

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

SALAH Halima et CHERAD Hafida

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

**Isolement et identification des bactéries du microbiote
buccal résident et leur caractérisation pour la
formation des biofilms dans la cavité orale**

Soutenu le 23/06/2025

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Présidente	BAHLOUL Halima Aurass	MCA	U. Mostaganem
Encadrant	BOUABSA Foufa	MCB	U. Mostaganem
Co-Encadrant	BEKKAR Nour Elhouda	MCB	U. Mascara
Examinatrice	BENGUENAB Asma	MCB	U. Mostaganem

Année universitaire 2024/2025

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier « **Allah** » qui nous a donné la force, la volonté et le courage pour terminer ce modeste travail.

Nous tenons à remercier notre encadrant Dr BOUABSA F. et co-encadrant Dr BEKKAR N. pour leur orientation, leur confiance et leur patience qui nous ont été précieuses afin de mener notre travail à bon port.

Qu'elles trouvent dans ce travail un hommage vivant à leur haute personnalité.

Nous tenons à remercier sincèrement les membres du jury : Dr BAHLOUL H. et Dr BENGUENAB A. qui nous ont honoré par l'évaluation de ce modeste travail.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leurs compétences nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, on remercie tous nos camarades, amis et connaissances qui ont pris part à ce mémoire, d'une façon ou d'une autre, et l'ont rendu possible.

Dédicace

À ma chère famille « Cherad »,

Je vous dédie ce modeste travail en signe de reconnaissance infinie.

À mon père bien-aimé, pilier de ma vie, merci pour tes sacrifices et ton soutien silencieux mais puissant.

À ma mère, source inépuisable d'amour et de prières, que Dieu te protège pour moi.

À ma sœur, ma complice et mon soutien moral dans toutes les étapes, je te remercie pour ta présence constante.

À mon encadrante, Madame Bouabsa Foufa,

Recevez toute ma gratitude pour votre encadrement précieux, vos conseils éclairés et votre bienveillance tout au long de ce parcours.

À l'honorable commission de soutenance,

Merci pour l'intérêt porté à mon travail, pour votre lecture attentive, et pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'évaluer mon mémoire.

Hafida

Dédicace

Par ces mots simples mais sincères, Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance à ma précieuse famille Saleh, pour son amour, son soutien et sa présence constante à mes côtés.

✨ À mon cher père et ma chère mère, vous êtes les piliers de ma réussite.

Grâce à vos sacrifices, vos encouragements et votre foi en moi, j'ai pu franchir chaque étape avec confiance, ce diplôme est autant le vôtre que le mien. Merci infiniment. ✨

* Une pensée profonde à ma grand-mère bien-aimée ♥, qui nous a quittés trop tôt.

J'aurais tant voulu qu'elle partage cette joie avec nous aujourd'hui.

Que Dieu lui accorde Sa miséricorde et l'accueille dans Son vaste paradis. ♥

* Un remerciement tout particulier à Dr. Bouabsa F., notre encadrante dévouée, pour sa précieuse aide, ses conseils avisés et son accompagnement bienveillant tout au long de la réalisation de notre mémoire.

Sa disponibilité et son expertise ont été d'un soutien inestimable. Merci du cœur



♥ À vous tous... MERCI du fond du cœur ♥

Halima

Résumé

Le microbiote buccal constitue une communauté microbienne diversifiée composée de bactéries, virus et champignons. Grâce aux progrès des techniques d'identification, plus de 700 espèces ont été reconnues, bien que certaines restent encore non caractérisées. Cette étude a pour objectif d'isoler, d'identifier et de caractériser les microbes résidentes les plus impliquées dans la formation du biofilm dans des prélèvements cliniques.

Pendant l'étude, des prélèvements ont été effectués chez des sujets sains et malsains. Les échantillons ont été collectés dans les cliniques dentaires de la ville de Mostaganem, avec des écouvillons stériles et transférés dans des tubes contenant 1 ml de bouillon nutritif au laboratoire, où ils ont été incubés pendant 24h à 37°C. Ensuite, les microorganismes ont été isolés sur différents milieux de culture après identifier macroscopiquement, microscopiquement et par des tests biochimiques. De plus, les isolats ont été testés pour leur sensibilité/résistance vis-à-vis les antibiotiques. Enfin la formation du biofilm a été détecté qualitativement en utilisant des méthodes sur la gélose Rouge Congo et celle dans des tubes à essai en verre.

Au total, 15 souches microbiennes ont été isolées pendant l'étude, dont 24 étaient Gram positives et 3 souches Gram négatives. L'espèce la plus dominante des souches Gram positives était *Staphylococcus sp* (n = 9). D'autre part, Dans l'ensemble, les familles dominées étaient des *Staphylococcaceae* suivie par les *Streptococcaceae* et les *Enterococcaceae*. L'une des souches de *Klebsiella pneumoniae* les plus cariogènes a également été isolée. Les tests de formation de biofilm ont révélé une forte capacité d'adhésion chez les souches isolées.

La recherche actuelle a révélé que la formation de biofilms chez les espèces *Streptococcus sp*, *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* était prédominante contre les souches de *Candida albicans*. En définitive, la complexité de l'interaction hôte-microbiote buccal et l'importance des biofilms soulignent la nécessité de poursuivre les efforts de recherche dans ce domaine. Une meilleure compréhension de ces phénomènes est la clé pour maintenir un équilibre microbien favorable et améliorer significativement la santé bucco-dentaire globale de la population.

Mots clés : Résistance microbienne, biofilm, microbiote buccal, bactéries, *Candida albicans*.

Abstract

The oral microbiota constitutes a diverse microbial community composed of bacteria, viruses and fungi. Thanks to advances in identification techniques, more than 700 species have been recognized, although some remain uncharacterized. This study aims to isolate, identify and characterize the resident microbes most involved in biofilm formation in clinical samples.

During the study, samples were taken from healthy and unhealthy subjects. The samples were collected in the dental clinics of the city of Mostaganem, with sterile swabs and transferred and tubes containing 1 ml of nutrient broth to the laboratory, where they were incubated for 24 hours at 37°C. Then, the microorganisms were isolated on different culture media after identification macroscopically, microscopically and by biochemical tests. In addition, the isolates were tested for sensitivity/resistance to antibiotics. Finally, the formation of biofilm was qualitatively detected using methods on Red Congo agar and that in glass test tubes.

A total of 15 microbial strains were isolated during the study, 24 of which were Gram-positive and 3 were Gram-negative. The most dominant species of Gram-positive strains was *Staphylococcus* sp (n = 9). On the other hand, overall, the dominated families were *Staphylococcaceae* followed by *Streptococcaceae* and *Enterococcaceae*. One of the most cariogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* was also isolated. Biofilm formation tests revealed a strong adhesion capacity in the isolated strains.

Current research has revealed that biofilm formation in *Streptococcus* sp, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* species was predominant against *Candida albicans* strains. Ultimately, the complexity of the host-oral microbiota interaction and the importance of biofilms highlight the need to continue research efforts in this field. A better understanding of these phenomena is the key to maintaining a favorable microbial balance and significantly improving the overall oral health of the population.

Keywords: Microbial resistance, biofilm, oral microbiota, bacteria, *Candida albicans*.

الملخص

الميكروبيوتا الفموية تُشكل مجتمعًا ميكروبيًا متنوعًا يتكون من البكتيريا والفيروسات والفطريات. وبفضل التقدم في تقنيات التعرف الميكروبي، تم التعرف على أكثر من 700 نوع، رغم أن بعض الأنواع لا تزال غير مميزة بعد. تهدف هذه الدراسة إلى عزل وتحديد وتصنيف الكائنات المجهرية المقيمة الأكثر مشاركة في تكوين البيوفيلم ضمن عينات سريرية.

خلال الدراسة، تم أخذ عينات من أشخاص أصحاء وآخرين مرضى. وقد جُمعت هذه العينات من العيادات في مدينة مستغانم، باستخدام مسحات معقمة وُضعت في أنابيب تحتوي على 1 مل من الوسط الغذائي، وتم تحضينها طوال لمدة 24 ساعة 37°م. بعد ذلك، تم عزل البكتيريا والتعرف عليها باستخدام الفحص بالعين المجردة، الفحص المجهرى، الاختبارات البيوكيميائية واختبار الحساسية للمضادات الحيوية (الأنثيبوجرام). بالإضافة إلى ذلك، تم الكشف عن تكوين البيوفيلم بطريقة نوعية باستخدام وسط الأغار المحتوي على الكونغو الأحمر، وكذلك في أنابيب اختبار زجاجية.

بشكل عام، تم عزل 15 عزلة ميكروبية خلال الدراسة، منها 24 عزلة موجبة لصبغة غرام و3 عزلات سالبة لصبغة غرام. وكان النوع الأكثر شيوعًا بين العزلات موجبة الغرام هو *Staphylococcus* sp (عدد = 9). من جهة أخرى، كانت العائلات البكتيرية السائدة هي *Staphylococcaceae* تلتها *Streptococcaceae* و *Enterococcaceae* كما تم عزل أحد أكثر الأنواع المسببة للتسوس، وهي *Klebsiella pneumoniae*. أظهرت اختبارات تكوين البيوفيلم قدرة كبيرة على الالتصاق لدى العزلات المعزولة.

كشفت الدراسة أن تكوين البيوفيلم كان أكثر بروزًا لدى أنواع *Streptococcus* sp و *Escherichia coli*، مقارنة بعزلات *Candida albicans* وفي الختام، فإن تعقيد التفاعل بين المضيف والميكروبيوتا الفموية، وأهمية البيوفيلم، يؤكدان ضرورة مواصلة الجهود البحثية في هذا المجال. إذ إن الفهم الأفضل لهذه الظواهر يمثل مفتاحًا للحفاظ على توازن ميكروبي صحي وتحسين الصحة الفموية العامة للسكان بشكل ملموس.

الكلمات المفتاحية: مقاومة الميكروبات، الأغشية الحيوية، ميكروبات الفم، البكتيريا، *Candida albicans*.

