila	MCA	Université de Tlemcen
Examinatrice	Dr Hassaine-Lahfa Imane	MAB	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2023/2024

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. »

Remerciement

J’adresse mes sincères remerciements à Monsieur Seghir Abdelfettah, maître de conférences classe A au département de biologie de l’université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour m’avoir donné l’opportunité de travailler sur ce sujet, pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils durant la préparation de ce mémoire.

Je tiens à remercier vivement Madame Boucherit-Otmani Zahia, professeur au département de biologie de l’université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour m’avoir fait l’honneur de présider ce jury, ainsi que pour tous les efforts déployés et la qualité de l’enseignement tout au long de mon parcours universitaire.

Je suis également reconnaissante à Madame Bouhafsi-Merghache Djamila, maître de conférences classe A au département de biologie de l’université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. C’est un immense honneur que vous me faites en acceptant de faire partie de ce jury.

J’exprime ma profonde gratitude à Madame Hassaine-Lahfa Imane, maître assistant classe B au département de biologie de l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, pour sa disponibilité, ses conseils, ses remarques et ses suggestions, qui m’ont permis de compléter ce travail, ainsi que pour avoir accepté de faire partie de ce jury.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Madame Bekhechi Chahrazed, professeur à l'université de Tlemcen, pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire « Produits Naturels ». Grâce à sa bienveillance, j'ai pu extraire l'huile essentielle de thym dans des conditions optimales.

Je souhaite exprimer ma gratitude envers Mlle Laoudj Nadia et Mlle Lakhal Hafsa, doctorantes au laboratoire « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab) », pour leur précieux soutien et leurs conseils lors de la réalisation des expériences.

Enfin, je remercie toutes celles et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

Du fond de mon cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers ;

À mes chers parents Mohammed et Rafika, dont l'amour, le soutien, les encouragements et les sacrifices ont illuminé chacune de mes journées. Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai jamais vous remercier comme il se doit.

À mon cher petit frère Chakib, qui m'a soutenu moralement dans les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail. Avec tous mes vœux pour qu'il réussisse dans sa vie.

À mon cher grand-père Larbi, paix à son âme, qui a toujours été fier de moi, qui m'a toujours accordé l'amour dont j'ai besoin.

À ma chère tante Naoual, « mon âme sœur », et à toutes mes tantes et oncles.

« Fatouma »

ملخص :

يعكس تجويف الفم الحالة الصحية للطفل، حيث تستعمره أكثر من 50 مليار من الكائنات المجهرية، والتي تنتمي إلى أكثر من 500 نوع مختلف وتتوزع على أكثر من 20 جنسًا متميزًا، لهذه المجهريات القدرة على تشكيل تجمعات متعددة الخلايا أكثر مقاومة، تعرف باسم «الأغشية الحيوية». على عكس المضادات الحيوية التجارية والأدوية المضادة للفطريات، أثبتت النباتات الطبية فعاليتها دون التسبب في آثار جانبية غير مرغوب فيها.
تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتحديد مختلف أنواع البكتيريا والفطريات الموجودة في التجويف الفموي للأطفال في منطقة مغنية، بالإضافة إلى تقييم النشاط المثبط لتشكل الاغشية الحيوية لزيت الزعتر الأساسي في المختبر ضد اغشية أحادية ومتعددة الأنواع.
أظهرت النتائج المتحصل عليها أنه من بين 44 عينة تم جمعها، كانت 27٪ تحتوي على بكتيريا موجبة الجرام، و3٪ عن تحتوي على خمائر، و55٪ عن تحتوي على بكتيريا موجبة الجرام و معها خميرة، و5٪ تحتوي على بكتيريا موجبة الجرام و معها بكتيريا سالبة الجرام و10٪ تحتوي على المجموعات الثلاث معا.كما بلغ مردود عملية استخلاص زيت الزعتر الأساسي 1.8241٪ مع قوة مثبطة معتبرة لاكن بدرجات متفاوتة من سلالة إلى أخرى.

الكلمات الرئيسية: تجويف الفم، الأغشية الحيوية، النباتات الطبية، المضادات الحيوية، مضادات الفطريات، الزيت العطري، النشاط المضاد للغشاء الحيو

Résumé :

La cavité buccale représente toujours le reflet de la bonne santé de l'enfant, tandis qu'elle est colonisée par plus de 50 milliards de bactéries, appartenant à plus de 500 espèces différentes et réparties en plus de 20 genres distincts, qui vont former des agrégats multicellulaires plus résistants aux agents antimicrobiens, dits « biofilms ». Contrairement aux antibiotiques et aux antifongiques commerciaux, les plantes médicinales ont démontré leur efficacité sans provoquer d'effets secondaires indésirables.

La présente étude vise à isoler et identifier différentes espèces bactériennes et fongiques présentes dans la cavité buccale des enfants de la communauté de la région de Maghnia, ainsi qu'à évaluer *in vitro* l'activité antibiofilm de l'huile essentielle de thym contre des biofilms mono et multi-espèces par la méthode d'aromatogramme et la méthode de micro-dilution sur microplaque.

Les résultats obtenus ont montré que sur 44 échantillons prélevés, 27 % sont altérés par des bactéries à Gram positif, 3 % par des levures, 55 % par des bactéries à Gram positif associées à des levures, 5 % par des bactéries à Gram positif associées à des bactéries à Gram négatif, et enfin 10 % par une combinaison de bactéries à Gram positif, à Gram négatif et de levures.

Le rendement de l'huile essentielle de thym est de 1,8241 % avec un pouvoir inhibiteur significatif à différents degrés selon les souches.

Mots clés : Cavité buccale, biofilm, plantes médicinale, antibiotiques, antifongiques, huile essentielle, activité anti-biofilm.

Abstract:

The oral cavity still reflects the good health of the child, while it is colonized by more than 50 billion bacteria, belonging to more than 500 different species and distributed into more than 20 distinct genera, which will form more resistant multicellular aggregates to antimicrobial agents, known as 'biofilm'. Unlike commercial antibiotics and antifungal drugs, medicinal plants have proven their effectiveness without causing undesirable side effects.

This study aims to isolate and identify different bacterial and fungal species present in the mouth cavity of children from the Maghnia community, as well as to evaluate in vitro the anti-biofilm activity of thyme essential oil against mono- and multi-species biofilms using the aromatogram and micro-dilution methods on microplates.

The results obtained showed that out of 44 samples collected, 27% were altered by Gram-positive bacteria, 3% by yeasts, 55% by Gram-positive bacteria associated with yeast, 5% by Gram-negative bacteria, and 10% by a combination of Gram-positive, Gram-negative, and yeast bacteria. The yield of thyme essential oil is 1.8241% with significant inhibitory power at varying degrees from one strain to another.

Keywords: Oral cavity, biofilm, medicinal plants, antibiotics, antifungal, essential oil, anti-biofilm activity.

Table des matières

Première partie Synthèse bibliographique .....……..……...….. 2

Deuxième partie Matériel et méthodes ……..…..…….……..… 6

1. Prélèvements ……..……. 6
2. Isolement et purification ……... 6
3. Identification des souches microbiennes ……...……. 7
4. Extraction de l'huile essentielle ……...…… 7

4.1.Détermination de rendement en huile essentielle …..…….…. 8

5. Aromatogramme ……..……. 8
6. Inhibition de la formation de biofilm par l'huile essentielle de thym ……..…… 9

6.1. Préparation des inocula …….. 9

6.2. Préparation de la gamme de l'huile de thym …….. 9

6.3.Inhibition de la formation des biofilms mono-espèce sur microplaques ……...… 10

6.4.Inhibition de la formation des biofilms multi-espèces sur microplaques …… 10

7. Mesure de la biomasse dans le biofilm par la coloration au Crystal violet …… 10

Troisième partie Résultats et discussion ...……...……. 12

1. Prélèvements ……..……... 13
2. Identification préliminaire des microorganismes ……..…….. 14

2.1. Répartition des patients en fonction du sexe et des groupes microbiens isolés …….. 15

2.2. Répartition des patients en fonction des tranches d'âges et des groupes microbiens isolés …….. 16

2.3.Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et du poids des patients … 17

2.4.Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la fréquence de brossage des dents …….. 18

2.5.Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et du type de dentifrices utilisés ……..……... 19

2.6.Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la consommation des antibiotiques ……. 20

2.7.Répartition des patients en fonction de leur état de santé ……..….. 21

2.8.Répartition des patients en fonction des maladies bucco-dentaire …… 22

2.9.Répartition des patients en fonction de l'adoption des animaux …….. 23

3. Déterminantion du rendement de l'extraction de l'huile essentielle de thym …….. 24

4. Aromatogramme …… 24

5. Inhibition de la formation de biofilm par l'huile essentielle de thym …….. 25

Quatrième partie Conclusion et perspectives ……..…….……. 29

Cinquième partie Références bibliographiques ……..…….…… 31

Sixième partie Annexes ……..…… 42

Liste des tableaux

Tableau N°1 : Répartition des patients en fonction du sexe et des groupes microbiens isolés…… 15

Tableau N°2 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la consommation des antibiotiques (atb) 20

Tableau N°3 : Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *T. vulgaris* vis-à-vis des souches sélectionnées 24

Liste des figures

Figure N° 1 : Taux de prélèvement positif dans la cavité buccale des enfants communautaires…. 13

Figure N° 2 : Identification préliminaire des microorganismes isolés 14

Figure N° 3 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et les tranches d'âge..... 16

Figure N° 4 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et du poids des patients… 17

Figure N° 5 : Répartition des groupes microbiens en fonction de la fréquence de brossage des dents 18

Figure N° 6 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et du type de dentifrices utilisés..... 19

Figure N° 7 : Fréquence des patients en fonction de leur état de santé..... 21

Figure N° 8 : Répartition des patients en fonction maladies bucco-dentaires..... 22

Figure N° 9 : Répartition des patients en fonction de l'adoption des animaux..... 23

Figure N° 10 : Biomasses des biofilms constitués d'une ou plusieurs espèces après inhibition par l'huile essentielle de thym 26

Liste des photos

Photo N° 1 : Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale……. 2

Photo N° 2 : Formation de biofilm buccale sur la surface des dents 3

Photo N° 3 : Montage de l'appareil d'hydrodistillation lors de l'extraction de l'huile essentielle de thym.....7

Liste des abréviations

Atb : Antibiotique.

BHIB : Brain Heart Infusion Broth.

DO : Densité optique.

EPS : Substances exopolymériques.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

PBS : Tampon phosphate salé.

Rdt : Rendement en huile essentielle.

TSB : Tryptic Soy Broth.

TSI : Triple Sugar Iron Agar.

Première partie

Synthèse bibliographique

La cavité buccale est l'espace anatomique dédié à l'ingestion, à la mastication des aliments et à leur mélange avec la salive. Elle assume également la fonction de voie respiratoire secondaire, participe à la production sonore pour la parole, et agit en tant qu'organe chimio-sensoriel **(Van T et Staecker H, 2006 ; Standring, 2015).**

Cette partie anatomique importante abrite une flore commensale constituée de divers micro-organismes. Ces derniers sont influencés par le contact avec l'air, les aliments et d'autres facteurs, ce qui contribue à créer une diversité microbienne au niveau de la cavité buccale **(Philip D *et al*., 2009 ; Scannapieco et Frank A, 2013).**

La flore buccale comprend une variété de micro-organismes, notamment des coques Gram positifs, comme les streptocoques, qui représentent plus de 20 % de cette flore. Les *Streptococcus mutans* sont connus pour leur rôle dans la formation des caries, tandis que *Streptococcus mitis* est associé à la plaque dentaire. Parmi les autres micro-organismes de cette flore, on trouve également des bacilles et des filaments Gram positifs, tels qu'*Actinomyces*, *Lactobacillus* et *Eubacterium*.

En plus de ces Gram positifs, des coques Gram négatifs, tels que *Neisseria* et *Veillonella*, ainsi que des bacilles Gram négatifs comme *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Porphyromonas* et *Fusobacterium*, enrichissent également la diversité microbienne.

La présence de levures, principalement *Candida albicans*, est une caractéristique notable de cette flore buccale. De plus, la présence de spirochètes, de mycoplasmes et de quelques virus contribue à la complexité de cette communauté microbienne **(Chardin H *et al*., 2006 ; Philip D *et al*., 2009).**

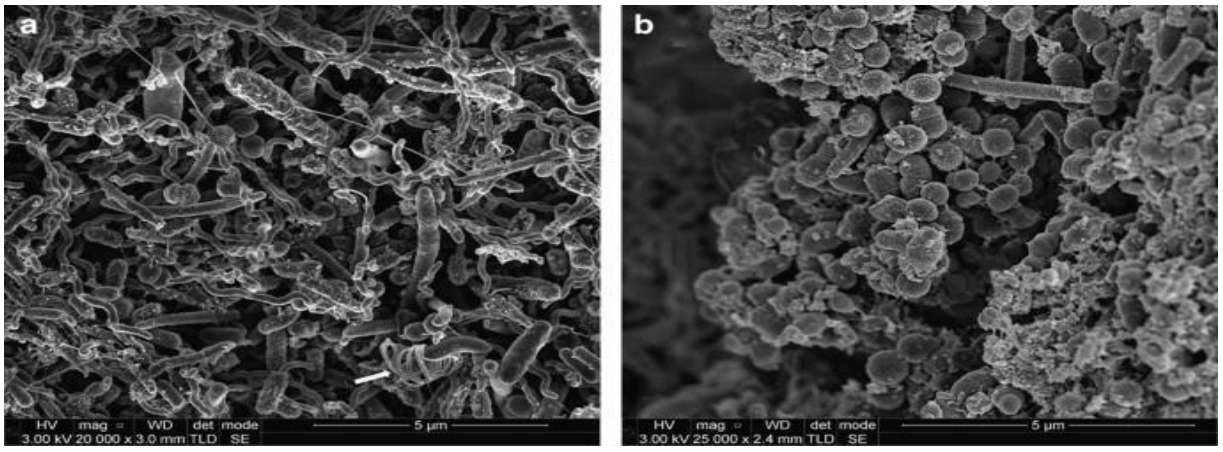


Photo N°1 : Micrographies électroniques à balayage de la plaque dentaire sous-gingivale **(Holliday R *et al*., 2015).**

La diversité des microorganismes est influencée par divers facteurs, notamment l'âge, les habitudes alimentaires, l'hygiène buccale et les traitements médicaux **(Filoche S *et al*., 2010)**. Ces derniers peuvent entraîner une dysbiose, perturbant ainsi le microbiote commensal. Cela peut se manifester lors de diverses affections systémiques telles que l'asthme, le diabète, l'obésité et l'hypertension **(Kitamoto S *et al*., 2020 ; Păunică I *et al*., 2023).**

Les microorganismes présents dans la cavité buccale ont la capacité de s'attacher aux dents, formant ainsi des biofilms buccaux communément appelés « plaque dentaire » **(photo N°2)**. Ces biofilms sont constitués d'une accumulation de microorganismes, de cellules, de composants de la salive et de résidus alimentaires **(Garnier M *et al*., 2017).**

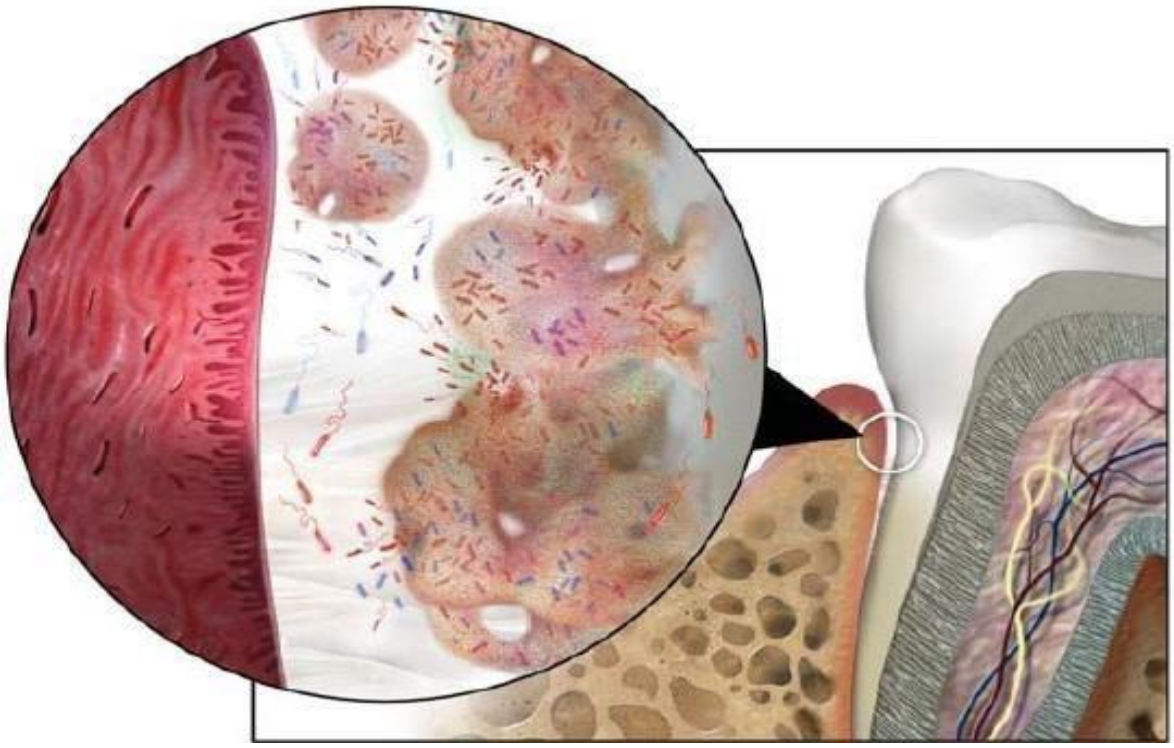


Photo N°2 : Formation de biofilm buccal sur la surface des dents **(Gurenlian, J, 2007).**

Ces structures multicellulaires peuvent atteindre une masse d'environ 20 grammes. Sachant qu'un milligramme de plaque dentaire contient environ 100 millions de microorganismes **(Kerner S, 2005 ; Roberts A, 2005).**

Il est largement admis que la formation de biofilm implique une cascade d'étapes, comprenant l'attachement des cellules à la surface, la formation de micro-colonies, la production de substances exopolymériques (EPS), et finalement la dispersion du biofilm, libérant ainsi des cellules

planctoniques pour initier un nouveau cycle. Ce processus est gouverné par un mécanisme connu sous le nom de Quorum Sensing, **(Beloin C et McDougald D, 2021 ; Piruthiviraj P et *al*., 2024).**

Ce processus augmente la virulence des microorganismes en rendant les biofilms bucco-dentaires hautement résistants, capables de coloniser plusieurs surfaces et de s'adapter à diverses conditions physico-chimiques **(Lebeaux D et Ghino J, 2012)**. Cela fait des infections bucco-dentaires un défi majeur en matière de santé publique et figurent parmi les maladies non transmissibles les plus répandues. Souvent invisibles et insidieuses, elles touchent toutes les tranches d'âge à travers le monde. Ces infections peuvent causer des douleurs de différentes intensités, des déformations des dents et, dans des cas extrêmes, entraîner la mort **(OMS, 2018)**.

La prévention et le traitement de ces infections reposent principalement sur l'élimination régulière du biofilm grâce à des mesures d'hygiène bucco-dentaire **(Larsen T et Fiehn N, 2017)**. Cependant, l'élimination de ces biofilms buccaux demeure difficile en raison de leur capacité à tolérer des doses élevées de biocides (antibiotiques ou antiseptiques), y compris ceux présents dans les dentifrices et les bains de bouche, tels que l'amoxicilline, la doxycycline et le métronidazole **(Larsen T et Fiehn N, 1996 ; Larsen T, 2002 ; Lebeaux D., et Ghigo J., 2012).**

Ainsi, les recherches actuelles se concentrent sur la phytothérapie pour surmonter la résistance des biofilms, tout en évitant les effets secondaires et la résistance bactérienne. Les extraits de plantes médicinales, y compris les huiles essentielles et les composés phénoliques, utilisés depuis l'Antiquité en médecine traditionnelle, sont de plus en plus considérés comme des solutions thérapeutiques prometteuses **(Saad D et *al*., 2023).**

En nous appuyant sur les éléments précédemment cités, nous avons défini les objectifs de cette étude comme suit : Dans un premier temps, isoler et identifier les différentes espèces bactériennes et fongiques présentes dans la cavité buccale des enfants de la communauté de la région de Maghnia ; dans un second temps, évaluer *in vitro* l'activité anti-biofilm de l'huile essentielle de thym contre des biofilms mono-espèces et multi-espèces.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail a été réalisé au laboratoire Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

1. Prélèvements :

Les 44 échantillons ont été prélevés chez des enfants âgés de 2 à 16 ans, entre novembre 2023 et février 2024, au sein de la communauté locale, au service de pédiatrie de l'établissement public hospitalier et à l'établissement public de santé de proximité de Maghnia.

Pour chaque patient, nous avons utilisé deux écouvillons : l'un pour frotter les surfaces dentaires et interdentaires, et l'autre pour la muqueuse buccale. Chaque écouvillon a été immédiatement recueilli dans un tube sec stérile. Chaque patient a répondu à une série de questions et a donné son consentement éclairé **(Annexe N°1 et Annexe N°2)**.

Une fois prélevés, 3000 µL d'eau physiologique stérile ont été ajoutés à chaque tube. Ensuite, les tubes ont été agités à l'aide d'un vortex pendant 2 minutes. Pour chaque tube, 100 µL de la solution ont été répartis de la manière suivante : d'une part, dans des tubes Eppendorf contenant 900 µL de Sabouraud liquide pour la recherche des levures ; d'autre part, 100 µL ont été ajoutés dans des tubes contenant 900 µL de BHIB pour la recherche des bactéries. Les tubes ont ensuite été incubés dans une étuve pendant 24 à 48 heures, voire jusqu'à 72 heures, à 37 °C **(Seghir A, 2015).**

2. Isolement et purification

Chaque échantillon présentant un trouble est inoculé sur des boîtes de Petri contenant des milieux de culture MacConkey, Chapman (pour les bactéries) ainsi que de la gélose Sabouraud (pour les levures), puis incubé pendant 24 à 72 heures à des températures de 37 °C et 35 °C, respectivement. Une colonie est prélevée de la gélose, repiquée dans le milieu liquide stérile et incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures. Chaque souche pure est ensemencée sur gélose inclinée en tube, puis incubée à 37 °C pendant 24 à 48 heures et conservée à +4 °C.

3. Identification des souches microbiennes :

Après avoir effectué des tests préliminaires, y compris l'observation microscopique, la coloration de Gram, le test TSI et la culture sur le Candida CHROM-Agar®, nous avons utilisé le système VITEK® VK2C17756 pour identifier les souches sélectionnées.

4. Extraction de l'huile essentielle :

L'extraction de l'huiles essentielle a été effectuée au sein du laboratoire des Produits Naturels LAPRONA de l'Université Abou Bekr Belkaïd de Tlemcen.

L'extraction de l'huile essentielle a été réalisée par hydrodistillation classique des parties aériennes séchées de thym (300 g) **(photo N° 3)**. La matière végétale a été mélangée avec de l'eau dans un ballon de 2 litres, puis le mélange a été porté à ébullition pendant 2 heures. Afin de prévenir toute détérioration causée par l'air ou la lumière, les huiles essentielles ont été stockées dans des tubes en verre à hémolyse à une température de 4 ± 1 °C, à l'abri de la lumière.

Photo N° 3 : Montage de l'appareil d'hydrodistillation lors de l'extraction de l'huile essentielle de thym.

4.1. Détermination de rendement en huile essentielle de thym :

Le rendement en huile essentielle se définit comme le quotient entre la masse de l'huile essentielle obtenue et la masse du matériau végétal sec traité. Cette mesure est calculée selon la formule suivante :

$$Rdt\ \% = M/M_0 \times 100$$

Rdt % : Rendement en huile essentielle

M : Masse de l'huile essentielle récupérée (g)

$\mathbf{M_0}$: Masse de matière végétale à traiter (g)

5. Aromatogramme :

Il s'agit d'une approche visant à évaluer le pouvoir antimicrobien des huiles essentielles, analogue à un antibiogramme où les antibiotiques sont remplacés par les huiles essentielles **(Ould Amer I, 2024)**.

Cette méthode implique l'ensemencement en surface, à l'aide d'un écouvillon stérile, de l'inoculum dans des boîtes de Müller-Hinton, suivie du dépôt d'un disque de cellulose stérile (diamètre 6 mm/Watman n° 40) imprégné préalablement de 5 µL de l'huile essentielle de thym pure. Les boîtes sont ensuite laissées à une température ambiante pendant 30 minutes, puis retournées et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

6. Inhibition de la formation de biofilm par l'huile essentielle de thym :

Ce test a été effectué sur trois souches microbiennes, comprenant une levure, une bactérie Gram-positive et une bactérie Gram-négative. Ces souches ont été isolées chez un enfant diabétique présentant à la fois une gingivite et des caries dentaires.

6.1. Préparation des inocula

Pour la levure, quelques colonies ont été suspendues dans 1 mL de milieu Sabouraud liquide. Après une incubation à 35°C pendant 24 heures, la suspension a été centrifugée à 3000 g pendant 5 minutes à trois reprises. Le culot a été lavé après les deux premières centrifugations avec du tampon phosphate salé (PBS) à une concentration de 0,1 M et un pH de 7,4 **(Pierce G *et al*., 2008)**. La concentration initiale de cellules a été établie à 10^6 UFC/mL par dénombrement des levures sur une cellule de Thomas, puis la suspension a été ajustée dans le milieu Tryptic Soy Broth (TSB**) (Seddiki S *et al*., 2010).**

Pour les bactéries, la pré-culture de la souche a été réalisée dans 1 mL de milieu Brain Heart Infusion (BHIB). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, la suspension a été centrifugée à 1000 g pendant 15 minutes à trois reprises. Le culot a été lavé après les deux premières centrifugations avec du PBS à une concentration de 0,1 M et un pH de 7,4. Les souches bactériennes ont été ajustées à 10^8 UFC/mL en lisant la densité optique à une longueur d'onde de 625 nm à l'aide d'un colorimètre, ce qui devait être 0,5 McFarland (entre 0,08 et 0,13) **(Daghbouche S *et al*., 2017).**

6.2. Préparation de la gamme de l'huile essentielle de Thym :

Un volume de 229,33 µL de l'huile essentielle de thym a été aseptiquement solubilisé dans 135,33 µL de DMSO pour dissoudre l'huile, auxquels ont été ajoutés 135,33 µL de Tween 80 pour homogénéiser le mélange. Ensuite, le mélange a été agité par un vortex. Il a ensuite été soumis à une cascade de dilution de 1/2, puis à une autre dilution de 1/25, permettant d'obtenir 12 concentrations allant de 8 mg/ml à 3,90625 µg/ml.

6.3. Inhibition de la formation des biofilms mono-espèce sur microplaques :

Dans chaque puits d'une microplaque à 96 puits, 50 µL de la suspension bactérienne ou levurienne sont ajoutés à 50 µL de l'huile essentielle de thym. L'avant-dernier puits contient un volume de 50 µL de milieu TSB et 50 µL de la suspension, représentant ainsi le contrôle positif, tandis que le dernier puits contient 100 µL de milieu TSB seul, agissant comme contrôle négatif. La plaque est ensuite scellée et incubée à 35°C pendant 24 heures.

6.4. Inhibition de la formation des biofilms multi-espèces sur microplaques :

Dans chaque puits de la plaque, on ajoute 100 µL de l'huile essentielle de thym, suivi de 33 µL de la suspension levurienne et de 33 µL de chaque suspension bactérienne (Gram positif et Gram négatif). Une ligne de puits est réservée au contrôle négatif, contenant 200 µL de TSB. Dans une autre série de puits, on trouve le contrôle positif pour les trois souches combinées, ainsi que pour chaque souche individuellement.

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

Après l'incubation, les puits sont rincés trois fois avec 200 µL de PBS pour éliminer les bactéries sous forme planctonique. Ensuite, 100 µL de méthanol sont ajoutés aux puits de la microplaque et incubés pendant 15 minutes à température ambiante afin de fixer le biofilm formé. Ce dernier est ensuite coloré en ajoutant 100 µL de cristal violet pendant 20 minutes. Enfin, 150 µL d'acide acétique (33 %) sont ajoutés pour mesurer la densité optique au moyen d'un lecteur de microplaque (Biochrom Asys UVM340) à une longueur d'onde de 590 nm **(Hola V et Ruzicka F, 2011).**

Troisième partie

Résultats et discussion :

Les biofilms buccaux sont des agglomérats de multiples micro-organismes qui forment des environnements complexes et dynamiques, présentant une diversité structurelle associée aux affections buccales. Un nombre croissant d'études établissent une corrélation entre les inflammations chroniques de la cavité buccale et divers problèmes de santé systémiques qui semblent être interdépendants, y compris avec le diabète **(Kurtzman G. *et al*., 2022)**.

Le diabète est la deuxième maladie auto-immune la plus courante chez les enfants, englobant diverses perturbations métaboliques causées par une hyperglycémie chronique **(Păunică I. *et al*., 2023)**. Le microbiome oral des enfants diabétiques diffère considérablement en quantité et en qualité de celui des enfants sains **(Pachoński M. *et al*., 2021 ; Kurtzman G. *et al*., 2022).**

Bien que des mesures préventives soient mises en place, ces biofilms demeurent résistants à l'élimination en raison de leur capacité inhérente à tolérer des doses élevées d'antimicrobiens. Cela a entraîné l'exploration de nouvelles approches, telles que l'utilisation de composés naturels comme base pour les remèdes **(Lebeaux D. & Ghigo J.M., 2012 ; Achi I. & Benremili L., 2016)**.

Selon l'OMS, la médecine traditionnelle sert à entretenir la santé, prévenir, diagnostiquer, traiter et guérir les affections physiques et mentales **(Bensalek F., 2018).**

Le thym (*Thymus vulgaris ; Zaâtar*) est l'une des plantes aromatiques les plus utilisées en thérapeutique depuis des siècles **(Boukhatem M. *et al*., 2014)**. Dans ce cadre, nous allons étudier, dans un premier temps, la flore microbienne de la cavité buccale des enfants de la région de Maghnia et dans un second temps, évaluer l'effet de l'huile essentielle de thym sur la formation des biofilms par quelques micro-organismes isolés chez les sujets étudiés.

1. Prélèvements :

De novembre 2023 à février 2024, nous avons collecté 44 échantillons de la cavité buccale d'enfants âgés de 2 à 16 ans dans la région de Maghnia, à la fois dans les établissements de santé et ailleurs.

Les résultats obtenus après la mise en culture des prélèvements sur des milieux de cultures sélectifs sont présentés dans la **figure N°1.**

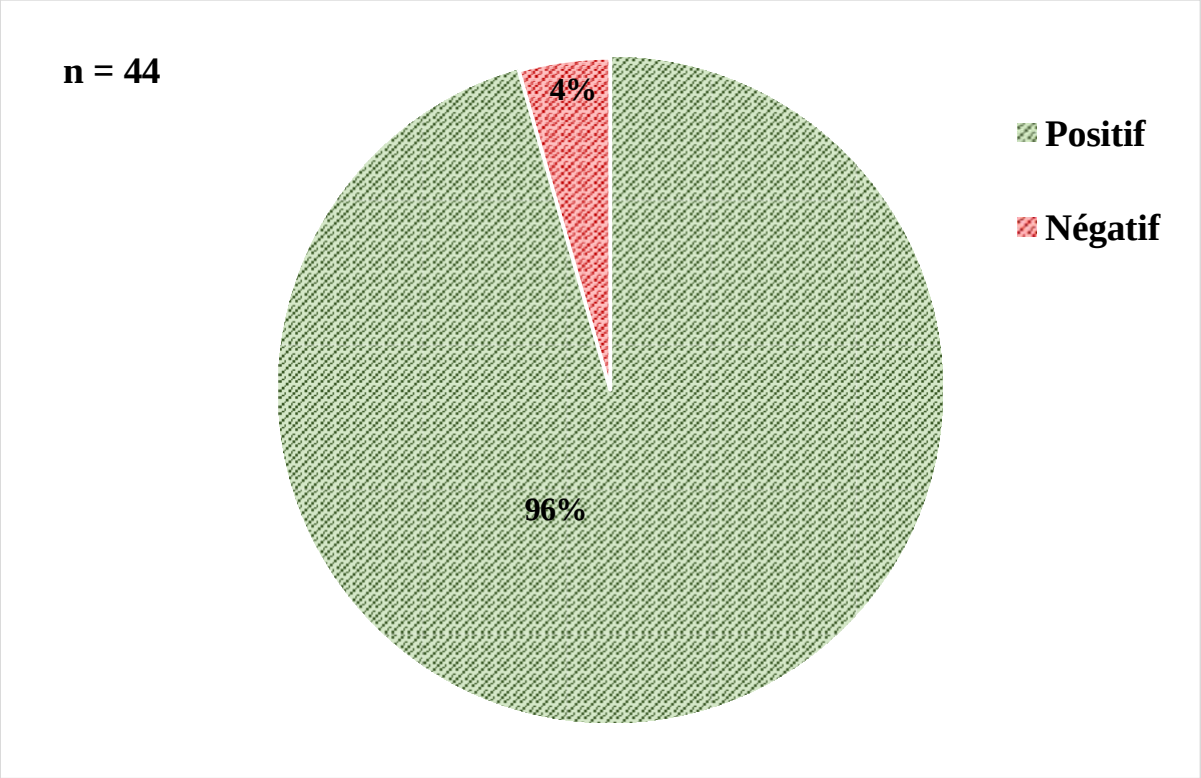


Figure 1 : Taux de prélèvement positif dans la cavité buccale des enfants communautaires.