Table des Matières

Résumé	
Table des matières	I
Liste des figures	II
Liste des tableaux	IV
Liste des abréviations	V
Introduction	Page 1
1 Chapitre 1 : Le Microbiote Buccal	Page 3
1.1 Définition et rôle du microbiote buccal	Page 4
1.2 Développement et diversité	Page 5
1.3 Interactions microbiennes	Page 6
1.4 Facteurs influençant le microbiote	Page 7
1.5 Dysbiose et pathologies associées	Page 8
1.6 Axe bouche-organe	Page 9
2 Chapitre 2 : Le Biofilm Microbien	Page 24
2.1 Définition et organisation du biofilm	Page 24
2.2 Formation de la plaque dentaire	Page 26
2.3 Composition microbienne dynamique	Page 28
2.4 Facteurs influençant le biofilm	Page 29
2.5 EPS : composition et fonctions	Page 30
2.6 Métabolisme et Quorum Sensing	Page 31
2.7 Résistance et virulence	Page 34
2.8 Prévention et contrôle	Page 35
3 Chapitre 3 : Matériel et Méthodes	Page 37
3.1 Lieu et objectif de l'étude	Page 37
3.2 Prélèvements et échantillonnage	Page 38
3.3 Isolement sur milieux sélectifs	Page 39
3.4 Tests d'identification (Gram, biochimiques)	Page 41
3.5 Antibiogramme	Page 49
3.6 Détection de biofilm	Page 51
4 Chapitre 4 : Résultats et Discussion	Page 54
4.1 Résultats d'isolement et identification	Page 54
4.2 Tests biochimiques	Page 58
4.3 Antibiogramme	Page 66
4.4 Formation de biofilm	Page 70
4.5 Discussion globale	Page 73
Conclusion	Page 80
Références bibliographiques	Page 81

Liste des Figures

- Figure 1 : acquisition du microbiote lié aux factures maternelles et à l'enfant (page 5)
- Figure 2 : LEFSe ou cladogram représentant le microbiote de deux groupes d'individus dans les conditions alimentaire à jeun puis norris (page 6)
- Figure 3 : Distribution quantitative de la diversité bactériennes cultivée et non cultivée composant le microbiote oral (page 10)
- Figure 4 : Origines potentiel de la dysbiose (page 17)
- Figure 5 : les conséquences du dysbiose de microbiote oral (page 19)
- Figure 6 : Représentation d'une mucoite péri-implantaire (page 20)
- Figure 7 : Microbiote oral vs sous microscopie électronique à balayage après coloration des bactéries (page 25)
- Figure 8 : Étapes de formation du biofilm (page 27)
- Figure 9 : Les complexes bactériennes (page 29)
- Figure 10 : Le biofilms bactériennes est une structure hétérogène (page 33)
- Figure 11 : lieux de prélèvement des (page 38)
- Figure 12 : Isolement sur différents milieux de culture après l'enrichissement (page 40)
- Figure 13 : Les étapes de la coloration de gram (page 43)
- Figure 14 : Différents types d'hémolyses (α , β et γ) sur gélose au sang frais (page 48)
- Figure 15 : Schématisation du protocole d'identification CGP et BGN (page 48)
- Figure 16 : production de biofilms par la méthode de tubes..à essai en verre (page 52)
- Figure 17 : Détection de la production de slim et la formation de biofilm sur RCA (page 53)
- Figure 18 : Aspect des colonies sur le milieu Macconkey (page 54)
- Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu BEA (page 55)
- Figure 20 : Aspect des colonies sur la gélose au sang (page 55)
- Figure 21: Aspect des colonies sur gélose Chapman (page 56)
- Figure 22 : Aspect des colonies sur gélose Saboroud+chloramphenicol (page 56)
- Figure 23 : Résultats de la coloration de Gram (page 57)

Figure 24 : Observation microscopique de d'une levure suspecte d'être *Candida albicans* (page 59)

Figure 25 : Résultat du test de citrate de simmons (page 60)

Figure 26 : Résultats du test oxydase (page 60)

Figure 27 : Test de catalase positif (page 62)

Figure 28 : Culture sur gélose au sang β -hémolyse (page 63)

Figure 29 : Résultats d'un test de coagulase positif (page 63)

Figure 30 : Observation microscopique du test de blastése (page 64)

Figure 31 : Résultats de l'identification biochimiques de *Candida albicans* (page 65)

Figure 32 : Résultats de l'antibiogramme de *E.coli* ,*K.pneumoniae*,*E. aerogenes* (page 67)

Figure 33 : Résultats de l'antibiogramme (Page 68)

Figure 34 : Résultats de l'antibiogramme de streptococcus pyogènes (E01) (page 69)

Figure 35 : Production de biofilms chez les staphylocoque, entérobactéries et les streptocoques (page 72)

Figure 36 : Production de biofilms sur gélose Rouge congo (Page 73)

Figure 37 : Absence de production de biofilms sur gélose Rouge congo...par *Candida albicans* (Page 73)

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Composition du microbiote buccale (page 9)

Tableau 2 : La réparation des prélèvements selon leur origine, le sexe et l'âge des patients (page 39)

Tableau 3 : les différents milieux de culture utilisés pour l'isolement des germes (page 41)

Tableau 4 : Tests d'identification biochimique (page 46)

Tableau 5 : Liste des antibiotiques utilisés (page 50)

Tableau 6 : Résultats de l'identification macroscopique des isolats (page 57)

Tableau 7 : Résultats de l'identification microscopique des isolats (x100) (page 58)

Tableau 8 : Résultats de l'identification des entérobactéries présumées (page 59)

Tableau 9 : Résultats de l'identification des staphylocoques présumées (page 61)

Tableau 10 : Résultats de l'identification des entérocoques et streptocoques présumés (page 62)

Tableau 11 : Résultats de l'antibiogrammes des entérobactéries (page 67)

Tableau 12 : Résultats de l'antibiogramme des staphylocoques (page 68)

Tableau 13 : Résultats de l'antibiogramme de streptocoque (page 69)

Liste des abréviations

TSB	Trypticase Soy Broth (Bouillon trypticase soja)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solution saline tamponnée au phosphate)
CRA	Congo Red Agar (Gélose Rouge Congo)
MH	Mueller-Hinton (Milieu de culture pour antibiogramme)
CASFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
BHIB	Brain Heart Infusion Broth (Bouillon cœur-cerveau)
BGN	Bacilles à Gram Négatif
CGP	Coques à Gram Positif
AMP	Ampicilline
P	Pénicilline G
RFP	Rifampicine
E	Érythromycine
CD	Clindamycine
NA	Acide nalidixique
GEN	Gentamicine
NTX	Nitroxoline
S	Streptomycine
RM	Rouge Méthyle
VP	Voges-Proskauer
ONPG	Ortho-Nitrophenyl- β -galactoside
TSI	Triple Sugar Iron
BEA	Bile Esculine Azide (milieu sélectif pour entérocoques)

Introduction



Introduction

Le microbiote buccal est une communauté diversifiée d'organismes, incluant des virus, des champignons et des bactéries. Grâce aux progrès des techniques moléculaires et microbiologiques, plus de 700 espèces ont été identifiées à ce jour, et d'autres restent à découvrir. Cependant, peu de recherches approfondies ont été menées pour élucider la composition exacte de la flore buccale et des bactéries qui la constituent. Il est pourtant établi que des micro-organismes sont naturellement présents sur les tissus de surface de tout être humain, notamment dans la cavité buccale. Le nombre et le type de ces microbes varient considérablement en fonction de l'âge, du régime alimentaire et des niveaux d'hygiène personnelle de l'individu (Alghamdi, 2021).

Ce microbiote joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte, le maintien de l'équilibre immunitaire local, ainsi que dans la protection contre les pathogènes. Cependant, lorsqu'un déséquilibre de cette flore survient, des pathologies peuvent apparaître, notamment les maladies parodontales et les caries dentaires (Marsh et Zaura, 2017). L'un des mécanismes les plus importants adoptés par ces micro-organismes pour assurer leur survie est la formation du biofilm. Le biofilm buccal est une structure multicellulaire organisée, formée d'une communauté bactérienne protégée par une matrice extracellulaire. Il adhère fermement aux surfaces dentaires et représente une barrière contre les traitements antimicrobiens et les défenses de l'hôte (Flemming *et al.*, 2016 ; Diaz *et al.*, 2021).

Du point de vue clinique, le biofilm est considéré comme un facteur pathogène majeur. Il est impliqué dans diverses maladies bucco-dentaires telles que la gingivite, la parodontite et les caries. Sa nature protectrice rend l'élimination complète difficile, d'où l'importance de comprendre les espèces bactériennes impliquées dans sa formation, ainsi que leur mécanisme d'organisation (Koo *et al.*, 2017 ; Lemos *et al.*, 2019).

Quelles sont donc les bactéries résidentes du microbiote buccal spécifiquement impliquées dans l'initiation et la maturation des biofilms oraux, et quelles sont les caractéristiques clés qui confèrent à ces bactéries une capacité élevée à former ou à contribuer à la formation de biofilms dans la cavité orale ?

Notre objectif général pour ce mémoire vise à isoler, identifier et caractériser les bactéries clés du microbiote buccal résident, en mettant l'accent sur leurs propriétés de formation de biofilm.



Ce mémoire est organisé en deux grandes parties distinctes, chacune abordant un aspect fondamental de notre étude.

La première partie de ce mémoire est consacrée à une revue bibliographique approfondie, essentielle pour poser les bases théoriques de notre travail. Elle se divise en deux chapitres :

Chapitre 1 : Le Microbiote Buccal, ce chapitre offre une exploration détaillée du microbiote buccal. Nous y examinerons sa composition complexe, sa diversité, les facteurs influençant son équilibre et son rôle crucial dans la santé et les maladies bucco-dentaires.

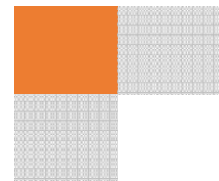
Chapitre 2 : Le Biofilm Microbien, dans ce second chapitre, nous nous concentrerons sur le biofilm buccal. Nous décrirons en détail les mécanismes de sa formation, depuis l'adhésion initiale des micro-organismes jusqu'à sa maturation. Nous analyserons également ses caractéristiques structurelles, physiologiques et fonctionnelles, ainsi que son impact sur l'environnement oral.

La seconde partie du mémoire présente notre travail expérimental, structuré pour détailler notre démarche scientifique et les découvertes réalisées. Elle est également subdivisée en deux chapitres :

Chapitre 3 : Matériels et Méthodes, ce chapitre est dédié à la description exhaustive des matériels et des méthodes employés lors de nos expériences. Nous y détaillerons les protocoles, les équipements utilisés et les techniques mises en œuvre.