La figure N°1 indique que 96 % des prélèvements révèlent la présence de microorganismes dans la cavité buccale des patients, tandis que 4 % des prélèvements sont négatifs.

Les travaux de **Piau *et al.* (2016)**, **Mosaddad *et al.* (2019)**, **Hussein, H. (2021)**, et **Gromova *et al.* (2023)**, divers facteurs comme les traitements médicaux tels que les antibiotiques, une bonne hygiène bucco-dentaire incluant le brossage régulier des dents, la diminution de la réponse immunitaire, les prédispositions génétiques et les techniques de prélèvement utilisées peuvent contribuer à expliquer l'absence temporaire de microorganismes dans certains échantillons buccaux.

2. Identification préliminaire des microorganismes :

Les résultats concernant l'identification préliminaire des micro-organismes isolés des prélèvements positifs sont présentés dans la **figure N°2**.

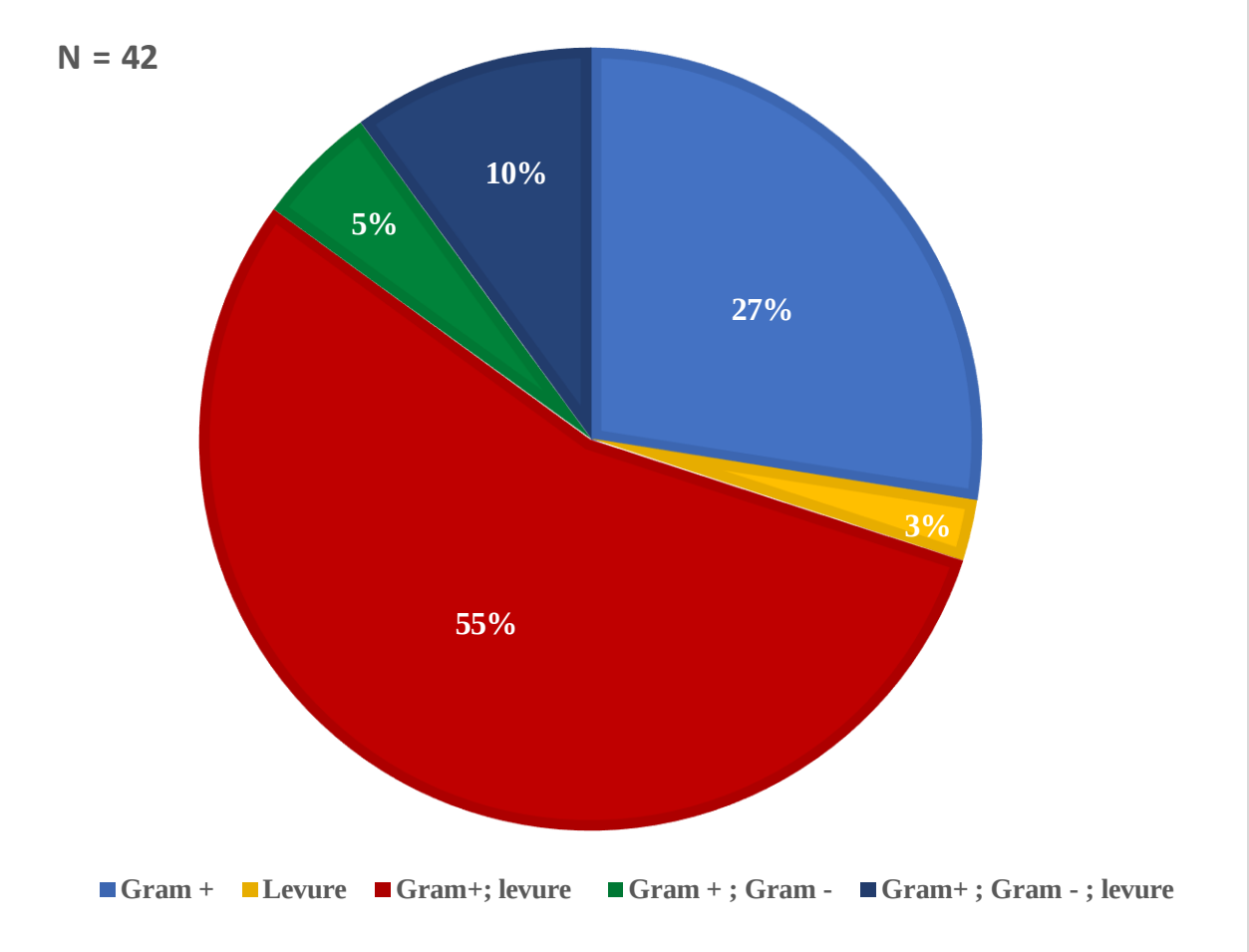


Figure 2 : Identification préliminaire des microorganismes isolés

La figure N° 2 montre que les associations des bactéries à Gram positif associées aux levures sont dominantes parmi nos isolats, représentant 55 % des souches, suivies par les Gram positifs seuls avec 27 %, tandis que les levures seules ne représentent qu'environ 3 %.

Selon Bouzidi S (2020), les bactéries Gram positives prédominent dans la cavité bucco-dentaire des enfants sains, alors que chez les enfants atteints d'infections parodontales, les bactéries Gram négatives sont une préoccupation majeure tant en quantité qu'en qualité dans les différentes zones bucco-dentaires.

Pour les levures, des taux similaires à ceux révélés par notre étude ont été rapportés par **Schmidt-Westenhausen A *et al*. (2004)**, avec une fréquence de 3 %.

2.1. Répartition des patients en fonction du sexe et des groupes microbiens isolés :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction du sexe et du groupe microbien sont représentés sur le **tableau N°1.**

Tableau 1 : Répartition des patients en fonction du sexe et des groupes microbiens isolés

	Gram +	Levure	Gram + ; levure	Gram + ; Gram -	Gram + ; Gram - ; levure	Totale
Filles	**6**	**1**	**13**	**1**	**1**	**22**
Garçons	**6**	**0**	**9**	**1**	**4**	**20**

Le tableau n° 1 montre une similarité dans la prévalence des bactéries à Gram positif, seules ou associées à des bactéries à Gram négatif, chez les deux sexes, avec une absence totale de levures chez les garçons. Selon **Parvinen T. et Larmas M. (1981)**, la présence de levures buccales est plus fréquente chez les filles que chez les garçons, en raison de différences biologiques, notamment l'impact des hormones féminines sur la croissance des levures dans l'environnement buccal.

Le sexe peut être un facteur de différenciation dans la composition microbienne des plaques sous-gingivales **(Zhao J *et al*., 2021)**. Selon **Kawamura M *et al*. (2008)**, la prévalence des groupes microbiens de la cavité buccale chez l'homme dépend du sexe en raison de différences dans les comportements entre les filles et les garçons, tels que l'alimentation, les habitudes de soins bucco-dentaires, les fluctuations hormonales et les facteurs écologiques, ainsi que des différences génétiques

2.2. Répartition des patients en fonction des tranches d'âges et des groupes microbiens isolés :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des tranches d'âge et des groupes microbiens isolés sont représentés dans la **figure n° 3**

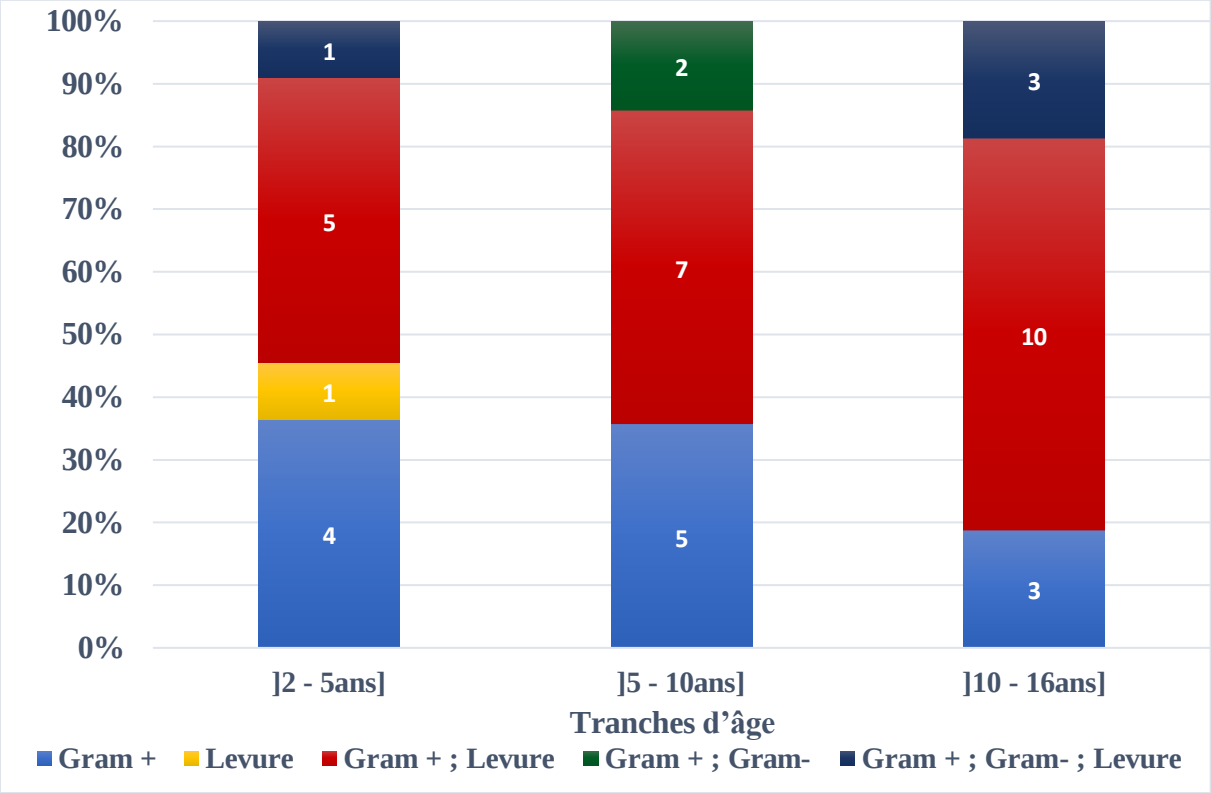


Figure 3 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et les tranches d'âge.

Nous constatons que les levures ne sont présentes que chez les enfants âgés de 2 à 5 ans, tandis que les bactéries Gram positives associées aux Gram négatives ne se trouvent que chez les enfants de 5 à 10 ans. Par ailleurs, les levures associées aux bactéries Gram positives et Gram négatives sont uniquement présentes chez les enfants âgés de 10 à 16 ans.

Nos résultats sont en accord avec les observations de **Klapisz-Wolikow M et Lejeune M (1981)**, qui ont constaté que les enfants âgés de 10 à 16 ans ont tendance à avoir une plus grande quantité de microorganismes dans la cavité buccale. Selon **Xu X *et al.* (2015)**, les groupes microbiens buccaux varient fréquemment selon l'âge. La variabilité microbienne dans la cavité buccale est influencée par l'âge de l'enfant en raison des variations dans le développement et la maturation de la flore buccale, de l'apparition des dents, des facteurs environnementaux, de la diminution de l'hygiène bucco-dentaire et des différences génétiques **(Sedghi L *et al.*, 2021)**.

2.3. Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et du poids des patients :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des groupes microbiens et du poids des patients sont représentés dans la **figure N° 4**

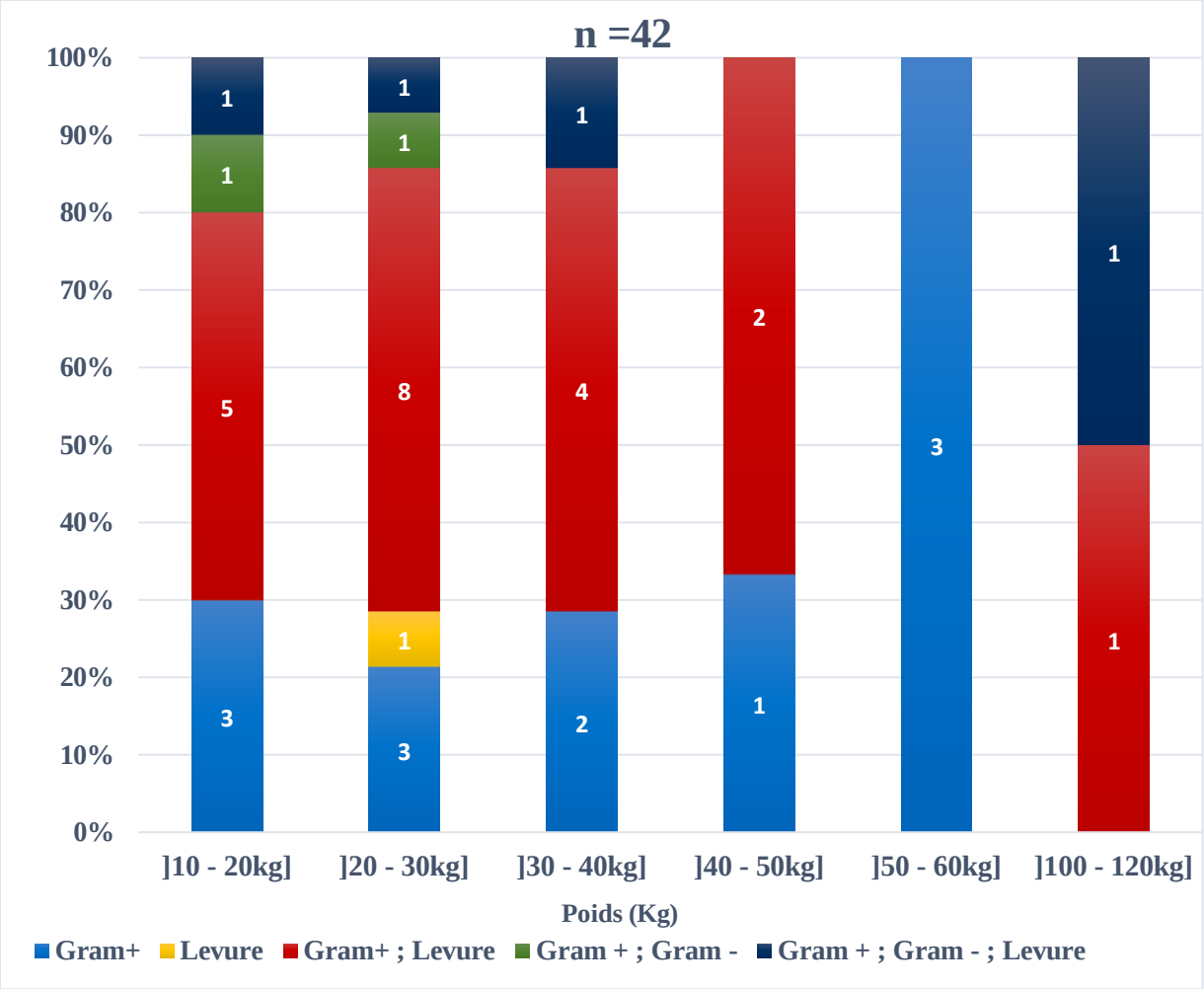


Figure 4 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens et du poids des patients.

La figure n° 4 indique que les levures seules et les bactéries à Gram positif associées à des Gram négatifs ne se trouvent que chez les enfants de faible poids (de 10 à 30 Kg), avec une prédominance des levures associées à des Gram positifs dans presque tous les intervalles de poids.

Selon **Lemos, G *et al*. (2022)**, la variété de la flore orale est liée à la masse corporelle de l'enfant ou de l'adolescent.

Les enfants obèses présentent souvent une diversité microbienne réduite et différente par rapport aux enfants de poids normal **(Borgo, F *et al.*, 2017)**.

2.4. Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la fréquence de brossage des dents :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des groupes microbiens et la fréquence quotidienne de brossage des dents sont représentés sur la **figure n° 5**

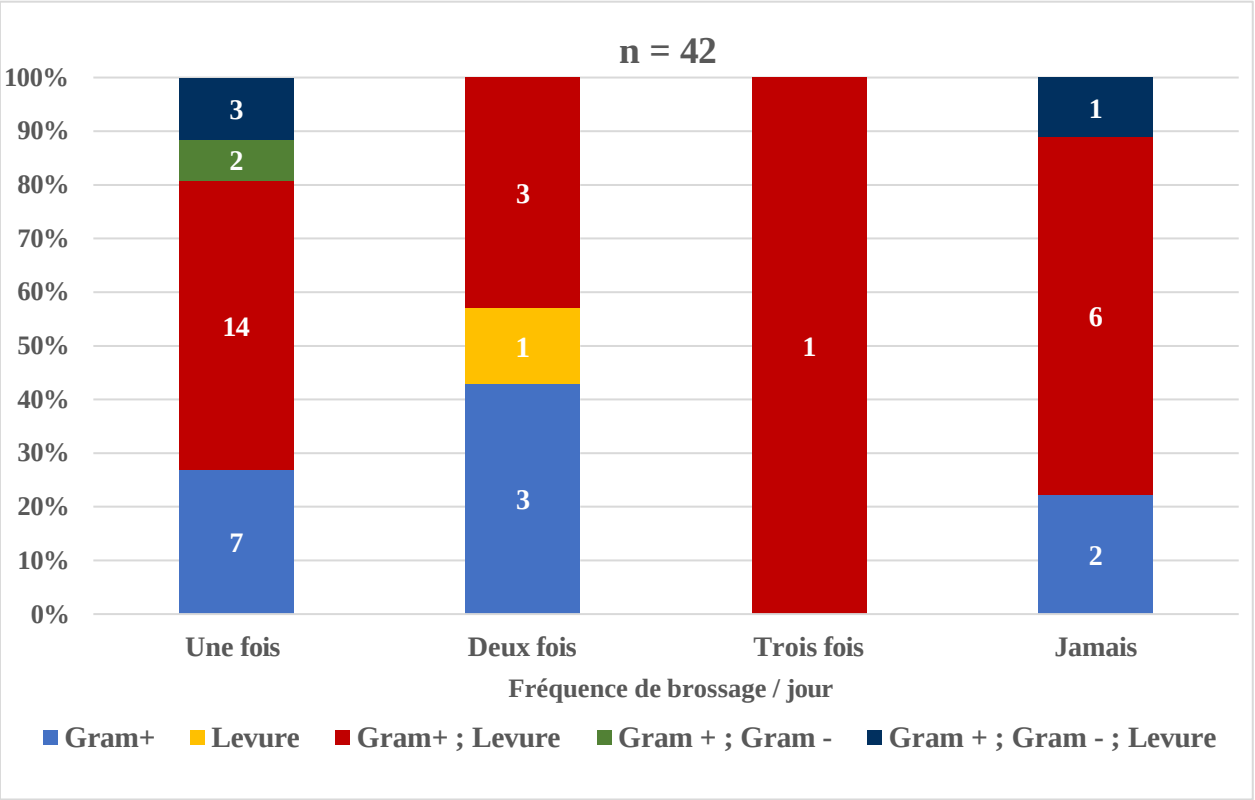


Figure 5 : Répartition des groupes microbiens en fonction de la fréquence de brossage des dents.

La figure N° 5 montre la présence de tous les groupes microbiens dans la cavité buccale des enfants qui se brossent les dents seulement une fois par jour. En revanche, nous n'observons que la présence des levures associées à des bactéries à Gram positif chez ceux qui se brossent les dents trois fois par jour. Une étude menée par **Tahari N, *et al.* (2023)** a confirmé l'efficacité mais aussi la rareté du brossage trois fois par jour.

Le fait de se brosser régulièrement les dents peut prévenir la prolifération de la microflore buccale et influencer la composition de cette dernière **(Watanabe, K *et al.*, 2016 ; Calderon, S *et al.*, 2021)**. Selon **Magnouloux D (2016)**, un brossage régulier et efficace est crucial pour

réduire significativement la formation de plaque dentaire, qui se développe naturellement et constamment à la surface des dents.

2.5. Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et du type de dentifrices utilisés :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des groupes microbiens et de la nature des dentifrices utilisés par les patients sont représentés sur la **figure n° 6.**

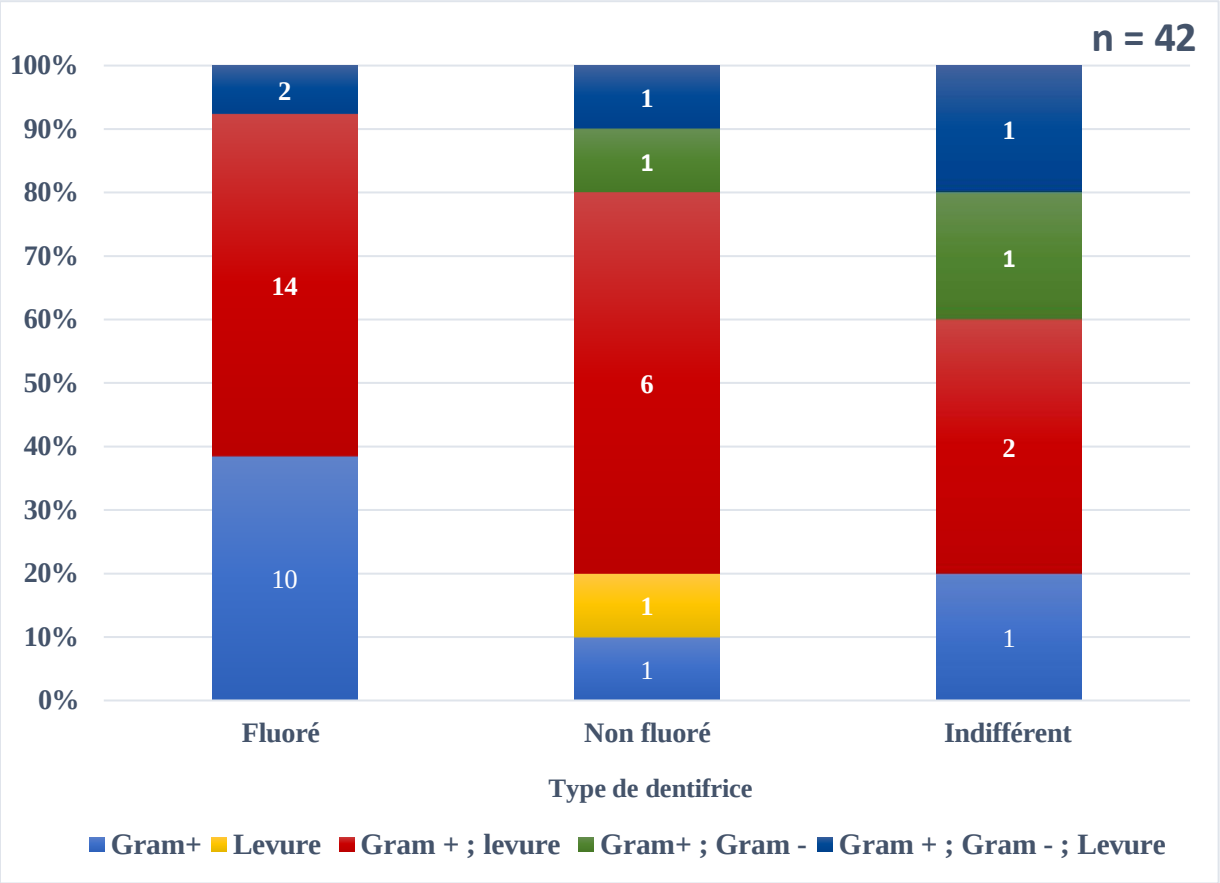


Figure 6 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et du type de dentifrices utilisés.

La figure précédente montre une moindre diversité des groupes microbiens et de leurs associations chez les patients qui utilisent le dentifrice fluoré. En revanche, chez ceux qui utilisent un dentifrice non fluoré ou qui ne font pas de distinction, nous remarquons la présence de tous les groupes microbiens. Cela est en accord avec l'étude de **Zen I *et al.* (2023)**, qui a affirmé la réduction des microorganismes cariogènes lors de l'utilisation du dentifrice fluoré.

L'efficacité du dentifrice fluoré a été prouvée dès le début du XXIe siècle, car il permet d'éviter l'apparition des lésions carieuses, de favoriser leur guérison et également de protéger durablement les dents **(Marinho V *et al*., 2003 ; Muller-Bolla M et Doméjean S, 2019)**

2.6. Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la consommation des antibiotiques :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la consommation des antibiotiques sont représentés sur le tableau **N° 2.**

Tableau 2 : Répartition des patients en fonction des groupes microbiens isolés et de la consommation des antibiotiques.

Microorganismes / Patients	Gram +	Levure	Gram + et levure	Gram + et Gram -	Gram + ; Gram - ; levure	Totale
Avec antibiothérapie	**2**	**1**	**17**	**0**	**4**	**24**
Sans antibiothérapie	**10**	**0**	**5**	**2**	**1**	**18**

Le **Tableau N° 2** met en évidence un nombre plus élevé de souches chez les patients recevant une antibiothérapie. De plus, nous avons identifié la présence de levures en association avec les Gram positifs chez la majorité de ces patients. En revanche, la plupart des enfants non traités par antibiotiques présentent uniquement des Gram positifs.

Selon **Vidal (2015)**, l'antibiothérapie stimule la croissance des levures au niveau de la bouche, ce qui entraîne l'apparition de Candidoses buccales (muguet). Les antibiotiques peuvent engendrer l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, en favorisant la survie des bactéries résistantes dans la cavité buccale des enfants **(Blair, J. *et al*., 2014)**. Ces traitements ne se contentent pas d'éliminer les bactéries pathogènes, mais affectent également les bactéries de la flore buccale, perturbant ainsi l'équilibre du microbiote intestinal **(Neuman H. *et al*., 2018)**.

2.7. Répartition des patients en fonction de leur état de santé :

Les résultats relatifs à la répartition des enfants en fonction de leur état de santé sont représentés sur la **figure n° 7**.

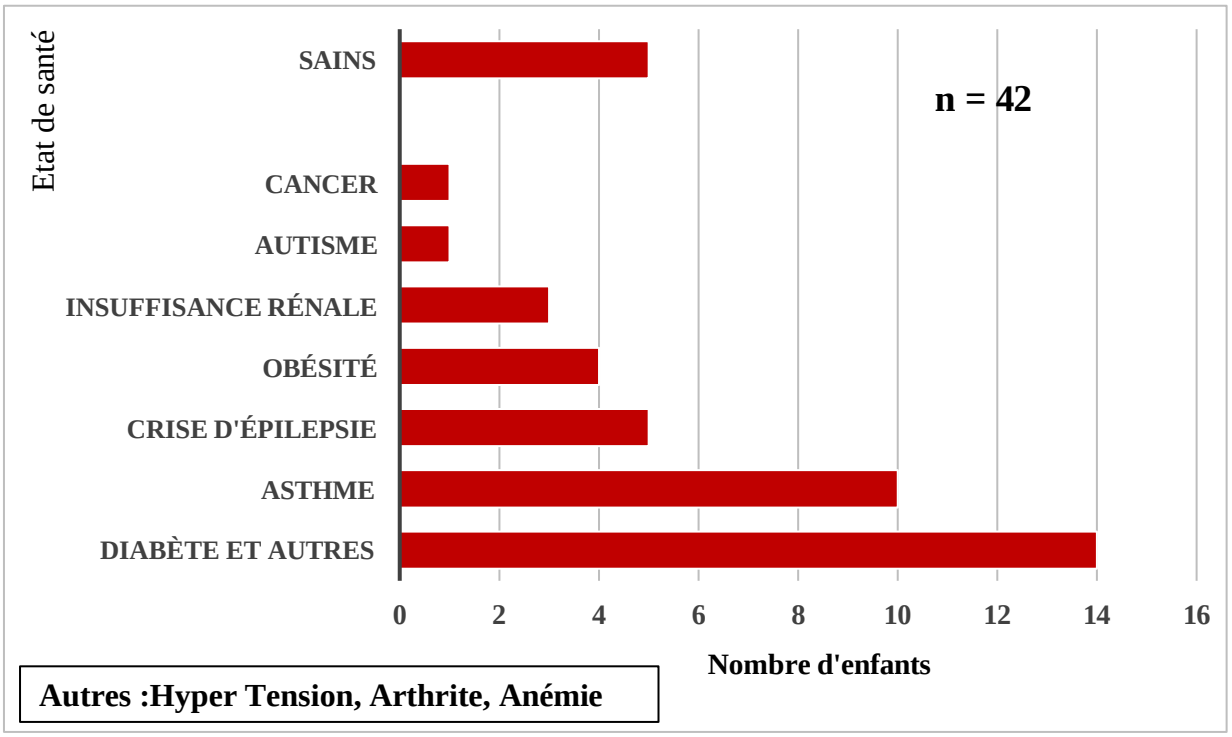


Figure 7 : Répartition des patients en fonction de leur état de santé

La **figure n° 7** illustre la répartition des maladies chroniques recensées chez les enfants. Nous observons une prédominance des enfants diabétiques parmi nos patients (14), suivis par ceux atteints d'asthme, d'épilepsie, d'obésité et d'insuffisance rénale (10, 5 et 3 respectivement), tandis que seuls 5 enfants sont en bonne santé parmi la population étudiée.

Selon **Menai M (2023)** et **Bemba E.L.P *et al*. (2024)**, le diabète et l'asthme sont actuellement parmi les maladies chroniques les plus observées chez les enfants. La relation entre le microbiome oral et l'état de santé générale de l'enfant **(Gholizadeh P *et al*., 2016)** joue un rôle crucial. En effet, les enfants à risque d'asthme et de diabète présentent une dysbiose microbienne, augmentant la virulence du microbiote buccal **(Arrieta M *et al*., 2015 ; Xiao E *et al*., 2017)**

2.8. Répartition des patients en fonction des maladies bucco-dentaire :

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction des maladies bucco-dentaire sont représentés sur la **figure N° 8.**

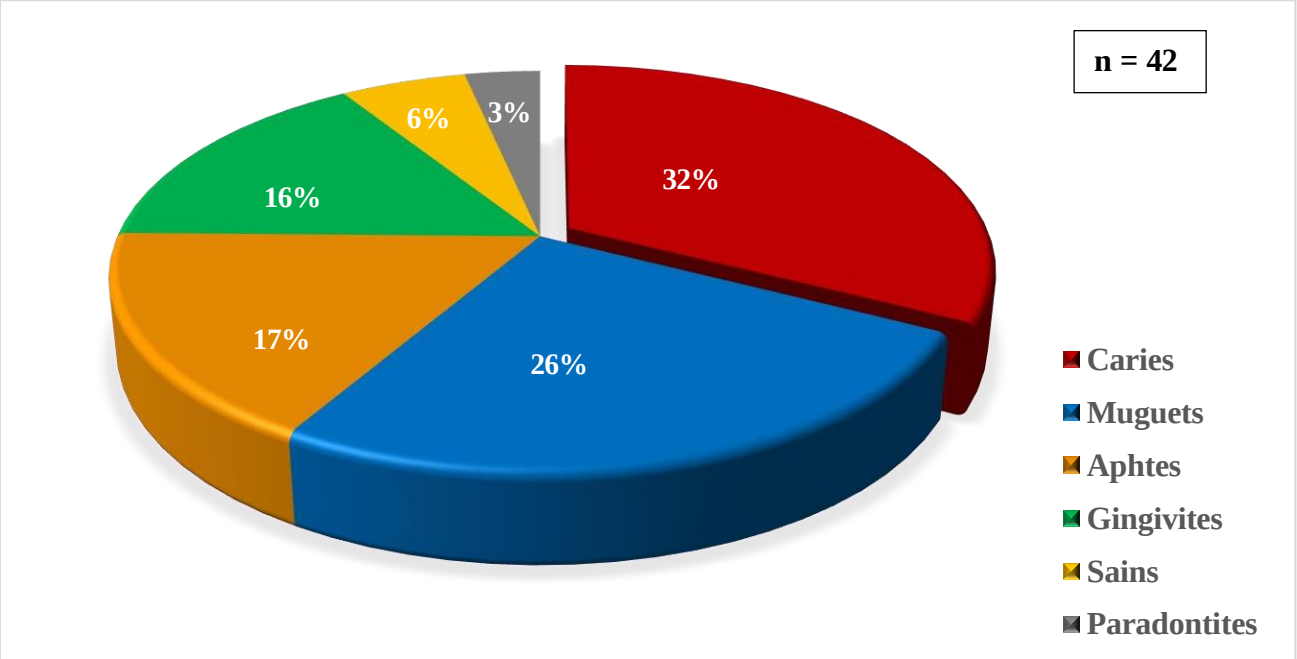


Figure 8 : Répartition des patients en fonction des maladies bucco-dentaire.

La figure ci-dessus montre que la prévalence de la carie dentaire chez les enfants est de 32 %, suivie par le muguet à 26 %, les aphtes à 17 %, les gingivites à 16 %, et les parodontites à 3 %. Seulement 6 % des enfants présentent une bonne santé buccale dans la population étudiée.

Selon l'**OMS (2022)**, la carie dentaire est la maladie la plus répandue et la plus sévère chez les enfants dans le monde entier.