Chapitre 4 : Résultats et Discussion, le dernier chapitre expose les résultats obtenus lors de nos expérimentations. Chaque résultat sera présenté de manière claire et précise, puis fera l'objet d'une discussion approfondie. Cette discussion permettra d'interpréter les données, de les confronter aux connaissances existantes issues de la littérature, et de dégager les principales conclusions de notre recherche.

Partie I. Etude Bibliographique



Chapitre 1: Le Microbiote Buccal





Le Microbiote Buccal : Un Écosystème Complexe au Service de la Santé (et parfois de la Maladie)

I. Introduction au microbiote buccal

I.1. Définition et importance

Le microbiote oral désigne la communauté microbienne complexe vivant dans la cavité buccale, un écosystème riche, non uniforme et en constante variation. Plus de 1000 espèces de micro-organismes y coexistent, incluant bactéries, virus, champignons, archées et protozoaires. Ce milieu, caractérisé par une forte hétérogénéité, une humidité et une chaleur constantes, favorise la colonisation microbienne sur différentes surfaces buccales telles que les dents, la langue, la salive, les muqueuses, le palais et les poches parodontales (Dubois *et al.*, 2024).

Le microbiote qui y réside est essentiel à la santé buccale. Il comprend à la fois des bactéries bénéfiques et des espèces potentiellement pathogènes, même dans un état de santé dit « sain ». Le maintien de l'équilibre entre ces espèces, vivant en symbiose grâce à des interactions comme la syntrophie (échange de nutriments) ou le quorum sensing (communication bactérienne), est crucial pour préserver l'homéostasie (Minne, 2024).

Les bactéries de la flore buccale commensale ont un rôle protecteur, mais certaines peuvent provoquer des caries, des gingivites ou des réactions à distance en cas de dysbiose. Le maintien d'un microbiote sain dépend de chaque individu.

Le microbiote buccal joue un rôle crucial dans la santé orale en assurant la prévention des agents pathogènes : il empêche l'installation de bactéries nocives par compétition, production de substances antimicrobiennes, et stimulation du système immunitaire. Il maintient également l'équilibre de l'écosystème buccal en favorisant une diversité bactérienne saine, ce qui prévient les déséquilibres pouvant mener à des maladies comme la carie ou la gingivite. Enfin, il contribue directement à la santé des dents et des gencives en régulant le pH et en limitant la production d'acides responsables des caries, tout en inhibant la prolifération de bactéries inflammatoires telles que *P. gingivalis* (Minty, 2021).



La salive, contenant environ 10^8 microorganismes/mL, représente une phase planctonique transitoire du microbiote oral, avec des bactéries provenant principalement de la langue, éliminées par déglutition sans ne se multiplier ni être pathogènes. Les bactéries forment un microbiote résident structuré en biofilm sur les surfaces dures (dents, prothèses) et muqueuses (tissus mous). Sur les surfaces dures, elles forment des biofilms épais, tandis que la desquamation des muqueuses empêche leur formation. Le microbiote résident est stable et protecteur, tandis que le microbiote transitoire est temporaire et peut être inoffensif ou pathogène (Langella, 2017).

I.2. Développement du microbiote buccal

Le microbiote oral est acquis dès la naissance, transmis de la mère à l'enfant. Sa composition varie selon le mode d'accouchement et l'alimentation (Figure 1), les nourrissons allaités ayant souvent une prédominance de lactobacilles. Ce microbiote est unique en raison de la diversité des muqueuses buccales et de la présence des dents, qui constituent la seule surface non desquamante du corps humain. La colonisation bactérienne chez le nourrisson est cruciale pour sa santé et son immunité, étant façonnée par l'accouchement (l'accouchement vaginal transmet une flore bénéfique, tandis que la césarienne réduit la diversité microbienne), l'alimentation (le lait maternel favorise les bactéries bénéfiques, contrairement au lait infantile), et l'environnement (un milieu riche en interactions encourage une plus grande diversité bactérienne, à l'opposé d'un environnement stérile) (Nguyen, 2018).

Pendant les premiers mois de la vie, alors que le nouveau-né n'a pas de dents, les seules surfaces pouvant être colonisées sont les muqueuses. Les premières bactéries qui s'implantent sont *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus mitis* représentant presque 98 % de la flore buccale à cet âge-là. Quelques mois après la naissance, De nombreux anaérobies à Gram négatif existent déjà sur la muqueuse buccale. Avec l'éruption dentaire, le microbiote oral se réorganise, permettant à des bactéries spécifiques comme *Streptococcus*, *Veillonellae* et *Fusobacteria* de coloniser le parodonte (Minty, 2021).

À l'adolescence, la flore buccale se rapproche de celle de l'adulte. Cette période est soumise à des changements hormonaux. À l'âge adulte, la flore buccale sera affectée par la pathologie en particulier les caries dentaires et les maladies parodontales (Mallet, 2006).

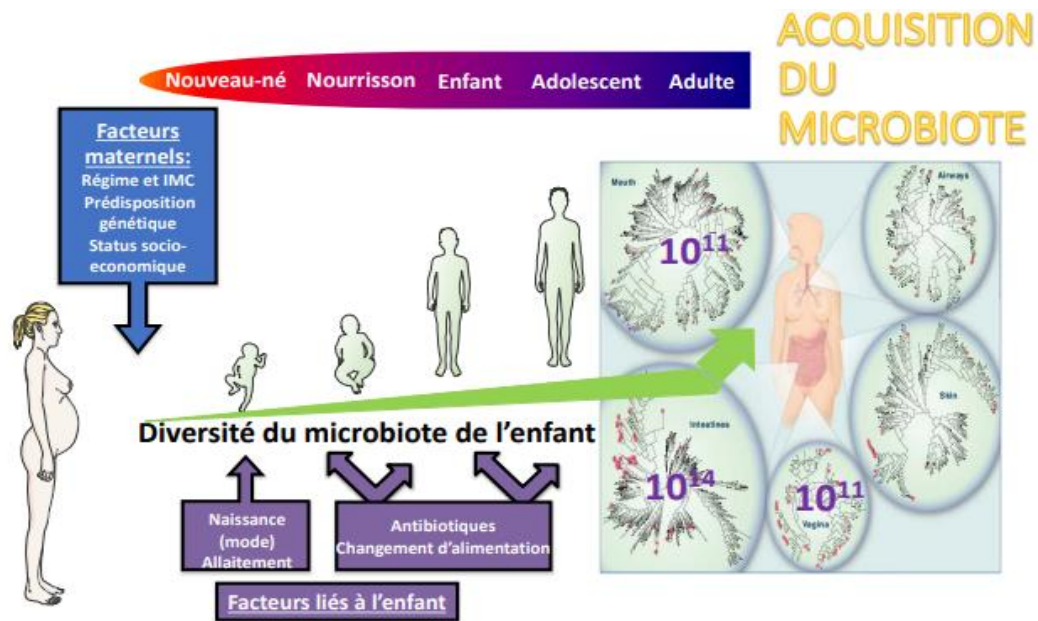


Figure 1 : Acquisition du microbiote lié aux facteurs maternels et à l'enfant (Serino *et al.*, 2017).

I.3. Méthodes d'étude du microbiote buccal

I.3.1. Les cultures microbiennes

La technique classique d'étude de ces bactéries était la culture bactérienne : il s'agissait de prélever de la plaque dentaire en bouche, et de faire croître les colonies bactériennes ainsi récoltées dans un milieu de laboratoire, comme une boîte de Petri. Cette technique avait de nombreuses limites : certaines bactéries ne survivaient pas au prélèvement, et l'ensemble de la biologie très complexe du biofilm n'était pas reproduite fidèlement dans le milieu de laboratoire. Ainsi, le nombre de bactéries identifiables par culture était limité, et la compréhension de leur fonctionnement était également largement partielle (Loreto Abuselme et collaborateurs, 2021).

I.3.2. Approches moléculaires modernes

La PCR quantitative est une méthode rapide et sensible utilisée pour identifier et quantifier des microorganismes connus en amplifiant des séquences spécifiques d'ADNr (16S pour les bactéries, 18S pour les eucaryotes) à l'aide d'amorces fluoromarquées. Bien que standardisée, cette



technique ne permet pas de détecter de nouvelles espèces. Le séquençage métagénomique étudie le microbiote en identifiant sa composition (ciblée) ou ses fonctions (globale). La méthode ciblée (ex. ADNr 16S) identifie les espèces présentes, tandis que la méthode globale séquence tout l'ADN pour analyser les gènes actifs. Les études orales utilisent surtout la métagénomique ciblée sur les bactéries procaryotes (Thomas, 2021).

Le métatranscriptome représente l'ensemble des gènes et les fonctions exprimées (les transcriptomes) par les différents microorganismes d'un échantillon. Cette technique permet d'analyser l'ensemble des ARN messagers produits par les micro-organismes présents dans la bouche. Elle permet d'identifier les gènes activement exprimés à un moment donné, offrant ainsi une compréhension des fonctions réelles du microbiote buccal, de ses interactions avec l'environnement buccal et de sa réponse aux perturbations comme l'hygiène, l'alimentation et les maladies (Thomas, 2021).

Une des représentations les plus utilisées est le LEfSe ou cladogramme, exemple Figure 2 représentant les bactéries buccales significativement différentes entre les deux groupes d'individus, ici : à jeun et nourris.

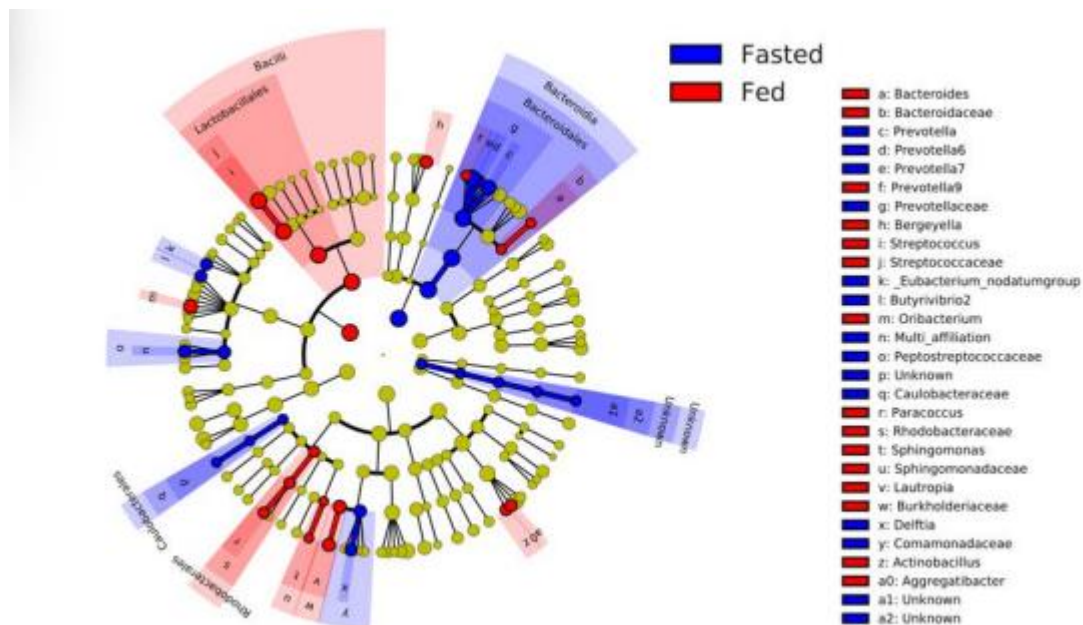


Figure 2 : LEfSe ou cladogramme représentant le microbiote de deux groupes d'individus dans les conditions alimentaires à jeun puis nourris (Minty *et al.*, 2020).