Cette pathologie d'origine bactérienne résulte d'un déséquilibre entre la surface dentaire et la plaque, entraînant une diminution de la minéralisation de l'email. Elle dépend des habitudes alimentaires, de la qualité de l'émail et du taux de bactéries cariogènes **(Boussalia R et Ghodbane, N, 2023).**

2.9. Répartition des patients en fonction de l'adoption des animaux:

Les résultats relatifs à la répartition des patients en fonction de l'adoption des animaux sont représentés sur la **figure n° 9**

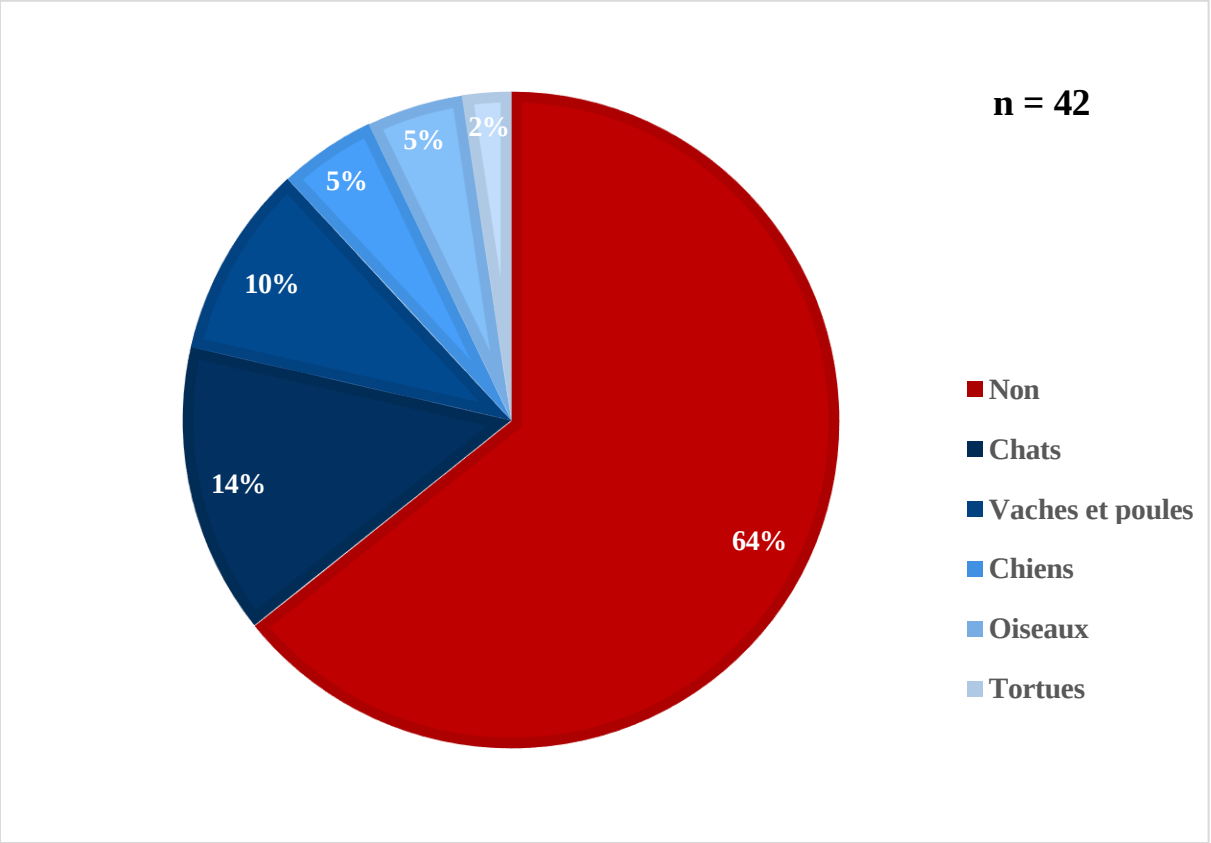


Figure 9 : Répartition des patients en fonction de l'adoption des animaux.

La figure N° 9 montre que la plupart des patients ne sont pas en contact avec des animaux. Cependant, un tiers des patients ont des contacts avec des animaux, principalement des chats (14%), suivis par l'élevage de vaches et de poules (10%), les chiens (5%), les oiseaux (5%) et les tortues (2%).

Selon Zahrychuk et ses collaborateurs (2023), certaines souches microbiennes, parfois résistantes aux antimicrobiens, proviennent exclusivement des animaux. Le terme zoonoses fait référence aux maladies transmises des animaux aux êtres humains par diverses voies. Les enfants et les femmes enceintes sont particulièrement susceptibles d'être affectés, comme l'ont noté **Fong I en 2017.**

3. Déterminantion du rendement de l'extraction de l'huile essentielle de thym:

L'extraction a révélé que le thym présente un rendement significatif en huile essentielle, atteignant un pourcentage de 1,8241 %. Cette valeur est similaire à celle obtenue par **Hassani A. *et al*. (2017)**. En revanche, les résultats obtenus par **Dob T. *et al*. (2006)**, ainsi que par **Hazzit M. *et al*. (2009)** et **Amarti F. (2009)**, montrent des taux de rendement plus faibles, avec des valeurs respectives de 1,13 %, 0,4 % et 0,3 %. À l'inverse, **Zayyad N. *et al*. (2014)** ont obtenu un rendement supérieur, s'élevant à 2,96 %.

Cette variation peut être attribuée à divers facteurs, tels que les conditions topographiques, la période de récolte, le chémotype du thym, les conditions de culture, les pratiques agricoles, la méthode d'extraction, les conditions de conservation, ainsi que les facteurs génétiques de la plante **(Carron C *et al*., 2010).**

Pour la suite de notre étude, nous avons choisi trois souches prélevées chez un enfant de 11 ans atteint de diabète, présentant à la fois de la gingivite et des caries dentaires. Cet enfant est en contact avec des animaux, ne se brosse pas régulièrement les dents et est sous traitement antibiotique.

4. Aromatogramme :

Les résultats relatifs aux diamètres de la zone d'inhibition de l'huile essentielle de *T. vulgaris* vis-à-vis des souches sélectionnées sont représentés dans le **tableau N° 3 :**

Tableau 3 : Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile essentielle de *T. vulgaris* vis-à-vis des souches sélectionnées.

Souches	Diamètres	Sensibilité
Staphylococcus epidermidis	**35 mm**	**Extrêmement sensible**
Klebsiella pneumoniae	**13 mm**	**Sensible**
Candida famata	**32 mm**	**Extrêment sensible**

Le tableau N° 3 montre l'effet de l'huile essentielle de thym sur les trois souches, avec des degrés de sensibilité variés. *Staphylococcus epidermidis* et *Candida famata* sont les plus sensibles, suivis par *Klebsiella pneumoniae*.

Ces résultats sont comparables à ceux de **Haddouchi F (2009)**, qui ont observé une inhibition de 30 mm de diamètre pour les bactéries à Gram positif et de 9 mm pour les bactéries à Gram négatif.

Cette diminution de la sensibilité peut être attribuée à la composition de la paroi cellulaire des bactéries gram-négatives qui empêche les composés de pénétrer et d'exercer leur activité antimicrobienne à l'intérieur de la cellule **(Kalemba D et Kunicka A, 2003 ; Alvesalo J *et al*., 2006)**.

5. Inhibition de la formation de biofilm par l'huile essentielle de thym :

La **figure N° 10** présente les résultats de la quantification des biofilms formés par chacune de nos souches microbiennes après l'exposition à l'huile essentielle de thym à 12 concentrations différentes (de 8 mg/ml à 3,90625 µg/ml).

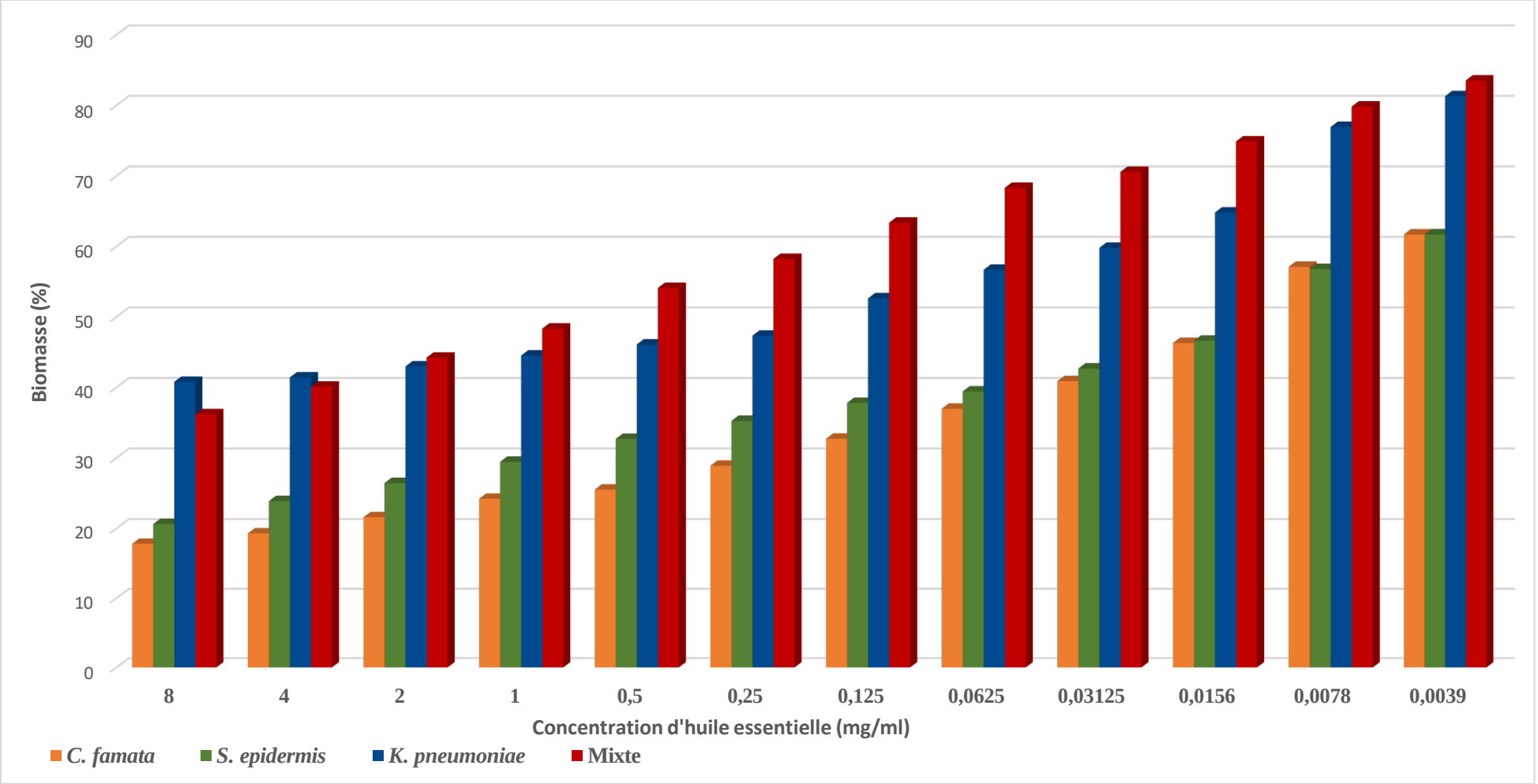


Figure 10 : Biomasses des biofilms constitués d'une ou plusieurs espèces après inhibition par l'huile essentielle de thym

Les résultats obtenus concordent avec ceux de l'antibiogramme (tableau N° 3), montrant que *Staphylococcus epidermidis* et *Candida famata* sont particulièrement sensibles à l'huile essentielle de thym, suivi par *Klebsiella pneumoniae*.

De plus, La figure n°10 indique que la biomasse des biofilms multi-espèces [36,21% - 79,83%] formée après l'inhibition par l'huile essentielle de thym est supérieure à celle des biofilms mono-espèces [17,83% -57.11%], à des concentrations équivalentes. Selon **Seghir *et al*. (2015)**, la biomasse des biofilms formés change en fonction des souches et des espèces.

Une étude récente d'**Al-Shoaibi et Benedicts (2021)** a comparé l'efficacité de trois huiles essentielles différentes (thym, clou de girofle et ail) contre des souches bactériennes à Gram positif, montrant que l'huile essentielle de thym était la plus efficace contre *Staphylococcus epidermidis.*

Candida famata, une levure rare chez l'homme, est souvent transmise par contact direct avec les animaux ou par voie alimentaire. Cette levure peut être un pathogène opportuniste chez les patients vulnérables **(Beyda *et al*., 2013 ; Delgado *et al*., 2023)**. Le thym est bien connu pour ses propriétés antifongiques efficaces, y compris contre le genre Candida et dans la lutte contre la plaque dentaire **(Agherghour et Khemis, 2015)**.

Une étude récente d'**Ebani *et al*. (2018)** a montré l'efficacité de l'huile essentielle de thym contre *Candida famata*, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) inférieure à 1 mg/ml pour les cellules planctoniques.

Klebsiella pneumoniae, une bactérie à Gram négatif, est une entérobactérie capable de causer diverses infections **(Li *et al*., 2023)**. **Alibi *et al*. (2020)** ont démontré que l'huile essentielle de thym pouvait réduire la formation de biofilm par *Klebsiella pneumoniae*, ce qui va dans le même sens que nos résultats.

Les biofilms multi-espèces, avec leurs interactions complexes de commensalisme et d'antagonisme, augmentent la virulence et la résistance, ce qui peut modifier les interactions hôte-pathogène lors d'infections polymicrobiennes **(Thein *et al*., 2009 ; Trejo-Hernández *et al*., 2014).**

En raison de leur résistance élevée aux antimicrobiens conventionnels, les biofilms mixtes Candida-bactéries posent un défi pour le traitement des infections, bien que les produits naturels, comme le thym, puissent offrir des solutions prometteuses **(Freynet, D. et Vivant, M. 2020 ; Iseppi *et al*., 2020 ; Khan *et al*., 2021)** ont suggéré que l'huile essentielle de thym pourrait être utilisée en combinaison avec des antibiotiques pour traiter diverses infections.

Quatrième partie

Conclusion et perspectives

L'augmentation des infections bucco-dentaires chez les enfants souligne la nécessité d'étendre la recherche sur les biofilms buccaux, en examinant les agents pathogènes impliqués, leur résistance et le développement de traitements efficaces avec moins d'effets secondaires.

De ce fait, nous avons entrepris ce travail qui avait pour objectifs de :

- Isoler et identifier les germes présents dans la cavité buccale des enfants de 2 à 16 ans dans la région de Maghnia.
- Évaluer *in vitro* l'effet inhibiteur de l'huile essentielle de thym sur les biofilms mono-espèces et multi-espèces de certaines souches isolées.

Les résultats obtenus indiquent que parmi les 44 prélèvements analysés 27% présentaient des bactéries à Gram positif, 55% présentaient des bactéries à Gram positif associées à des levures, et 10% montraient une association de bactéries à Gram positif, à Gram négatif et de levures.

L'huile essentielle de thym a démontré un rendement élevé de 1,82 %. De plus, les souches *Staphylococcus epidermidis* et *Candida famata* se sont révélées plus sensibles à cette huile essentielle par rapport à *Klebsiella pneumoniae*.

À une concentration de 8 mg/mL, l'huile essentielle de thym a réussi à réduire significativement la biomasse des biofilms : de 82,17 % pour *Candida famata*, de 80,84 % pour *Staphylococcus epidermidis*, de 59,2 % pour *Klebsiella pneumoniae*, ainsi que de 63,76 % pour le biofilm mixte.

Nos résultats indiquent qu'une bonne hygiène bucco-dentaire, incluant l'utilisation régulière de bains de bouche, peut contribuer à préserver la santé bucco-dentaire des enfants.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de :

- Augmenter le nombre d'échantillons et diversifier la population étudiée.
- Évaluer l'impact inhibiteur de différentes combinaisons d'antibiotiques et de produits naturels sur les biofilms bucco-dentaires.