I.3.3. La culturomique

Cette technique consiste en la multiplication de milieux et conditions de culture et l'identification rapide de colonies bactériennes par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) ou par amplification et séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S.

Les premières études ont révélé des découvertes surprenantes : des espèces bactériennes inédites chez l'homme, y compris de nouveaux genres, ont été identifiées. Surtout, la culturomique et la métagénomique bactérienne se sont avérées étonnamment complémentaires, et non redondantes. En effet, la métagénomique excelle à caractériser les flores bactériennes majoritaires, y compris celles qui ne sont pas encore cultivables. En revanche, la culturomique semble plus efficace pour déceler la diversité des flores minoritaires, en particulier lorsque le microbiote est dominé par quelques espèces prépondérantes. Ainsi, loin de se substituer l'une à l'autre, la culturomique et la métagénomique sont des outils complémentaires indispensables pour une compréhension approfondie du microbiote humain (La Scola, 2015).

I.3.4. Métabolomique

L'étude des **métabolites** du microbiote buccal vise à identifier les petites molécules produites ou modifiées par les micro-organismes résidant dans la bouche. L'objectif principal est de dresser un inventaire précis de ces produits biochimiques, car leur analyse fournit des informations cruciales sur l'impact fonctionnel du microbiote sur la santé buccale. Par exemple, la détection d'acides peut indiquer un risque de caries, tandis que l'identification de molécules protectrices suggère un rôle bénéfique pour la prévention des maladies. Comprendre ce que ces micro-organismes "fabriquent" nous permet ainsi de mieux cerner les mécanismes des maladies bucco-dentaires et d'explorer de nouvelles stratégies de diagnostic, de prévention et de traitement (Khelaifia, 2023).

I.3.5. Techniques d'imagerie

a. Microscopie confocale

La microscopie confocale est une technique de pointe qui nous permet d'obtenir des images tridimensionnelles d'une clarté et d'une résolution exceptionnelles. Son objectif principal est



d'observer avec précision la structure spatiale et l'organisation des micro-organismes au sein de la cavité buccale. L'intérêt de cette méthode est considérable, car elle est particulièrement efficace pour visualiser les biofilms, ces communautés complexes de microbes souvent incrustées dans une matrice protectrice, et d'étudier leur relation intime avec les cellules de l'hôte. En nous offrant une perspective détaillée sur l'architecture de ces communautés microbiennes et leurs interactions avec les tissus buccaux, la microscopie confocale est un outil indispensable pour comprendre la dynamique des infections buccales, l'efficacité des traitements, et le rôle de l'organisation spatiale dans la persistance des maladies.

b. FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)

La technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) est une méthode puissante qui emploie des sondes fluorescentes conçues pour se lier spécifiquement à des séquences uniques d'ADN ou d'ARN présentes dans des micro-organismes. Son objectif principal est d'identifier et de localiser précisément certaines espèces microbiennes au sein d'un échantillon complexe. L'intérêt majeur de cette approche réside dans sa capacité à permettre une visualisation directe des microbes sur place, sans qu'il soit nécessaire de les cultiver en laboratoire, ce qui représente un avantage considérable étant donné que de nombreuses espèces microbiennes sont difficiles, voire impossibles, à cultiver. Comme l'ont démontré des travaux tels que ceux de Khelaifia (2023), le FISH offre une perspective in situ précieuse sur la composition et la distribution spatiale des communautés microbiennes, notamment dans des environnements complexes comme le microbiote buccal.

II. Composition du microbiote buccal sain

II.1. Diversité et abondance des micro-organismes

Les données métagénomiques estiment environ 1200 espèces microbiennes réparties en 19 phyla, dont la majorité des espèces cultivées appartiennent principalement aux *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* et *Spirochaete* (Khelaifia, 2023).



Tableau 1 : Composition du microbiote buccal (JF Perrin mise à jour 2006-2017-2022).

Phylum	Caractéristiques	Particularité	Rôles	Exemples
Firmicutes	Bactéries à Gram positif, paroi cellulaire épaisse riche en peptidoglycane cocci ou bacilles	Certaines forment des spores	Fermentation (fromages, yaourts), Présentes dans le microbiote intestinal, certaines sont pathogènes (ex. <i>Clostridium difficile</i>)	<i>Clostridium</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Bacteroidetes	Bactéries à Gram négatif, non sporulantes	Anaérobies stricts	Digestion des fibres et polysaccharides complexes, Production d'acides gras à chaîne courte bénéfiques, Déséquilibre lié à certaines maladies métaboliques	<i>Bacteroides</i> , <i>Prevotella</i>
Actinobacteria	Bactéries à Gram positif, souvent filamenteuses	Morphologie filamenteuse, rappelant celle des champignons, et capacité à produire des hyphes	Producteurs naturels d'antibiotiques, Composants importants du microbiote intestinal (ex. <i>Bifidobacterium</i> chez les nourrissons), Certaines espèces peuvent causer des infections	<i>Streptomyces</i> , <i>Actinomyces</i> , <i>Bifidobacterium</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
Proteobacteria	Bactéries à Gram négatif, très diversifiées	Classes principales : Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon-protéobactéries	Comprend de nombreuses bactéries pathogènes, Certaines sont utiles dans la fixation de l'azote (ex. <i>Rhizobium</i>), Présentes dans l'intestin humain	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Pseudomonas</i>
Fusobacteria	Bactéries à Gram négatif, anaérobies	Leur forme de bâtonnets fins et effilés, souvent appelés fusiformes	Impliquées dans certaines infections buccales (gingivites, abcès), Suspectées dans certaines maladies inflammatoires ou cancers (ex. colorectal)	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>F. mortiferum</i> , <i>F. naviforme</i> , <i>F. necrophorum</i>

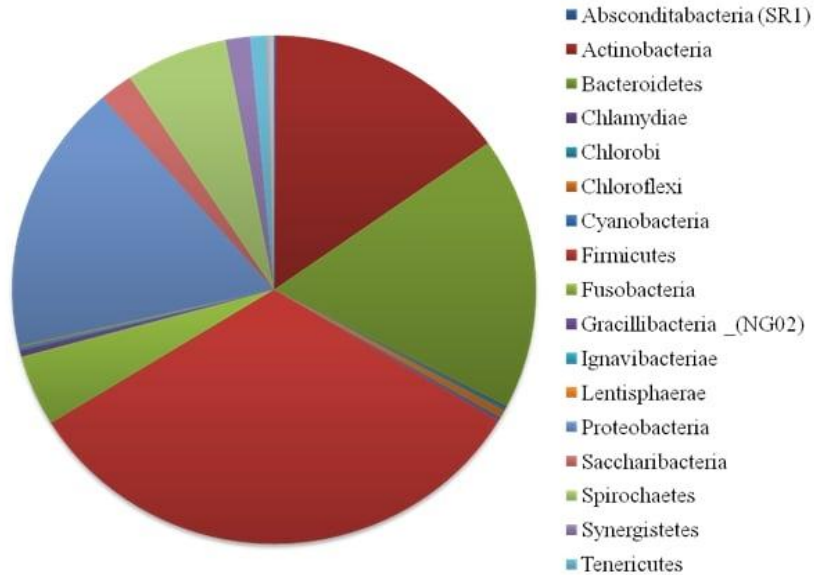


Figure 3 : Distribution quantitative de la diversité bactérienne cultivée et non cultivée composant le microbiote oral, représentée par le nombre d'espèces composant chaque phylum.

(<https://www.homd.org/>).

Les premières bactéries à coloniser la bouche sont des *Streptococcus* anaérobies, issues de la microflore maternelle. Ensuite, d'autres bactéries anaérobies strictes, comme *Veillonella* et des bactéries du phylum *Fusobacteria*, s'installent progressivement. Variation de la composition en fonction des sites intra-oraux (plaque dentaire, salive, muqueuse) (Minty, 2021). Les streptocoques oraux, appartenant aux Firmicutes, sont des cocci Gram positifs présents dans la bouche. Ils jouent un rôle clé dans la formation de la plaque dentaire et se reproduisent de façon asexuée.

La flore buccale est composée de micro-organismes capables de résister aux mécanismes d'élimination et d'adhérer aux surfaces de la bouche comme les dents et les gencives. Elle comprend des bactéries aérobies et anaérobies telles que *Streptococcus*, *Neisseria*, *Actinomyces* et d'autres. Certains *streptocoques*, comme *S. mutans* et *S. salivarius*, s'installent sur les dents, les muqueuses et dans la salive, jouant un rôle dans la formation de la plaque dentaire, des caries, de la gingivite et des maladies parodontales. La salive contient une grande quantité de bactéries, majoritairement des *streptocoques* (AIT ABDERRAHIM, 2022).



De plus, le microbiote buccal inclut des champignons, des archées et des virus, qui maintiennent l'équilibre de la cavité buccale. Les champignons, comme *Candida albicans*, peuvent devenir pathogènes en cas de déséquilibre. Les archées influencent les bactéries et sont associées à des maladies parodontales. Les virus régulent les populations bactériennes, mais certains, comme l'herpès, peuvent provoquer des infections. Un déséquilibre de ces micro-organismes peut entraîner des pathologies buccales (Thomas, 2021).

II.2. Interactions microbiennes

La co-adhésion et la co-agrégation bactériennes reposent sur une reconnaissance spécifique entre cellules, facilitant la survie et le développement du biofilm. Ces mécanismes permettent aux bactéries secondaires de s'associer à d'autres déjà fixées. *F. nucleatum* joue un rôle clé en reliant les streptocoques aux bactéries anaérobies strictes, essentielles à l'équilibre de la flore orale (Nguyen, 2018).

Chaque espèce bactérienne possède ses propres stratégies pour survivre face aux autres dans un espace et une disponibilité en nutriments limités. Les relations entre les microorganismes et l'hôte peuvent être de trois types : mutualistes, commensales et parfois parasitaires. Le maintien de l'équilibre entre ces interactions est crucial pour la santé buccale (Kilian *et al.*, 2016).

Les bactéries capables de se lier aux protéines salivaires de la pellicule exogène, comme certains streptocoques, adhèrent plus facilement aux surfaces dentaires, ce qui en fait les principaux colonisateurs primaires de la plaque dentaire précoce.

Dans la cavité buccale, la variation des apports en nutriments entraîne une compétition entre micro-organismes. Les bactéries capables de s'adapter aux ressources disponibles dans une niche spécifique ou ayant une meilleure affinité pour certains nutriments sont avantagées dans la colonisation du biofilm (Nguyen et Darrène, 2018).

Il existe aussi une communication inter-bactérienne par des signaux chimiques via des molécules diffusibles. Cela correspond au « quorum sensing » qui est considéré comme un mécanisme de régulation du comportement bactérien capable d'activer un régulateur transcriptionnel qui déclenche l'expression de gènes cibles (Nagi *et al.*, 2023). Dans les biofilms



buccaux, le QS coordonne des comportements tels que la croissance, l'absorption du fer et de l'hémine, l'expression des gènes liés au stress et la production de facteurs de virulence. Les molécules de quorum sensing (QSM), comme les auto-inducteurs de type 2 (AI-2), jouent un rôle clé dans cette régulation. Ce système de communication permet aux bactéries de passer d'un état mutualiste à un état pathogène, influençant ainsi la santé buccale (Thomas et Charlotte., 2021).

II.3. Facteurs influant sur la composition du microbiote buccal sain

La composition du microbiote oral peut varier en fonction de plusieurs facteurs tels que l'âge, le régime alimentaire, les habitudes de vie (tabagisme par exemple) sans toutefois conduire obligatoirement à un état pathologique. La Salive mais aussi des commensaux jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie. Ce phénomène fait référence à une notion de « résilience » c'est-à-dire la capacité d'un écosystème à faire face à des perturbations sans passer à un autre état dans lequel les espèces centrales et les fonctions clés sont perdues.

La génétique de l'hôte influence significativement la composition du microbiote buccal, bien que son impact soit partiellement controversé. Des études utilisant le séquençage génomique ont montré que certaines variations génétiques affectent la diversité bactérienne, en particulier via les mécanismes immunitaires. Par exemple, des recherches sur des adolescents et adultes ont démontré que des profils génétiques similaires s'accompagnent de microbiotes buccaux semblables. Une étude métagénomique sur plus de 1 900 personnes a confirmé que la génétique explique au moins 10 % de la composition microbienne orale. De plus, des microARNs de l'hôte peuvent réguler la croissance de bactéries spécifiques, et pourraient servir de biomarqueurs pour prédire des maladies buccales telles que les caries ou la parodontite. Ainsi, la génétique, bien que secondaire à l'environnement, reste un facteur clé de la santé buccale (Bostanghadiri *et al.*, 2024).

L'âge est un facteur clé influençant la composition du microbiote buccal sain. À l'âge adulte, le microbiome buccal atteint une certaine stabilité, pouvant adopter plusieurs états d'équilibre sain modulés par des facteurs génétiques et environnementaux. Avec le vieillissement, des changements progressifs mais significatifs apparaissent, liés à des modifications physiologiques telles que la baisse de la salivation, le port de prothèses et la polymédication. Une étude en Lettonie a montré que la diversité bactérienne de la plaque supragingivale est maximale chez les 20–40 ans, diminue entre 40 et 60 ans, puis augmente après 60 ans, incluant alors des



espèces moins bénéfiques. Des bactéries commensales comme *Neisseria* diminuent après 40 ans, tandis que des pathogènes opportunistes tels que *Streptococcus anginosus* et *Gemella sanguinis* augmentent avec l'âge. De plus, la composition microbienne diffère selon les sites buccaux, notamment entre la plaque supragingivale et la muqueuse, montrant la complexité dynamique du microbiote oral avec l'âge (Kazarina et al., 2023).

Le régime alimentaire influence significativement la composition du microbiote buccal. Une alimentation riche en sucres fermentescibles favorise la prolifération de bactéries acidogènes comme *Streptococcus mutans*, responsables de la formation de caries dentaires. Par ailleurs, le microbiote buccal participe activement à la dégradation des nutriments, notamment des glycoprotéines et des sucres, grâce à des bactéries spécialisées. Une alimentation riche en nitrates, présente dans certains légumes, peut modifier la composition bactérienne salivaire, augmentant les populations de *Rothia* et *Neisseria* tout en réduisant celles de *Prevotella* et *Veillonella*, ce qui peut influencer la régulation de la pression artérielle via la production d'oxyde nitrique. Enfin, les antioxydants et composés anti-inflammatoires des fruits et légumes peuvent moduler la réponse immunitaire buccale, impactant l'équilibre des espèces bactériennes.

De mauvaises pratiques d'hygiène bucco-dentaire, des conditions médicales et des médicaments jouent un rôle central dans la formation de cet écosystème complexe. Une mauvaise hygiène bucco-dentaire, caractérisée par un brossage inadéquat et l'utilisation de la soie dentaire, favorise l'accumulation de plaque dentaire, un biofilm principalement composé de bactéries. Cette accumulation de plaque fournit un environnement propice à la prolifération d'espèces pathogènes, entraînant un déséquilibre du microbiome buccal

Un flux normal de salive assure une Lubrification continue des dents et des muqueuses via la pellicule exogène acquise (PEA) ; les protégeant des traumatismes provoqués par la mastication, la déglutition et la phonation. Cette lubrification limite également la déshydratation des muqueuses induite par la respiration et facilite également l'élocution (Rajasekaran et al., 2024).

Le tabagisme perturbe profondément le microbiote buccal, augmentant le risque de maladies bucco-dentaires. La fumée de cigarette crée un environnement anaérobie, favorisant la prolifération de bactéries pathogènes telles que *Fusobacterium*, *Campylobacter* et *Tannerella forsythia*, associées aux maladies des gencives et à des risques cardiovasculaires accrus. La nicotine



stimule la virulence microbienne en activant les récepteurs nicotiniques, perturbant l'équilibre du microbiote buccal. Malgré ces effets délétères, des études montrent que cinq ans après l'arrêt du tabac, la composition du microbiote buccal des anciens fumeurs se rapproche de celle des non-fumeurs, suggérant une résilience du microbiote. Il est donc essentiel de sensibiliser les patients aux impacts du tabagisme sur la santé bucco-dentaire et de promouvoir des stratégies de sevrage pour restaurer un microbiote buccal sain.

Une consommation excessive d'alcool perturbe l'équilibre du microbiote buccal, favorisant la prolifération de bactéries pathogènes au détriment des bactéries bénéfiques. Cela entraîne une altération de la fonction salivaire, une diminution de la réponse immunitaire locale et une résorption osseuse, affectant ainsi la santé bucco-dentaire. De plus, ces déséquilibres microbiens peuvent avoir des répercussions systémiques, notamment en augmentant le risque de lésions hépatiques. Ainsi, l'alcool impacte négativement la santé buccale et générale (Rajasekaran *et al.*, 2024).

III. Fonctions du microbiote buccal sain

III.1. Barrière de protection

Un microbiote buccal sain est bien plus qu'une simple collection de micro-organismes ; il constitue une ligne de défense essentielle, jouant un rôle actif et multifacette dans le maintien de notre santé orale. Ses fonctions protectrices clés incluent la compétition avec les pathogènes, la production de substances antimicrobiennes, et la stimulation du système immunitaire local.

Le microbiote buccal résident agit comme une véritable barrière de protection contre l'établissement et la prolifération de micro-organismes potentiellement nocifs.

L'une des stratégies fondamentales du microbiote sain est la compétition pour l'espace et les nutriments avec les pathogènes opportunistes ou transitoires. La surface buccale offre un nombre limité de sites d'adhésion et de ressources nutritives. Les bactéries commensales, déjà bien établies, occupent ces niches écologiques et exploitent les ressources disponibles, rendant plus difficile pour les nouveaux arrivants pathogènes de s'implanter et de se multiplier. Ce phénomène est souvent appelé "exclusion compétitive" (Marsh *et al.*, 2011). Par exemple, les espèces de *Streptococcus* du



groupe *sanguinis*, communes dans un biofilm sain, peuvent empêcher l'adhésion de *Streptococcus mutans*, une bactérie clé dans le développement des caries (Lemos et Burne, 2008).

Au-delà de la simple compétition, de nombreuses espèces du microbiote buccal sain sécrètent activement des composés qui inhibent la croissance ou tuent d'autres micro-organismes. Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens produits par certaines bactéries et qui sont actifs contre des espèces bactériennes étroitement apparentées ou d'autres pathogènes (Dridger *et al.*, 2006). Par exemple, certaines souches de *Streptococcus salivarius*, une bactérie commensale de la bouche, produisent des bactériocines appelées salivaricines, capables d'inhiber la croissance de *Streptococcus pyogenes* (responsable d'angines) et de *Streptococcus mutans* (caries) (Burton *et al.*, 2006).

Le microbiote commensal joue également un rôle crucial dans la maturation et la stimulation constante mais modérée du système immunitaire local (système immunitaire muqueux). En interagissant avec les cellules immunitaires présentes dans la muqueuse buccale, telles que les cellules épithéliales, les macrophages et les lymphocytes, le microbiote aide à maintenir un état de vigilance immunologique (Cutler *et al.*, 2011). Cette stimulation permet de "préparer" les défenses de l'hôte à réagir rapidement et efficacement en cas d'invasion par des pathogènes. Des études ont montré que la présence d'un microbiote diversifié et équilibré favorise la production de molécules anti-inflammatoires et le développement d'une tolérance immunitaire aux propres commensaux, tout en renforçant la capacité à monter une réponse protectrice contre les envahisseurs (Hajishengallis et Lamont, 2012).