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Achi I, Benremili L (2016). Les extraits de plantes comme alternative à la résistance de *Klebsiella pneumoniae* : Etude in vitro et in silico. Université des Frères Mentouri Constantine.
2. Agherghour, N., & Khemis, L. (2015). Essai de fabrication d'un camembert au thym et étude de son effet sur la durée de vie du produit (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).
3. Alibi, S., Selma, W. B., Ramos-Vivas, J., Smach, M. A., Touati, R., Boukadida, J., ... & Mansour, H. B. (2020). Anti-oxidant, antibacterial, anti-biofilm, and anti-quorum sensing activities of four essential oils against multidrug-resistant bacterial clinical isolates. Current Research in Translational Medicine, 68(2), 59-66.
4. Al-Shoaibi, F., & Benedicts, S. (2021). Inhibitory effect of Garlic oil, Clove oil and Thyme oil on *Micrococcus Luteus* and *Staphylococcus epidermidis*. Journal of Student Research, 10(3).
5. Alvesalo J., Vuorela H., Tammela P., Leinonen M., Saikku P., Vuorela P. (2006). Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures; Biochem Pharmacol 71:735-741
6. Amarti, F. (2009). Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. Et *Thymus ciliatus* (Desf). Benth du Maroc. Biotechnology. Agron. Soc. Eniviron14(1) ,141-148.
7. Arrieta, M., Stiemsma, L., Dimitriu, P., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., Kuzeljevic, B., Gold, M., Britton, H., Lefebvre, D., Subbarao, P., Mandhane, P., Becker, A., McNagny, K., Sears, M., Kollmann, T., Investigators, C., Mohn, W., Turvey, S. et Finlay, B. (2015). Les altérations microbiennes et métaboliques de la petite enfance affectent le risque d'asthme infantile. Médecine translationnelle scientifique, 7, 307ra152 - 307ra152.
8. Beloin, C., McDougald, D., (2021). Speciality grand challenge for "Biofilms". Front. Cell. Infect. Microbiol. 11, 1–5.
9. Bemba, E. L. P., Oko, P. A., Koumeka, P. P., Bopaka, R. G., Okemba-Okombi, F. H., Bayina, S. G., & Ossale-Abacka, B. K. (2024). Prévalence de l'asthme et ses conséquences en milieu scolaire à Brazzaville. Revue Française d'Allergologie, 64(3), 104063.

10. Bensalek F-E. (2018) : L'utilisation des plantes médicinales pour le traitement des troubles fonctionnels intestinaux dans le contexte Marocain. Thèse d'état doctorat en médecine. Marrakech : Université Cadi Ayyad, Faculté de médecine et de pharmacie. P41/56/61.

11. Bergmann, O., Kilian, M., & Ellegaard, J. (1989). Potentially pathogenic microorganisms in the oral cavity during febrile episodes in immunocompromised patients with haematologic malignancies. Scandinavian journal of infectious diseases, 21 1, 43-51.

12. Beyda, N. D., Chuang, S. H., Alam, M. J., Shah, D. N., Ng, T. M., McCaskey, L., & Garey, K. W. (2013). Treatment of *Candida famata* bloodstream infections: case series and review of the literature. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 68(2), 438–443.

13. Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. et Piddock, L. (2014). Mécanismes moléculaires de la résistance aux antibiotiques. Nature Reviews Microbiologie, 13, 42-51.

14. Borgo, F., Verduci, E., Riva, A., Lassandro, C., Riva, E., Morace, G. et Borghi, E. (2017). Abondance relative des microbes intestinaux bactériens et fongiques chez les enfants obèses : une étude cas-témoins. Obésité infantile, 13 1, 78-84.

15. Boukhatem, M. N., Ferhat, M. A., Kameli, A., Saidi, F., Taibi, H., & Djamel, T. (2014). Valorisation de l'essence aromatique du Thym (*Thymus vulgaris L.*) en aromathérapie anti-infectieuse [Potential application of Thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oil as antibacterial drug in aromatherapy]. International Journal of Innovation and Applied Studies, 8(4), 1418.

16. Boussalia, R., & Ghodbane, N. (2023). Estimation de la prévalence de la carie dentaire chez une population scolarisée de 06 et 12 ans au niveau de la commune de Constantine (Doctoral dissertation, Université Constantine 3 Salah Boubnider, Faculté de médecine).

17. Bouzidi S., (2020). Les Infections Bucco-Dentaires : Prise En Charge Et Le Role Du Laboratoir. Diplôme De Docteur En Pharmacie, Universite. Mohammed V, RABAT, 100p.

18. Calderon, S., Chung, S., Fields, C. et Mortimer, N. (2021). Comportement de brossage des dents des enfants et microbiote oral : une étude pilote., 1, 112-121.

19. Carron, C. A., Baroffio, C., & Vouillamoz, J. (2010). Incidence du semis ou de la plantation sur le rendement et la qualité de la sauge, du thym et de la guimauve. Revue suisse de viticulture, arboriculture, horticulture (Switzerland), 42(4).

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

21. Daghbouche, S., Daghbouche, A., Boulessnam, A., Snoussi, S. A., & Djazouli, Z. E. (2017). Variation phénologique du contenu phytochimique et de l'activité antibactérienne de Cytisus triflorus l'Her. Revue Agrobiologia, 7(2), 548-561.

22. Delgado, J., Álvarez, M., Cebrián, E., Martín, I., Roncero, E., & Rodríguez, M. (2023). Biocontrol of Pathogen Microorganisms in Ripened Foods of Animal Origin. Microorganisms, 11(6), 1578.

23. Dictionnaire Vidal, Collectif Vidal. 91e éd. Paris : Ed. Du Vidal, 2015, 3648 p.

24. Dob T., Darhmane De., Benbdelkader T. Chelghoum T.C. (2006). Int. J. Aromatherapy, 16 :95-100.

25. Ebani, V. V., Nardoni, S., Bertelloni, F., Pistelli, L., & Mancianti, F. (2018). Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. Molecules, 23(7), 1668.

26. Filoche, S., Wong, L., and Sissons, C. H. (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. J. Dent. Res. 89, 8–18.

27. Fong, I. (2017). Animaux et mécanismes de transmission des maladies. Zoonoses émergentes, 15 - 38.

28. Freynet, D., & Vivant, M. (2020). Enquête sur l'utilisation des huiles essentielles par les patients atteints de la mucoviscidose : une approche quantitative et qualitative.

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

30. Gholizadeh, P., Eslami, H., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Aghazadeh, M. et Kafil, H. (2016). Rôle du microbiome buccal sur les cancers de la bouche, une revue. Biomédecine et pharmacothérapie = Biomédecine et pharmacothérapie, 84, 552-558.

31. Gromova, S., Kolevatykh, E., Koledaeva, A., Krivokorytov, K., Maltseva, O., Medvedeva, M., & Postnikova, E. (2023). Relationship between the changes in plaque microbiota and the oral hygiene status during supervised toothbrushing in 6-year-old children. Pediatric dentistry and dental prophylaxis.

32. Gurenlian, J. R. (2007). The role of dental plaque biofilm in oral health. American Dental Hygienists' Association, 81(suppl 1), 116-116.

33. Haddouchi F., (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss. Revue Afrique SCIENCE 05 (2) ; pp 246 – 259

34. Hassani, A., Sehari, N., Sehari, M., Bouchenafa, N., Labdelli, F., & Kouadria, M. (2017). Etude des propriétés insecticides et bactéricides de l'huile essentielle de *Thymus vulgaris* L. dans la lutte contre les ravageurs des semences et denrées stockées.

35. Hazzit M, Baaliouamer A, Veríssimo AR, Faleiro ML, Maria Graça (2009). Miguel Chimie alimentaire 116 (3), 714-721.

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

37. 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.

38. Hussein, H. (2021). Oral Sampling Techniques. Methods in molecular biology, 2327, 17-29.

39. Iseppi, R., Di Cerbo, A., Aloisi, P., Manelli, M., Pellesi, V., Provenzano, C., ... et Sabia, C. (2020). Activité in vitro des huiles essentielles contre les cellules planctoniques et les biofilms des bactéries à Gram négatif productrices de β-lactamases à spectre étendu (BLSE)/carbapénamase impliquées dans les infections nosocomiales humaines. Antibiotiques, 9 (5), 272.

40. Kalemba D, Kunicka A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Curr. Med. Chem. 10: 813-829

41. Kawamura, M., Takase, N., Sasahara, H. et Okada, M. (2008). Attitudes et comportements des adolescents en matière de santé bucco-dentaire au Japon : comparaison par sexe et groupe d'âge. Journal of oral science, 50 2, 167-74.

42. Kerner, S. (2005). Microbiologie et maladies parodontales. Le "point de vue" des bactéries.Information Dentaire 16:943-946.

43. Khan, F., Bamunuarachchi, N., Pham, D., Tabassum, N., Khan, M., & Kim, Y. (2021). Mixed biofilms of pathogenic Candida-bacteria: regulation mechanisms and treatment strategies. Critical Reviews in Microbiology, 47, 699 - 727.

44. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Hein R, et al. The bacterial connection between the oral cavity and the gut diseases. J Dent Res. (2020) Aug;99(9):1021–1029.

45. Klapisz-Wolikow M., Lejeune M. (1981) : Epidemiologie des parodontopa_thies chez l'enfant. Revue Orthop Dento Faciale : 415-428.

46. Kurtzman, G. M., Horowitz, R. A., Johnson, R., Prestiano, R. A., & Klein, B. I. (2022). The systemic oral health connection: Biofilms. Medicine, 101(46), e30517.

47. Larsen T, Fiehn NE (1996) : Resistance of Streptococcus sanguis biofilms to antimicrobial agents. APMIS B ;104 :280–284.

48. Larsen T, Fiehn NE (2017). Dental biofilm infections -an update. APMIS. Apr; 125(4):376-384.

49. Larsen T (2002): Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. Oral Microbiol Immunol; 17:267–271.

50. Lebeaux, D., & Ghigo, J. M. (2012). Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale ? médecine/sciences 28.

51. Lemos, G., Resende, C., Campello, C., Ribeiro, I., Mendes, A., Lima, E., Oliveira, R., Filho, V., Correia, M. et Muniz, M. (2022). Le microbiote oral est-il associé au surpoids et

à l'obésité chez les enfants et les adolescents. Une revue systématique. Revues critiques en science alimentaire et nutrition, 1-11.

52. Li, L., Ma, J., Cheng, P., Li, M., Yu, Z., Song, X., Yu, Z., Sun, H., Zhang, W. and Wang, Z., (2023). Roles of two-component regulatory systems in *Klebsiella pneumoniae*: regulation of virulence, antibiotic resistance, and stress responses. Microbiological Research, vol. 272, pp. 127374.

53. Magnouloux, D. (2016). L'impact de l'enseignement des techniques de brossage sur le contrôle de plaque : brosse à dents manuelle vs électrique (Doctoral dissertation, Éditeur inconnu).

54. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S (2003). Dentifrices au fluor pour prévenir la carie dentaire chez les enfants et les adolescents. Système de base de données Cochrane Rév. ;(1) :CD002278.

55. Menai, M. (2023). Commande par modes glissants de la concentration du glucose pour une personne diabétique (Doctoral dissertation).

56. Mosaddad, S., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M., Seifalian, A., Yazdanian, M., & Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 38, 2005 - 2019.

57. Muller-Bolla, M., & Doméjean, S. (2019). Dentifrices et vernis fluorés, intérêt dans la prévention des lésions carieuses. Actualités Pharmaceutiques, 58(587), 49-53.

58. Nadia Zayyad, Abdellah Farah, Jamila Bahhou (2014). Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège 83 (118), 132.

59. Neuman, H., Forsythe, P., Uzan, A., Avni, O. et Koren, O. (2018). Antibiotiques en bas âge : la dysbiose et les dégâts causés. Revues de microbiologie FEMS, 42, 489-499.

60. Odds, F. C., Bernaerts, R. I. A. (1994). CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species. Journal of clinical microbiology, 32(8), 1923-1929.

61. OMS (2022). Le défaut de soins bucco-dentaires touche près de la moitié de la population mondiale [Internet].

62. OMS (2018). Rapport : Santé bucco-dentaire.

63. omsLebres, E. (2004c). Identification biochimique des micro-organismes, Institut Pasteur d'Algérie.

64. Ould Amer I (2024). Effet de l'ail « *Allium sativum L*. » sur la flore buccale. Université Ibn Khaldoun –Tiaret–.

65. Pachoński, M., Koczor-Rozmus, A., Mocny-Pachońska, K., Łanowy, P., Mertas, A., & Jarosz-Chobot, P. (2021). Oral microbiota in children with type 1 diabetes mellitus. Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism, 27(2), 100-108.

66. Parvinen, T., & Larmas, M. (1981). The Relation of Stimulated Salivary Flow Rate and pH to Lactobacillus and Yeast Concentrations in Saliva. Journal of Dental Research, 60, 1929 - 1935.

67. Păunică, I., Giurgiu, M., Dumitriu, A. S., Păunică, S., Pantea Stoian, A. M., Martu, M. A., & Serafinceanu, C. (2023). The bidirectional relationship between periodontal disease and diabetes mellitus—a review. Diagnostics, 13(4), 681.

68. Philip, D. Marsh and Michael, V. Martin. (2009). Oral Microbiology, fifth edition. S.I.: Churchill Livingstone Elsevier, Elsevier limited.

69. Piau, C., Azevedo, T., Piau, A., Miranda, A., Pinheiro, J., & Bezerra, A. (2016). Oral Microbial Colonization in Pediatric Intensive Care Unit Patients. Journal of dentistry for children, 83 2, 53-9.

70. Pierce,G.C., Priya, U., Amanda, R.T., Floyd L.J., Eilidh M., Gordon R., Jose L. (2008). A simple and reproducible 96-well platebasedmethod for the formation of fungal biofilms and its application to anti-fungal susceptibilitytesting. Nature protocols, 3(9), 1494-1495

71. Piruthiviraj, P., Swetha, B. M., Balasubramanian, C., Krishnamoorthy, R., Gatasheh, M. K., Ahmad, A., ... & Vijayakumar, N. (2024). Exploring the potential: Inhibiting quorum sensing through marine red seaweed extracts–A study on *Amphiroa fragilissima*. Journal of King Saud University-Science, 36(4), 103118.

72. Ponce A.G., Fritz R, Del Valle C. E. & Roura S. I., 2003- Antimicrobial activity of essential oils on the native microfora of organic Swiss chard. Lebensmittel – Wissenschaft und – Technology, 36: 679 – 684.

73. Roberts A (2005). Bacteria in the mouth. Dent Update ; 32: 134-6, 139-40, 142.

74. Saad, D., Louhi, S., & Iflissen, D. (2023). Effet des huiles essentielles sur les biofilms des *Klebseilla pneumoniae* (Doctoral dissertation, Université Mouloud Mammeri).

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

76. Schmidt-Westhausen AM., Bendick C., Reichart PA. et Samaranayake LP. (2004). Oral candidosis and associated Candida species in HIV-infected Cambodians exposed to antimycotics, Mycoses, 47: 435-441

77. Seddiki, S., Boucherit, K., & Boucherit, Z. (2010). Contamination des cathéters vasculaires et des sondes urinaires par des levures de *Candida albicans* prélevées des patients : formation des biofilms et résistance à l'amphotéricine B. MHA (Sousse), 22(63), 40-45.

78. Sedghi, L., Dimassa, V., Harrington, A., Lynch, S. et Kapila, Y. (2021). Le microbiome buccal : rôle des organismes clés et des réseaux complexes dans la santé et les maladies bucco-dentaires. Parodontologie 2000, 87, 107 - 131.

79. Seghir A (2015). Recherche de biofilms mixtes sur cathéters veineux périphériques au CHU de Tlemcen. Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen. ; 122.

80. Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Boucherit, K., Sari-Belkharroubi, L., & Anselme-Bertrand, I. (2015). Évaluation du potentiel de formation de biofilms mixtes entre Candida albicans et quelques espèces bactériennes isolées de cathéters vasculaires périphériques au CHU de Tlemcen. Première étude en Algérie. Journal de Mycologie Médicale, 25(2), 123-129.

81. Standring S. (2015). Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. London : Elsevier Health Sciences.

82. Tahari, N., Fouatmia, M., Foundou, K., & Serradj, S. A. (2023). Prévalence de la carie dentaire chez des enfants de 06 à 11 ans scolarisés dans une école primaire dans la région Ouest d'Oran.

83. Thein, Z., Seneviratne, C., Samaranayake, Y., & Samaranayake, L. (2009). Community lifestyle of Candida in mixed biofilms: a mini review. Mycoses, 52.

84. Touhami, A. (2017). Etude chimique et microbiologique des composants des huiles essentielles dedifférents genres Thymus récoltées dans les régions de l'Est Algérien pendant les deux périodes dedéveloppement. Thèse de doctorat. Université –Badji Mokhtar. Annaba.

85. Trejo-Hernández, A., Andrade-Domínguez, A., Hernández, M., & Encarnación, S. (2014). Interspecies competition triggers virulence and mutability in *Candida albicans–Pseudomonas aeruginosa* mixed biofilms. The ISME Journal, 8, 1974-1988.

86. Van De Water T, Staecker H (2006). Basic Science Review for Otolaryngology. New York: Thieme.

87. Watanabe, K., Kijima, S., Nonaka, C., Matsukawa, Y. et Yamazoe, K. (2016). Effet inhibiteur de la prolifération des bactéries buccales chez le chien par le brossage des dents et l'application de dentifrice. Le Journal of Veterinary Medical Science, 78, 1205-1208.

88. Xiao, E., Mattos, M., Vieira, G., Chen, S., Corrêa, J., Wu, Y., Albiero, M., Bittinger, K. et Graves, D. (2017). Le diabète améliore l'expression de l'IL-17 et modifie le microbiome oral pour augmenter sa pathogénicité. Cell host & microbe, 22 1, 120-128.e4.