III.2. Digestion et métabolisme

Le microbiote buccal joue un rôle initial mais significatif dans la digestion et le métabolisme de certains nutriments présents dans la bouche. Cette fonction se manifeste principalement par la dégradation partielle des glucides et des protéines salivaires, ainsi que par la production de divers métabolites.

Les bactéries du microbiote oral sont équipées d'enzymes qui leur permettent de commencer le processus de décomposition des glucides. Par exemple, de nombreuses espèces sont



capables de fermenter les sucres simples et les polysaccharides complexes issus de notre alimentation (Thomas et Charlotte, 2021).

En outre, le microbiote buccal est impliqué dans la dégradation partielle des protéines salivaires. La salive est riche en diverses protéines (mucines, enzymes, protéines antimicrobiennes) qui peuvent servir de source de nutriments pour certaines bactéries. La protéolyse par des enzymes bactériennes libère des peptides et des acides aminés.

Parmi les métabolites produits par ce métabolisme bactérien, en plus des acides organiques, on trouve également des composés soufrés. Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un exemple de ces métabolites, produit en faible quantité par certaines bactéries anaérobies lors de la dégradation des acides aminés soufrés. Bien qu'une production excessive de H₂S soit associée à la mauvaise haleine (halitose), de faibles concentrations peuvent avoir des rôles signalétiques ou même physiologiques (Thomas et Charlotte, 2021).

III.3. Maintien de l'homéostasie buccale

Le microbiote buccal joue un rôle crucial dans le maintien de l'homéostasie buccale, c'est-à-dire l'équilibre dynamique et stable de l'environnement oral, essentiel à une bonne santé. Cette contribution se manifeste notamment par son influence sur le pH buccal et son rôle dans le cycle de l'azote ainsi que d'autres éléments.

Le maintien d'un pH équilibré dans la cavité buccale est fondamental pour prévenir des pathologies comme les caries dentaires et l'érosion de l'émail. Le microbiote buccal intervient activement dans la régulation du pH de plusieurs manières. Les bactéries du microbiote métabolisent les nutriments, en particulier les sucres issus de notre alimentation. Ce processus peut générer des acides (acide lactique, acétique, formique, etc.), qui sont la principale cause de la déminéralisation de l'émail et du développement des caries. Par exemple, des bactéries cariogènes comme *Streptococcus mutans* sont bien connues pour leur capacité à produire de grandes quantités d'acides à partir des glucides. Cependant, d'autres bactéries du microbiote sont capables de métaboliser l'urée présente dans la salive en ammoniac, un composé alcalin qui peut aider à neutraliser l'acidité et à augmenter le pH (Thomas & Charlotte, 2021). Certaines espèces, comme



celles du genre *Veillonella*, peuvent même métaboliser l'acide lactique produit par d'autres bactéries, contribuant ainsi à réduire l'acidité globale du biofilm.

IV. Dysbiose du microbiote buccal et maladies orales

IV.1. Définition de la dysbiose buccale

En général, un équilibre naturel appelé « eubiose » s'établit entre le corps humain et les bactéries qu'il héberge. Ces bactéries vivent en harmonie avec l'organisme. Cet équilibre repose sur deux aspects : d'une part, un contrôle mutuel entre les bactéries et le système immunitaire ; d'autre part, un équilibre entre les différentes espèces bactériennes elles-mêmes.

Cependant, dans certains cas une rupture de l'équilibre du microbiote s'installe appelée dysbiose. La dysbiose correspond à un déséquilibre qui peut se produire entre les bactéries d'une communauté ou entre le microbiote et l'hôte, et qui est préjudiciable à l'hôte. Le déséquilibre peut concerner la quantité et/ou l'influence d'espèces microbiennes individuelles par rapport à leur abondance ou leur influence sur la santé. Le déséquilibre peut également être causé par une réponse immunitaire mal contrôlée ou inadaptée. La persistance de la dysbiose orale peut conduire au développement de pathologies bucco-dentaires et avoir également des répercussions au niveau systémique (Thomas et Charlotte.,2021).

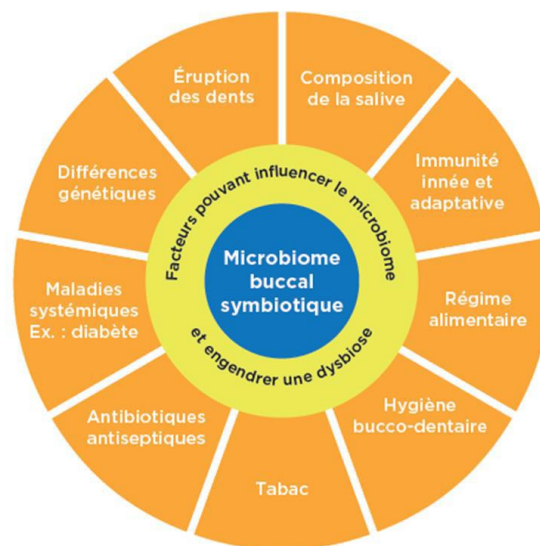


Figure 4 : Origines potentielles de la dysbiose (Kilian *et al.*, 2016).



IV.2. Rôle de la dysbiose dans les principales maladies orales

La dysbiose du microbiote oral est à l'origine de deux pathologies buccales majeures : la carie et la parodontite. Cependant, ces deux pathologies ont des profils différents (Figure).

IV.2.1. Carie dentaire

La carie est un processus complexe lié à un déséquilibre du biofilm dentaire, causé par une alimentation riche en sucres et une mauvaise hygiène buccale. (Thomas et Charlotte., 2021). Ce déséquilibre favorise la production d'acides, abaissant le pH buccal, ce qui perturbe l'équilibre microbien et entraîne la déminéralisation des tissus dentaires.

Lorsque le pH buccal devient plus acide, la composition du biofilm supragingival change au profit de micro-organismes cariogènes tels que *Streptococcus mutans*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, ainsi qu'en quantité accrue *Bifidobacterium spp.*, *Scardovia spp.* et *Candida albicans*. Cette acidification entraîne une diminution de la diversité microbienne et une baisse de l'activité des bactéries bénéfiques, qui préfèrent un environnement neutre. Si le biofilm n'est pas régulièrement éliminé et que la consommation de sucres reste élevée, l'acidification chronique qui en résulte favorise la déminéralisation de l'émail, causant ainsi l'apparition de caries (Thomas et Charlotte., 2021).

IV.2.2. Maladies parodontales (Gingivite et Parodontite)

Les maladies parodontales, telles que la gingivite et la parodontite, touchent environ 19 % de la population mondiale et représentent la deuxième affection bucco-dentaire la plus courante. Ce sont des maladies inflammatoires microbiennes affectant le parodonte (gencive, ligament dentaire, os alvéolaire) (Dubois *et al.*, 2024).

La parodontite est causée par une dysbiose du microbiote sous-gingival, favorisant des bactéries anaérobies comme *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, organisées en complexes microbiens (rouge, orange, etc.) selon Socransky. Ces bactéries produisent des enzymes protéolytiques et des lipopolysaccharides, déclenchant une réponse inflammatoire chronique et destructrice de l'hôte. D'autres espèces comme *Streptococcus oralis*,



S. mutans, *S. intermedius*, *S. mitis*, *Veillonella parvula* et *Pseudomonas fluorescens* sont également impliquées dans cette inflammation gingivale (Dubois *et al.*, 2024).

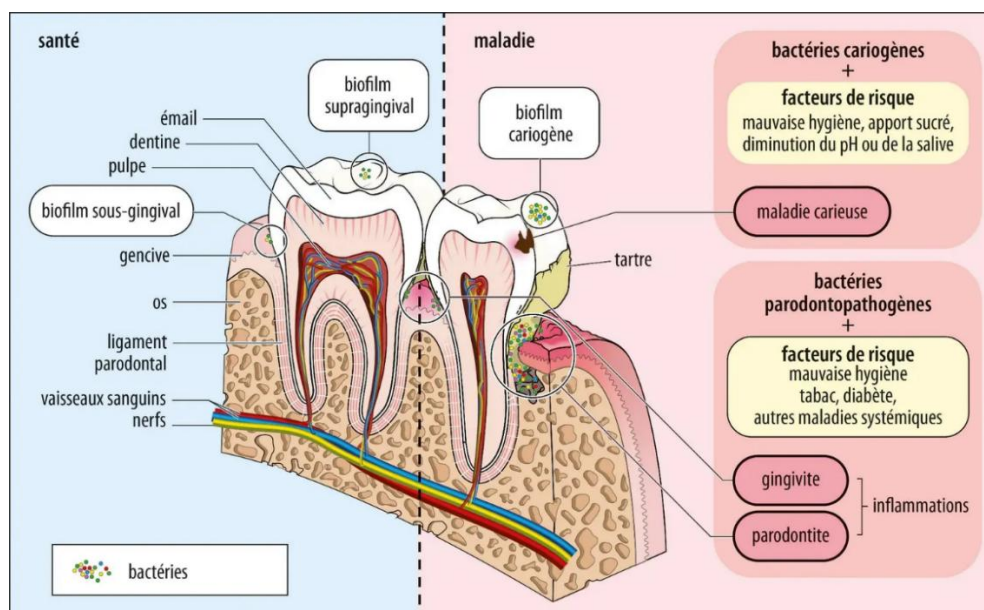


Figure 5 : Les conséquences du dysbiose de microbiote oral (*Encyclopædia Universalis France*).

IV.2.3. Candidose buccale

La présence de *Candida albicans* dans la bouche n'est pas toujours synonyme de maladie, car cette levure peut faire partie de la flore normale de la muqueuse buccale. La colonisation orale dépend de plusieurs facteurs comme l'adhérence, la croissance, la pénétration dans les muqueuses et l'élimination par la salive et l'hygiène buccale. Trois étapes sont distinguées (Laurent *et al.*, 2011) :

- ✓ Saprophytisme : la levure est présente en faible quantité, sans causer de maladie ;
- ✓ Colonisation : sa multiplication est favorisée par des conditions locales anormales ;
- ✓ Infection (candidose oropharyngée) : la levure devient pathogène, adhère, envahit les tissus et provoque des lésions des muqueuses.

La formation de biofilms fongiques par *Candida albicans* est un facteur majeur de la candidose buccale. Ces biofilms, adhérant aux muqueuses ou aux prothèses dentaires, se développent en plusieurs étapes (adhésion, prolifération, maturation, production de matrice, dispersion) et offrent à la levure une protection contre les antifongiques et le système immunitaire. Cette structure



favorise les infections chroniques, notamment chez les porteurs de prothèses, et augmente la virulence de *Candida albicans* par des interactions avec d'autres microbes comme *Streptococcus mutans*.

IV.2.4. Mucosite Péri-implantaire et Péri-implantite

Formation de biofilms sur les surfaces des implants dentaires, similaires à la plaque dentaire, pouvant entraîner une inflammation et une perte osseuse autour de l'implant (Laurent *et al.*, 2011).

Les mucosites sont définies comme une inflammation de la muqueuse péri-implantaire sans alvéolyse osseuse associée. Elles sont caractérisées par la présence d'un saignement au sondage associé à la présence de plaque. On constate également la présence d'un érythème le plus souvent associé à un œdème (Heller *et al.*, 2021).

Une destruction osseuse non linéaire et à une progression rapide en direction apicale en plus des signes cliniques retrouvés dans le diagnostic de la mucosite péri-implantaire, la péri-implantite s'accompagne d'une destruction osseuse supérieure à 3mm à partir du col de l'implant et progressant en direction apicale, associée à une profondeur de poche supérieure à 5 mm avec ou sans récession de la gencive marginale. Les péri-implantites sont des complications biologiques péri-implantaires irréversibles (Heller *et al.*, 2021).



Figure 6 : Représentation d'une mucosite Péri-implantaire.



V. Le microbiote buccal et la santé systémique : L'Axe bucco-organe

V.1. Dissémination bactérienne et inflammation systémique

Trois mécanismes peuvent expliquer que des maladies orales puissent être responsables de pathologies systémiques. Tout d'abord, par suite d'une bactériémie transitoire, des bactéries orales peuvent diffuser par voie sanguine. Ensuite, des toxines de bactéries orales peuvent circuler. Et enfin, les bactéries orales peuvent provoquer une réaction inflammatoire qui va induire une inflammation métastatique.

Les bactériémies peuvent être provoquées suite à des interventions dentaires invasives. Ce risque dépend de la nature de l'intervention. Ainsi, suite à une extraction dentaire, 100% des patients présentent une bactériémie. Des bactériémies peuvent aussi être provoquées par des actes de la vie courante tels que l'hygiène orale quotidienne et en particulier le brossage des dents qui augmente les bactériémies de 15 à 97%.

Dans la majorité des cas, ces micro-organismes, qui sont principalement des bactéries anaérobies, vont être éliminés par le système réticulo-endothélial en quelques minutes et ne provoquer aucun autre symptôme clinique à l'exception d'une éventuelle légère augmentation de la température corporelle (Laurence, 2020).

V.2. Associations avec des maladies systémiques

V.2.1. Maladies cardiovasculaires

La parodontite peut provoquer une inflammation systémique de bas grade, liée à un risque accru de maladies cardiovasculaires (MCV), notamment l'athérosclérose et l'endocardite infectieuse. Les bactéries parodontales peuvent entrer dans la circulation sanguine, atteindre les vaisseaux ou le cœur, et favoriser l'inflammation vasculaire par la libération de médiateurs inflammatoires (comme IL-6, TNF- α , CRP). Plusieurs études récentes confirment la présence de ces bactéries dans les lésions cardiovasculaires et montrent que le traitement de la parodontite améliore la santé cardiovasculaire, soulignant un lien possible entre ces deux pathologies (Shetty *et al.*, 2023).



V.2.2. Diabète

Le diabète sucré est une maladie chronique caractérisée par une hyperglycémie due à un défaut de production ou d'action de l'insuline. Il existe une relation bidirectionnelle entre le diabète et la maladie parodontale (MP) : la parodontite peut aggraver le contrôle de la glycémie en provoquant une inflammation chronique, tandis que le diabète augmente le risque et la gravité des maladies parodontales. Des études montrent que le traitement des parodontites améliore le contrôle glycémique chez les diabétiques de type 2. Cette interaction souligne l'importance de la santé bucco-dentaire pour la gestion globale du diabète et la prévention de ses complications (Laurence, 2020).

V.2.3. L'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive causant une perte irréversible des fonctions cognitives comme la mémoire et le langage. Des études récentes suggèrent un lien avec la santé bucco-dentaire, notamment la parodontite chronique, plus fréquente chez les personnes ayant des lésions cérébrales. Bien que le cerveau soit protégé immunitairement, il peut être affecté par une inflammation systémique causée par la parodontite, activant des cellules gliales et libérant des cytokines pro-inflammatoires qui aggravent la dégénérescence neuronale liée aux plaques amyloïdes et aux protéines Tau. De plus, les patients Alzheimer ont souvent du mal à maintenir une bonne hygiène buccale, ce qui aggrave la parodontite (Laurence, 2020).

V.2.4. Maladies respiratoires

La mauvaise santé bucco-dentaire, notamment la maladie parodontale, augmente le risque de pneumonie par aspiration, surtout chez les personnes âgées ou immunodéprimées. La plaque dentaire sert de réservoir à des bactéries respiratoires qui peuvent être inhalées et provoquer des infections pulmonaires. Des études montrent que ces bactéries présentes dans la bouche et les poumons sont souvent identiques. Par exemple, *Chlamydia pneumoniae*, liée à plusieurs maladies pulmonaires chroniques, peut migrer de la bouche aux poumons puis se diffuser dans l'organisme (Laurence, 2020).

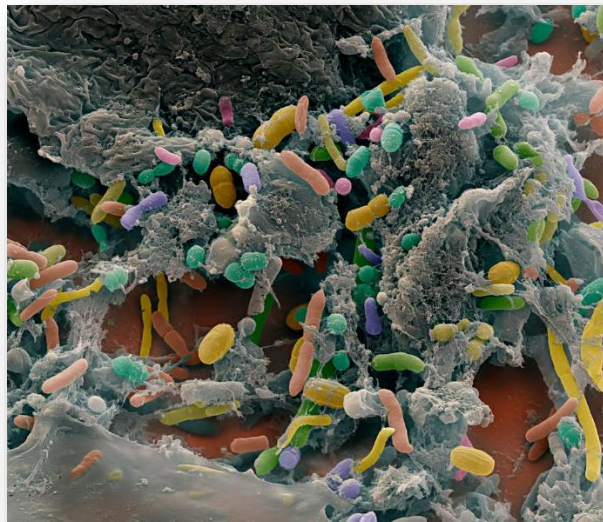


V.2.5. Polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune causant une inflammation chronique des articulations et des lésions des tissus articulaires. Elle entretient une relation bidirectionnelle avec la maladie parodontale (MP).

Les patients avec parodontite ont un risque accru de développer la PR, et ceux atteints de PR ont plus de risques de souffrir de parodontite. Ces deux maladies partagent des mécanismes inflammatoires similaires, où une inflammation excessive cause des dégâts tissulaires. La bactérie *Porphyromonas gingivalis*, présente dans la parodontite, joue un rôle important en modifiant les protéines humaines, ce qui peut déclencher ou aggraver la réponse auto-immune de la PR (Laurence, 2020).

Chapitre 2: Le Biofilm Microbien





Le Biofilm Microbien : Organisation, Fonction et Implications

I. Introduction au biofilm microbien

I.1. Définition et concept fondamental

Un biofilm est un regroupement de microorganismes entourés d'une matrice composée de substances qu'ils sécrètent eux-mêmes (EPS). Ces microorganismes peuvent appartenir à une ou plusieurs espèces, les biofilms multi-espèces étant les plus courants dans la nature. Grâce aux techniques d'imagerie, on sait aujourd'hui que les bactéries dans un biofilm sont organisées de manière structurée et non aléatoire. Elles vivent dans des micro-niches avec un accès facilité à l'oxygène et aux nutriments, rendu possible par un réseau de canaux internes. Ce mode de vie leur permet de mieux s'adapter et survivre dans leur environnement (El Khoury, 2021).

Dans un biofilm, il existe deux types de bactéries : les cellules planctoniques, libres et mobiles, et les cellules sessiles, fixées dans la matrice du biofilm. Ces deux formes interagissent : les sessiles peuvent redevenir mobiles (essaimage) et les planctoniques peuvent rejoindre le biofilm (immigration). Les cellules sessiles sont plus organisées, protégées et résistantes que les planctoniques.

Les bactéries forment des biofilms pour survivre dans différents environnements, comme la nature, les systèmes industriels et les dispositifs médicaux (cathéters, prothèses). Ces biofilms les protègent contre les agents antibactériens, les virus et les cellules qui les attaquent (Bensalah et Ben Abdellah, 2024).

Les biofilms ont été observés pour la première fois en 1684 par Van Leeuwenhoek dans la plaque dentaire. En 1923, Angst a noté leur présence abondante sur les coques de bateaux. Le terme « biofilm » a été introduit en 1978 par Costerton. Des recherches ultérieures ont révélé leur composition complexe, incluant des polysaccharides. Depuis les années 1980, de nombreuses études ont montré leur présence dans divers environnements. On estime aujourd'hui que 99 % des bactéries vivent en biofilm, impliqués dans 80 % des infections humaines selon le NIH (Bensalah et Ben Abdellah, 2024)

Les biofilms dentaires sont des structures tridimensionnelles complexes dans lesquelles les bactéries sont enfermées dans une matrice protectrice appelée EPS, produite par les micro-



organismes. Composée de polysaccharides, protéines, ADN extracellulaire et lipides, cette matrice joue un rôle crucial dans la survie et la virulence des bactéries. Elle agit comme un bouclier, empêchant l'accès des cellules immunitaires et des anticorps, tout en limitant la pénétration des agents antimicrobiens. Elle favorise également l'adhésion et l'accumulation bactérienne ainsi que l'augmentation de la virulence du biofilm. Cette protection rend les biofilms difficiles à éliminer et complique la prévention et le traitement des maladies bucco-dentaires telles que la carie et la parodontite (Costa *et al.*, 2023).