89. Xu, X., He, J., Xue, J., Wang, Y., Li, K., Zhang, K., Guo, Q., Liu, X., Zhou, Y., Cheng, L., Li, M., Li, Y., Li, Y., Shi, W. et Zhou, X. (2015). La cavité buccale contient des niches distinctes avec des communautés microbiennes dynamiques. Microbiologie environnementale, 17 3, 699-710.

90. Zahrychuk, O., Zahrychuk, O., Bilyk, Y. et Fedoniuk, L. (2023). Propagation de micro-organismes résistants aux antibiotiques et mécanismes de leur transmission de l'animal à l'homme. Bulletin de recherche médicale et biologique.

91. Zen, I., Delbem, A., Hosida, T., Sampaio, C., Morais, L., Martins, T., Monteiro, D. et Pessan, J. (2023). Effet antimicrobien des dentifrices à faible teneur en fluor contenant du polyphosphate et des polyols : une évaluation in vitro des zones d'inhibition. Antibiotiques, 12.

92. Zhao, J., Zhou, Y., Zhao, Y., Feng, Y., Yan, F., Gao, Z., Ye, Q., Chen, Y., Liu, Q., Tan, L., Zhang, S., Hu, J., Dusenge, M., Feng, Y. et Guo, Y. (2021). Variations selon le sexe dans les microbiomes buccaux des patients âgés atteints de parodontite initiale. Journal de recherche en immunologie.

Annexes

Annexe N°1 : Questionnaire médical

Code anonymat (….....)

Date à laquelle le questionnaire médical a été rempli : …. /…./….

Nom prénom : ……

1. **Age : ……**

2. **Sexe :**
   - ○ Homme
   - ○ Femme

3. **Taille : …….**

4. **Poids …….**

5. **Composition fratrie (nombre d'enfants) : …….**

6. **Place de l'enfant dans la fratrie ? …….**

7. **votre ville ? …….**

8. **Age de la première visite chez un chirurgien-dentiste ? ……..**

9. **A quand remonte le dernier examen dentaire ?**
   - ○ 1ère fois aujourd'hui
   - ○ Moins de 6 mois
   - ○ Moins d'un an
   - ○ Moins de 2 ans
   - ○ Plus de 2 ans

10. **Motif(s) de la consultation :**
   - ○ Conseil / Information
   - ○ Détartrage
   - ○ Extraction
   - ○ Caries
   - ○ Orthodontie/ODF
   - ○ Autres motifs : .....

11. **vous brossez vous les dents tous les jours ?**
   - ○ Oui
   - ○ Non

12. **A quelle fréquence vous brossez-vous les dents par jours ?**
   - ○ Trois fois
   - ○ Deux fois

- ○ Une fois
- ○ Jamais

13. combien de temps dure votre brossage de dents ?

- ○ 3 minutes
- ○ 2 minutes
- ○ 1 minutes
- ○ Quelque seconde

14. Brossez-vous les dents sous la supervision de vos parents ? (Notamment les enfants moins de 8 ans).

- ○ Oui
- ○ Non

15. Brossez-vous les dents par un dentifrice fluoré ?

Utilisez-vous un fil dentaire ?

- ○ Oui
- ○ Non

16. Est-ce indispensable selon vous que chaque membre de la famille possède sa Propre brosse à dents ?

- ○ Oui
- ○ Non

17. Consommez-vous des sucreries (bonbons, chocolat, sucre de table, miel, Confiture, gâteaux...) ?

- ○ 3 fois ou moins par semaine
- ○ 4 à 5 fois par semaine
- ○ Tous les jours

18. consommez-vous l des boissons sucrées (jus ou boissons aux fruits, boisson Gazeuse ou énergisante, thé glacé, limonade...) ?

- ○ < 1 verre ou canette par jour
- ○ 1 à 3 verres ou cannettes par jour
- ○ 3 verres ou cannettes par jour
- ○ Rarement

19. Consommez-vous régulière des aliments acides : (d'agrumes, de tomates, de vinaigres…) ?

- ○ Oui
- ○ Non

20. Consommez-vous des produits laitiers (lait, fromage, petit-suisse, yaourt, beurre.) ?

- ○ Rarement
- ○ 1 produit laitier par jour

- ○ 2 produits laitiers par jour
- ○ 3 produits laitiers par jour
- ○ Plus de 3 produits laitiers par jour

21. La carie dentaire est-elle selon vous une maladie infectieuse ?

- ○ Oui
- ○ Non

22. Pensez-vous qu'une carie dentaire puisse se transmettre d'une dent à une autre ?

- ○ Oui
- ○ Non

23. Les bactéries présentes dans votre bouche peuvent-elles entrer en contact avec la bouche de votre enfant ?

- ○ Oui
- ○ Non

24. Avez-vous des animaux à votre maison ?

- ○ Oui
- ○ Non

Si oui lesquels…….

25. Avez-vous déjà eu une maladie bucco-dentaire ?

- ○ Oui
- ○ Non

26. Si oui, laquelle ?

- ○ Caries
- ○ Gingivites (Les saignements gingivaux en cours de brossage)
- ○ Parodontites
- ○ Aphtes
- ○ Muguets

27. L'hygiène bucco-dentaire a-t-elle de l'importance pour vous ?

- ○ Oui
- ○ Non

28. Avez-vous des problèmes de santé ?

- ○ Diabète (type 1 ou type 2).
- ○ Cardiaque
- ○ Asthme
- ○ Obésité
- ○ Autres ; lesquels……
  - ❖ Depuis combien de temps souffre-t-il de la maladie ?.....

- ❖ Quels médicaments sont pris ?.....
  ……..
- ❖ La durée d'hospitalisation…….

29. Avez-vous pris des antibiotiques au cours du dernier mois ?

- ○ Oui
- ○ Non

Si oui lesquels :

30. Les antécédents familiaux révèlent-ils une forte susceptibilité aux caries ?

- ○ Oui
- ○ Non

31. Quels sont les objets que vous pouvez être amené à partager de bouche en bouche avec votre enfant ?

- ○ Aucun
- ○ Bisous
- ○ Bouteille d'eau
- ○ Cuillère
- ○ Fourchettes
- ○ Verre
- ○ Bonbons

32. Quelle est la catégorie socioprofessionnelle de vos parents ?

- ○ Agriculteurs exploitants
- ○ Artisans, commerçants, chefs d'entreprise
- ○ Cadres et professions intellectuelles supérieures
- ○ Professions intermédiaires
- ○ Employés
- ○ Ouvriers
- ○ Retraités
- ○ Sans activité professionnelle

Annexe N°2 : Formulaire de consentement parental éclairé

INFORMED PARENTAL CONSENT FORM
نموذج الموافقة المستنيرة من طرف الوالدين

Sir, السيد' السيدة

Madam

Last Name **اللقب**
First Name.....**االسم**
Address **العنوان**
ابنك اللقب' االسم' تاريخ الميالد ...
تم اختياره للمشاركة في دراسة بعنوان: تثبيط االغشية الحيوية المتكونة من الكائنات الحية الدقيقة المعزولة من تجويف الفم لدى االطفال في غرب الجزائر.

والباحث الرئيسي لها هي السيدة لعوج نادية، الطالبة بجامعة أبو بكر بلقايد تلمسان.
أشهد بأنني أعطيت موافقتي لمشاركة طفلي في هذه الدراسة. أوافق طو ًعلى أنه سيخضع للمسحات الفموية. وأنا اعلم أنني حر في قبول
أو رفض مشاركة طفلي في هذه الدراسة.

وقد تم إبالغي أنه لن يتم الكشف عن هويته في أي تقرير أو منشور، وأن أي معلومات تتعلق به سيتم التعامل معها بسرية.

Your child (Last name, first name, date birth) ……..…….
Was selected to participate in the study entitled:
Inhibition of polymicrobial biofilms formed by microorganisms isolated from the oral cavity of children in the west of Algeria.
Whose principal investigator is Ms. LAOUEDJ Nadia, student at AbouBaker Belkaid Tlemcen University.
I certify that I have given my consent for my child to participate in this study. I voluntarily agree that this child will be subject to oral swabs. And I understand that I am free to accept or refuse my child's participation in this study.
I have been informed that his identity will not be disclosed in any report or publication, and that any information relating to him will be treated confidentially.

Date : .....

Parent's Signature : …… الولي
امضاء

Investigator Signature : …….
امضاء الباحث

Annexe N°

Annexe N° 3 :

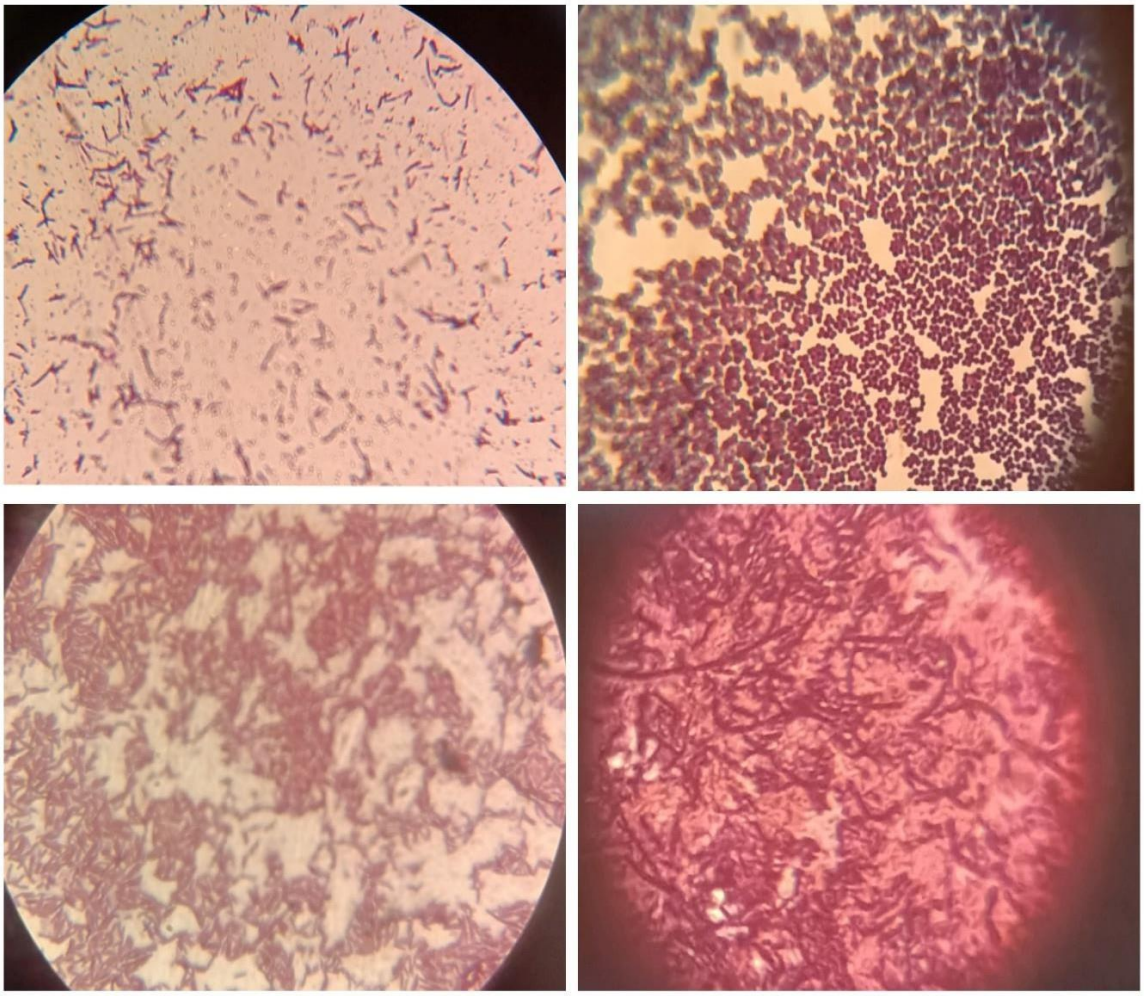
Prélèvement	Sexe	Age	Poids	Fréquence de brossage	Consommation de sucreries	Consommation de produits laitiers	Maladie bucco-dentaire	Etat de santé	Prise d'antibiotique	Catégorie socioprofessionnelle
P 38	F	13	56	2 fois	Tous les jours	1 produit / j	/	Sain	Non	Enseignant
P39	F	8	36	2 fois	Tous les jours	3 produits / j	Carie gingivite	Sain	Non	Enseignant
P40	F	7	22	1 fois	Tous les jours	Plus de 3p / j	Carie	Sain	Oui	Employé
P41	H	2	12	Jamais	3f / semaine	Plus de 3p / j	/	Sain	Non	Cadre
P43	H	10	31	1 fois	3f / semaine	Rarement	Muguet	Autisme	Oui	Employé
P44	F	10	36	1 fois	Tous les jours	Rarement	Carie aphte	Sain	Non	Employé
P48	F	11	30	1 fois	3f / semaine	3 produits / j	Carie	Asthme	Non	Artisan
P49	H	11	36	1 fois	4 à 5f/ semaine	3 produits / j	Carie gingivite aphte	Arthrite	Oui	Retraité
P52	H	6	17	1 fois	4 à 5f/ semaine	2 produits / j	Carie	Diabète	Non	Sans activ professionnelle
P53	H	4	15	Jamais	3f / semaine	1 produit / j	Carie muguet	Asthme	Non	Commerçant
P54	F	13	47	1 fois	3f / semaine	Plus de 3p / j	Gingivite aphte muguets	Insuff rénale	Non	Commerçant

P55	**H**	**14**	**112**	**1 fois**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Gingivite aphte muguets**	**Obésité**	**Non**	**Commerçant**
P56	**F**	**8**	**26**	**1 fois**	**3f / semaine**	**2 produits / j**	**Carie**	**Diabète**	**Non**	**Agriculteur**
P57	**H**	**10**	**51**	**1 fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Carie muguet**	**Diabète**	**Non**	**Retraité**
P58	**H**	**9**	**42**	**Jamais**	**Tous les jours**	**3 produits / j**	**Carie gingivite parodontite**	**Asthme**	**Oui**	**Ouvrier**
P66	**F**	**11**	**47**	**1 fois**	**3f / semaine**	**Rarement**	**Gingivite aphte parodontite**	**Insuff rénale**	**Oui**	**Employé**
P67	**H**	**2**	**11**	**Jamais**	**3f / semaine**	**3 produits / j**	**Aphte muguet**	**Obésité**	**Oui**	**Cadre**
P68	**H**	**6**	**40**	**1 fois**	**4 à 5f / semaine**	**Plus de 3p / j**	**Gingivite aphte muguet**	**Asthme**	**Oui**	**Employé**
P69	**H**	**5**	**22**	**1 fois**	**Tous les joues**	**2 produits / j**	**Carie**	**Crise d'épilepsi**	**Non**	**Commerçant**
P73	**F**	**3**	**25**	**Jamais**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Muguet**	**Diabète**	**Oui**	**Commerçant**
P74	**F**	**16**	**50**	**3 fois**	**4 à 5f / semaine**	**Rarement**	**Gingivite aphte muguet**	**Insuff rénale**	**Non**	**Dentiste**
P75	**F**	**13**	**45**	**1 fois**	**3f / semaine**	**1 produit / j**	**Carie muguet**	**Obésité**	**Non**	**Agriculteur**
P76	**F**	**15**	**120**	**2 fois**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Carie gingivite muguet**	**Crise d'épilepsie**	**Non**	**Commerçant**
P89	**H**	**6**	**27**	**1 fois**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Carie**	**Crise d'épilepsi**	**Non**	**Employé**

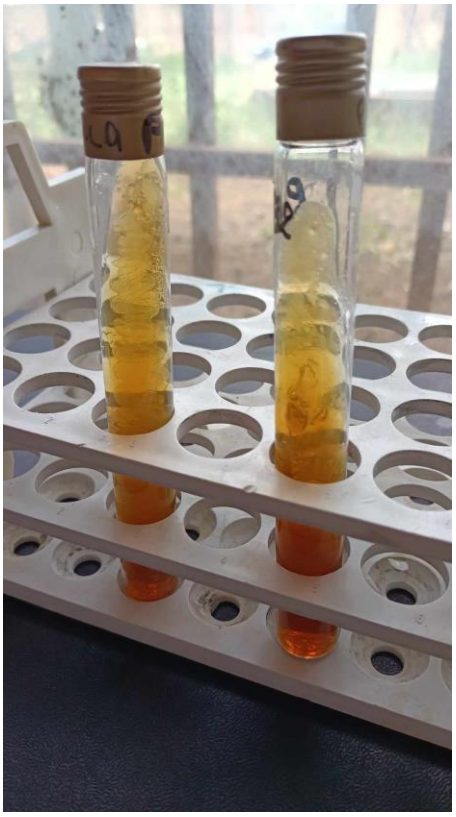
P90	**F**	**5.5**	**23**	**Jamais**	**Tous les jours**	**Rarement**	**/**	**Diabète**	**Non**	**Commerçant**
P91	**H**	**13**	**25**	**2 fois**	**Tous les jours**	**2 produits / j**	**Carie gingivite aphte**	**Asthme**	**Oui**	**Agriculteur**
P92	**F**	**11**	**50**	**2 fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Gingivite muguet**	**Diabète**	**Oui**	**Prof intermédiaire**
P93	**H**	**8**	**23**	**1 fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**/**	**Diabète**	**Non**	**Artisan**
P99	**H**	**4**	**18**	**2 fois**	**3f / semaine**	**2 produits / j**	**Carie aphte**	**Diabète**	**Oui**	**Chef d'entreprise**
P100	**F**	**8**	**20**	**1 fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Carie muguet**	**Asthme**	**Non**	**Cadre**
P101	**H**	**8**	**25**	**1 fois**	**4 à 5f / semaine**	**Rarement**	**Carie aphte**	**Asthme**	**Oui**	**Ouvrier**
P102	**H**	**12**	**32**	**1 fois**	**Tous les jours**	**Plus de 3 p / j**	**Carie gingivite aphte muguet**	**Asthme**	**Non**	**Employé**
P103	**F**	**3.5**	**28**	**2 fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Muguet**	**Asthme**	**Oui**	**Commerçant**
P104	**H**	**5**	**15**	**1 fois**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Muguet**	**Asthme**	**Non**	**Employé**
P105	**F**	**6**	**23**	**Jamais**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Carie gingivite parodontite**	**Asthme**	**Non**	**Sans activ professionnelle**
P106	**F**	**9**	**33**	**1 fois**	**Tous les jours**	**3 produits / j**	**Carie aphte**	**Asthme**	**Oui**	**Commerçant**
P107	**H**	**2**	**13**	**Jamais**	**Tous les jours**	**3 produits / j**	**/**	**Diabète**	**Non**	**Chef d'entreprise**
P116	**H**	**16**	**40**	**1 fois**	**3f / semaine**	**Plus de 3 p / j**	**Carie**	**Cancer**	**Oui**	**Cadre**

P117	**F**	**15**	**52**	**1 fois**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Gingivite muguet**	**Diabète**	**Non**	**Ouvrier**
P118	**F**	**10**	**30**	**Jamais**	**Tous les jours**	**Rarement**	**Carie muguet**	**Asthme**	**Oui**	**Employé**
P132	**H**	**11**	**26**	**1 fois**	**4 à 5 f /semaine**	**3 produits / j**	**Carie Gingivite**	**Diabète**	**Non**	**Agriculteur**
P133	**F**	**8**	**38**	**1 fois**	**Tous les jours**	**1 produit /j**	**Carie Gingivite aphte muguet**	**Asthme**	**Oui**	**Agriculteur**
P134	**H**	**5**	**18**	**Jamais**	**Tous les jours**	**2 produits / j**	**Carie muguet**	**Diabète**	**Non**	**Commerçant**
P135	**F**	**7**	**24**	**1fois**	**Tous les jours**	**1 produit / j**	**Carie aphte muguet**	**Diabète**	**Non**	**Commerçant**
P136	**F**	**8**	**29**	**1 fois**	**4 à 5f / semaine**	**1 produit / j**	**Carie muguet**	**Diabète**	**Oui**	**Commerçant**

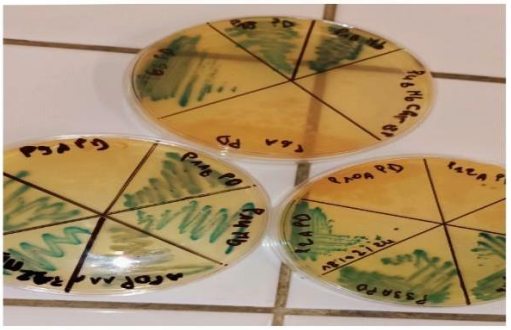
Annexe N° 4 : Observation microscopique de test coloration de Gram

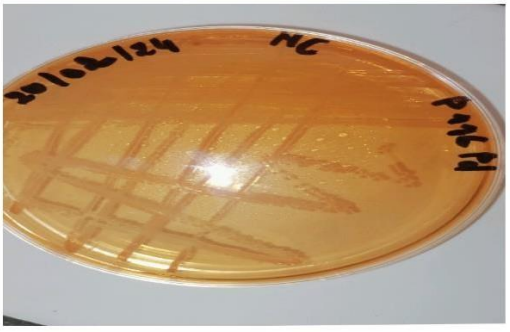


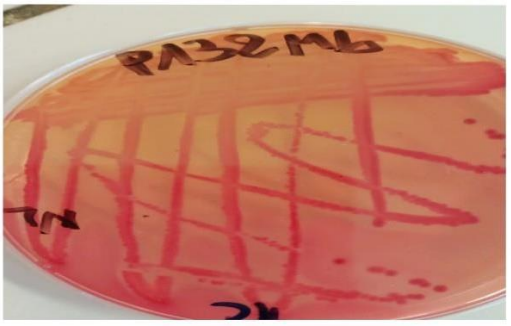
Annexe N° 5 : Résultats du test TSI



Annexe N° 6 : Isolement des souches sur des boites de milieux de culture spécifiques







Annexe N°7 : Aspects et couleurs des colonies orientant l'identification des levures appartenant au genre Candida CHROM-Agar® (Odds et Bernaerts, 1994)

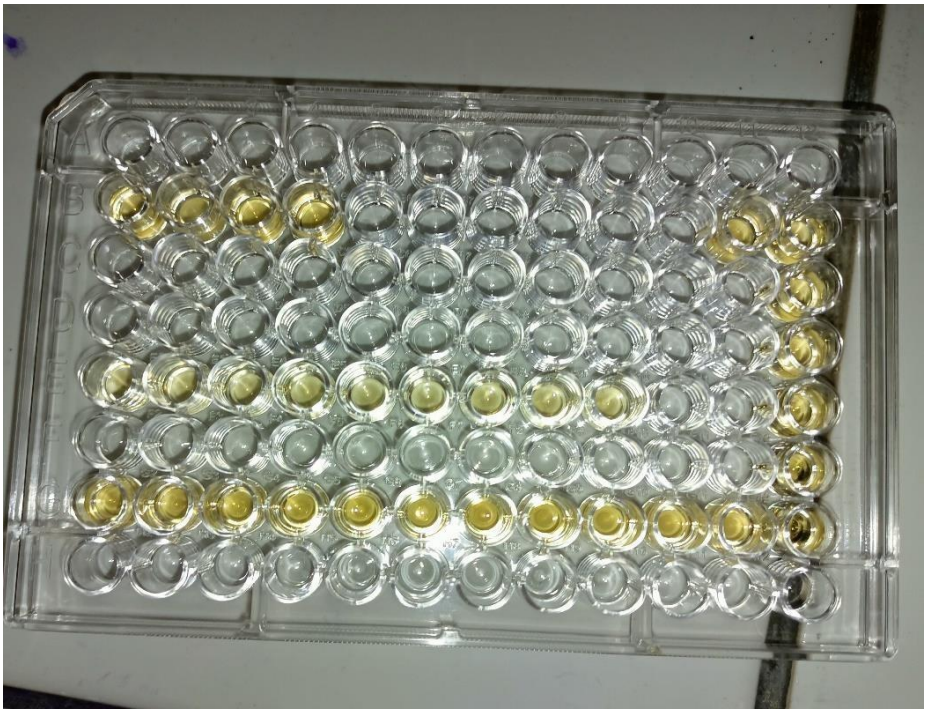
Levures	Couleurs des colonies
Candida albicans	**Vert clair**
Candida tropicalis	**Bleu à violet**
Candida glabrata	**Pourpre, flou**
Candida krusei	**Rose pâle à blanchâtre**
Autres levures	**Couleur crème**

Annexe N° 8 :

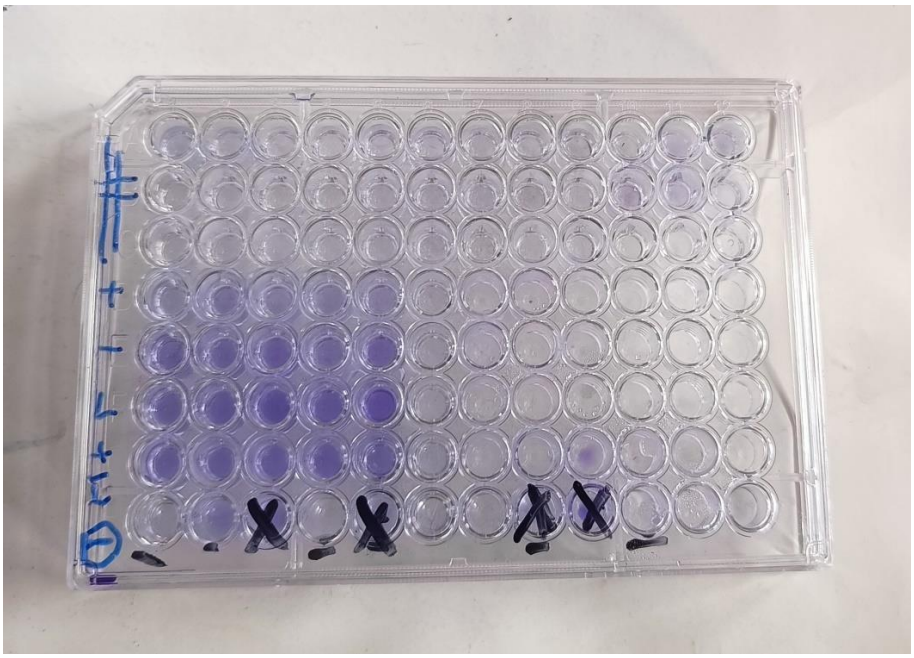
Selon **(Touhami) 2017**, la classification botanique du thym est la suivante :

- **Règne :** Plantae.
- **Division :** Spermaphytes.
- **Subdivision :** Angiospermes.
- **Classe :** Dicotylédones.
- **Sous classe :** Métachlamydées
- **Ordre :** Lamiales,
- **Sous ordre :** Verbéninées.
- **Famille :** Lamiaceae.
- **Genre :** Thymus.
- **Espèce :** Thymus numidicus Poiret.

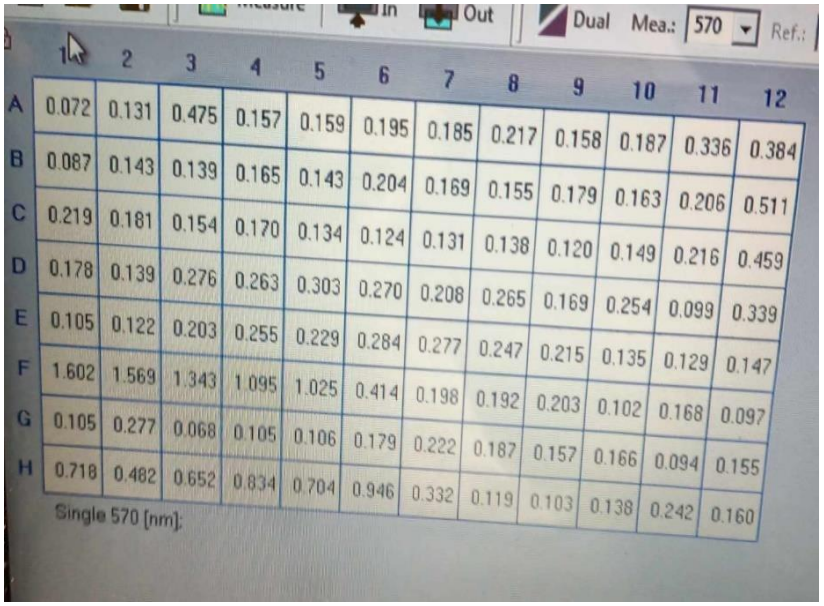
Annexe N° 9 : Microplaques 96 puits inoculé par la suspension et l'huile essentielle de thym



Annexe N° 10 : Coloration de biofilm par cristal violet sur microplaques 96 puits



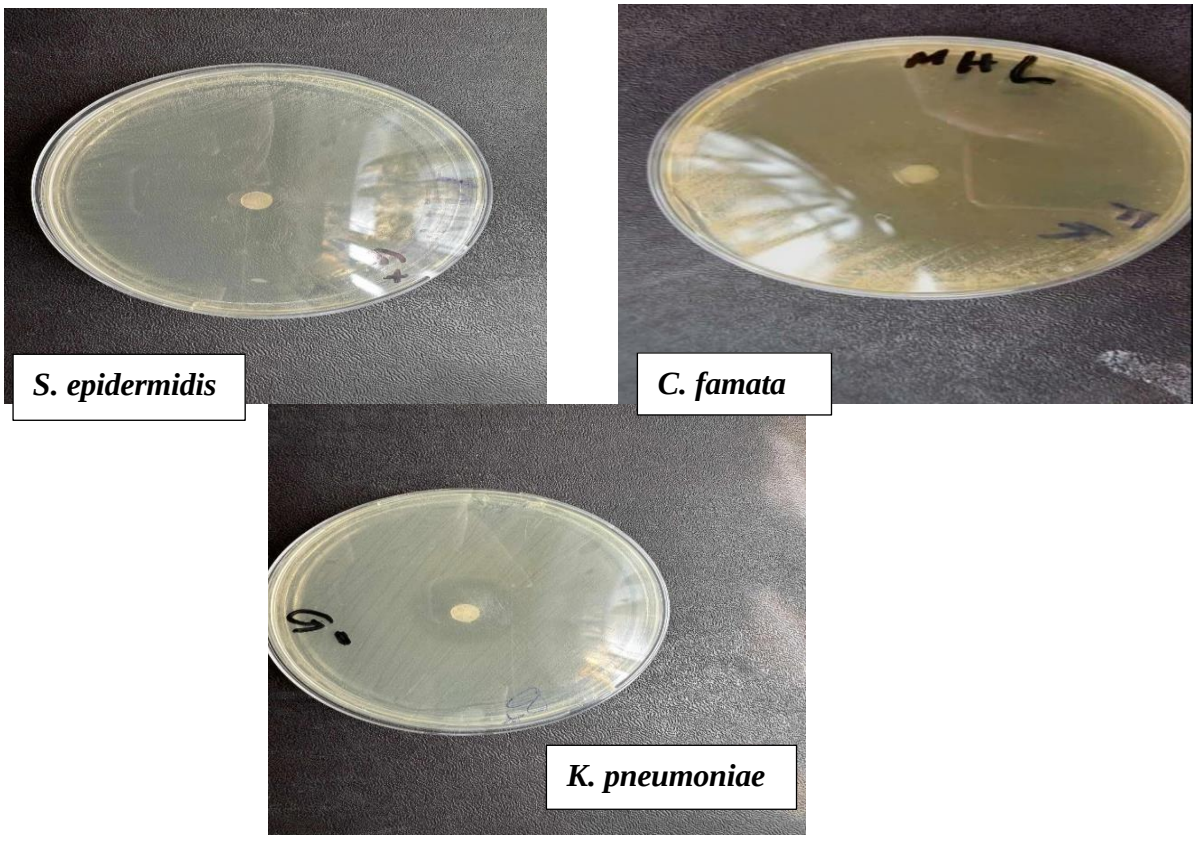
Annexe N° 11 : Lecture de la microplaque inoculée par la suspension sous ELIZA



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.072	0.131	0.475	0.157	0.159	0.195	0.185	0.217	0.158	0.187	0.336	0.384
B	0.087	0.143	0.139	0.165	0.143	0.204	0.169	0.155	0.179	0.163	0.206	0.511
C	0.219	0.181	0.154	0.170	0.134	0.124	0.131	0.138	0.120	0.149	0.216	0.459
D	0.178	0.139	0.276	0.263	0.303	0.270	0.208	0.265	0.169	0.254	0.099	0.339
E	0.105	0.122	0.203	0.255	0.229	0.284	0.277	0.247	0.215	0.135	0.129	0.147
F	1.602	1.569	1.343	1.095	1.025	0.414	0.198	0.192	0.203	0.102	0.168	0.097
G	0.105	0.277	0.068	0.105	0.106	0.179	0.222	0.187	0.157	0.166	0.094	0.155
H	0.718	0.482	0.652	0.834	0.704	0.946	0.332	0.119	0.103	0.138	0.242	0.160

Single 570 [nm]:

Annexe N°12 : Résultat de l'aromatogramme



Annexe N° 13 :

La sensibilité des souches en fonction du diamètre des zones d'inhibition (**Ponce et al., 2003)**

Le diamètre	**La sensibilité**
< 6 mm	Non sensible
Entre 9 et 14 mm	Sensible
Entre 15 et 19 mm	Très sensible
> 20 mm	Extrêmement sensible