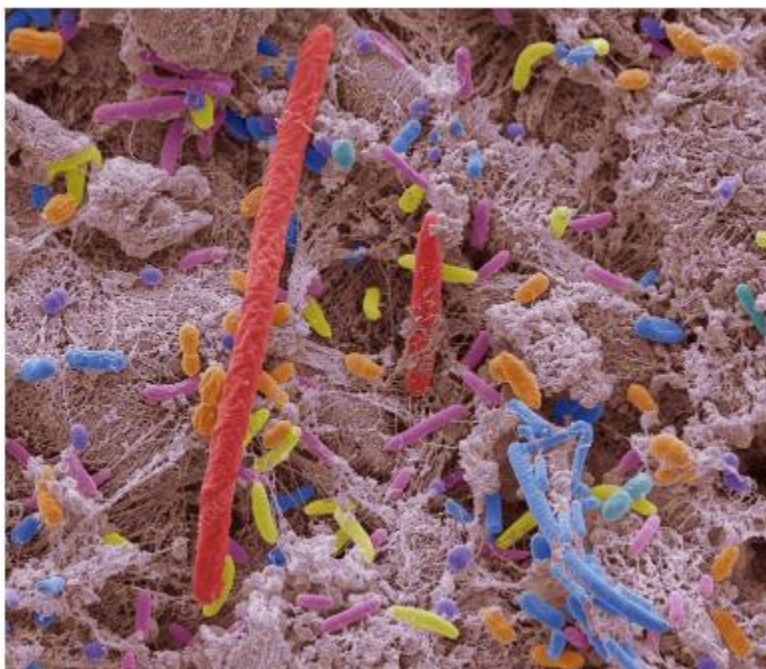


Figure 7 : Microbiote oral vu sous microscopie électronique à balayage après coloration des bactéries (<http://www.gettyimages.com>).

I.2. Avantages de la vie en biofilm pour les micro-organismes

Les biofilms sont des communautés de micro-organismes fixés à une surface et protégés par une matrice d'exopolymères qu'ils produisent. Cette forme de vie rend les bactéries sessiles plus résistantes à divers stress, qu'ils soient chimiques (acides, alcool, détergents), physiques (température, pH, flux), ou environnementaux comme la dessiccation, grâce à la rétention d'eau, et les rayons UV, atténués par la matrice. À l'intérieur du biofilm, les bactéries coopèrent en organisant leurs métabolismes, formant ainsi des structures complexes et hautement adaptées (Bastard, 2015).



Les biofilms présents dans les milieux naturels ou industriels offrent aux bactéries une forte résistance aux bactériophages, amibes, biocides, antibiotiques et désinfectants, souvent 10 à 1000 fois plus que les bactéries libres. Cette résistance est due à plusieurs facteurs : la matrice polymérique qui bloque ou capte les agents antimicrobiens, la faible activité métabolique de certaines cellules (parfois dormantes), et la proximité des bactéries qui facilite le transfert de gènes de résistance. Dans ces communautés, le transfert horizontal de gènes est favorisé et les bactéries échangent leur matériel génétique à des fréquences très élevées. Le biofilm assure un ancrage stable dans des milieux favorables, garantissant un accès régulier aux nutriments et une meilleure protection. À l'intérieur, les bactéries coopèrent et s'organisent en structures complexes et efficaces (Tremblay *et al.*, 2014).

II. La Plaque Dentaire - Un biofilm modèle

II.1. Formation et composition de la plaque dentaire

La plaque dentaire est un biofilm composé de microorganismes variés qui se forment sur les surfaces dentaires et les prothèses, intégrés dans une matrice produite par les bactéries et la salive. Elle apparaît comme un dépôt blanc jaunâtre, adhérent et mou, qui peut se calcifier pour devenir du tartre. Bien qu'elle soit toujours présente chez tout individu, sa quantité varie selon les personnes et les zones de la bouche. Les bactéries de la plaque vivent en communauté organisée et non de façon isolée (Langella, 2017).

II.1.1. Étapes de la formation de la plaque dentaire

a. Formation de la pellicule acquise PEA : Les bactéries ne peuvent pas adhérer directement à l'hydroxyapatite de l'émail dentaire. Elles ont besoin d'un intermédiaire sous la forme de la PEA qui va servir de substrat. Elle forme un revêtement insoluble et très résistant en seulement quelques Minutes (Kientz, 2019).

b. Colonisation primaire : Colonisation initiale par des bactéries pionnières qui vont se fixer à la PEA. Il s'agit majoritairement de streptocoques. La plaque se développe si aucun contrôle de plaque n'est réalisé (Kientz, 2019).

c. Co-agrégation et colonisation secondaire : Les bactéries pionnières vont ensuite servir de récepteurs pour l'agrégation de nouvelles bactéries qui n'étaient pas capables de se fixer



directement à la PAE. C'est la co-agrégation des bactéries colonisatrices secondaires et colonisatrices tardives. Certaines bactéries, comme *Fusobacterium nucleatum*, peuvent servir de pont entre deux espèces qui normalement ne co-agrégent pas. Ainsi, on assiste au développement d'une stratification horizontale et verticale et la succession bactérienne (ou établissement séquentiel des bactéries du biofilm) est augmentée (Langella, 2017).

d. Maturation du biofilm : Lors de la maturation du biofilm, celui-ci croît fortement en taille en raison de la multiplication des bactéries. La matrice extracellulaire s'épaissit et subit des variations de paramètres comme l'oxygène, les nutriments et le pH. Des communications entre bactéries s'installent via le quorum sensing, permettant une coordination selon la densité cellulaire. À ce stade, la plaque dentaire devient une barrière qui limite la pénétration des antimicrobiens et retient les produits du métabolisme bactérien, ce qui réduit l'efficacité des dentifrices (Simain-Sato *et al.*, 2010).

e. Dispersion : La phase finale du développement du biofilm est la dispersion, déclenchée par divers facteurs comme la densité bactérienne élevée, le manque de nutriments, les forces mécaniques ou l'action d'enzymes qui dégradent la matrice du biofilm. Cette dispersion peut se faire par détachement de fragments du biofilm, libération de bactéries libres (planctoniques) ou migration vers d'autres surfaces. Elle permet aux bactéries de coloniser de nouveaux sites, de propager l'infection chez l'hôte ou de se transmettre à d'autres hôtes (Hathroubi, 2016 ; Bedouh, 2023).

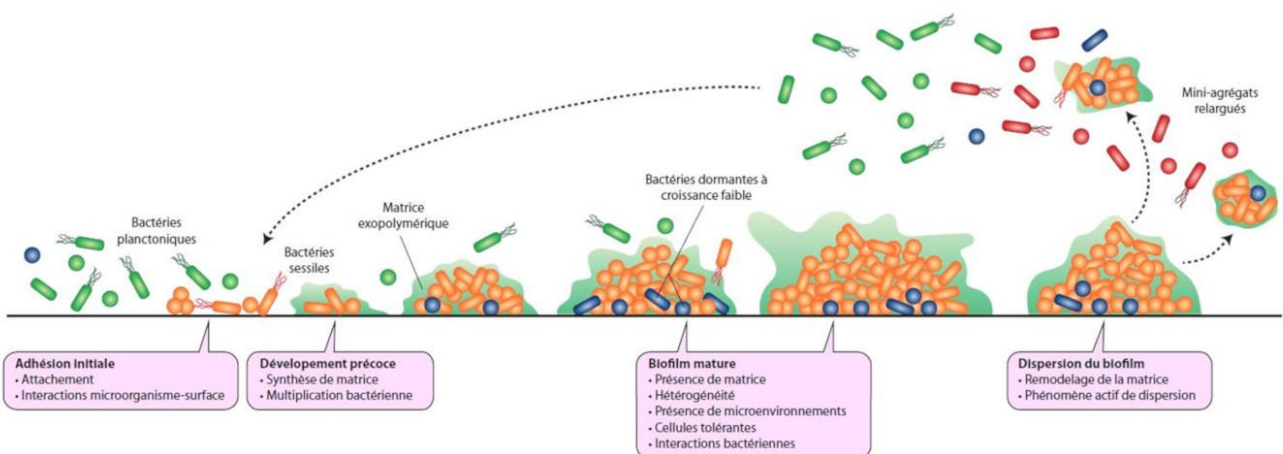


Figure 8 : Étapes de formation du biofilm (Aumeran *et al.*, 2020).



II.1.2. Composition microbienne dynamique

La plaque dentaire est une communauté bactérienne dynamique qui évolue en fonction des conditions environnementales de la cavité buccale.

Immédiatement après le brossage ou la mise à nu d'une surface dentaire propre, les bactéries aérobies (qui ont besoin d'oxygène) colonisent les surfaces. Ces bactéries, comme les streptocoques (ex. : *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*), sont capables d'adhérer aux surfaces grâce à des protéines spécifiques et produisent des substances facilitant l'adhésion d'autres bactéries

À mesure que la plaque s'épaissit, l'oxygène devient limité ou absent à l'intérieur de cette communauté. Cette déplétion en oxygène permet l'installation de bactéries anaérobies (qui ne tolèrent pas l'oxygène), comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Fusobacterium nucleatum*.

Certaines bactéries préfèrent un pH acide, ce qui favorise par exemple les *Lactobacillus* ou *Streptococcus mutans* (associés à la carie). D'autres nécessitent des nutriments spécifiques, comme des protéines ou des peptides provenant de la salive, du régime alimentaire, ou du fluide gingival.

En fin la succession microbienne qui désigne la succession écologique : les premières bactéries modifient l'environnement (pH, oxygène, nutriments), ce qui permet à d'autres espèces de s'installer.

Cela crée un écosystème complexe où les bactéries coexistent, coopèrent ou entrent en compétition (Chalmers *et al.*, 2008).

II.1.3. Différences entre la plaque supra-gingivale et sub-gingivale

a. Biofilm supra-gingival

La plaque supra-gingivale est la première couche de biofilm à se développer. Initialement, elle est composée de bactéries Gram-positives aérobies et anaérobies facultatifs, principalement cariogènes, telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, et *Streptococcus sanguinis*. Au fur et à mesure que ce biofilm se forme sur les surfaces des dents, au-dessus de la gencive, et entre en contact avec la fibromuqueuse gingivale, sa composition bactérienne évolue. Cette maturation favorise la croissance de nouvelles formes et colonies bactériennes capables de déclencher une inflammation gingivale.



b. Biofilm Sub-gingival

Le biofilm sous-gingival se développe dans les zones sans oxygène comme le sillon gingivo-dentaire et les poches parodontales, favorisant des bactéries anaérobies. Des études ont permis de classer ces bactéries en complexes (Figure 9) (Socransky *et al.*, 2008). Chez les personnes en bonne santé, les bactéries dominantes appartiennent aux complexes bleu (*Actinomyces*), jaune (*Streptococcus*) et violet (*Veillonella*), avec très peu de bactéries pathogènes des complexes orange et rouge. En revanche, chez les patients atteints de parodontite, les bactéries du complexe orange sont prédominantes. La composition du biofilm varie aussi selon la surface dentaire qu'il colonise (Houvion, 2014).

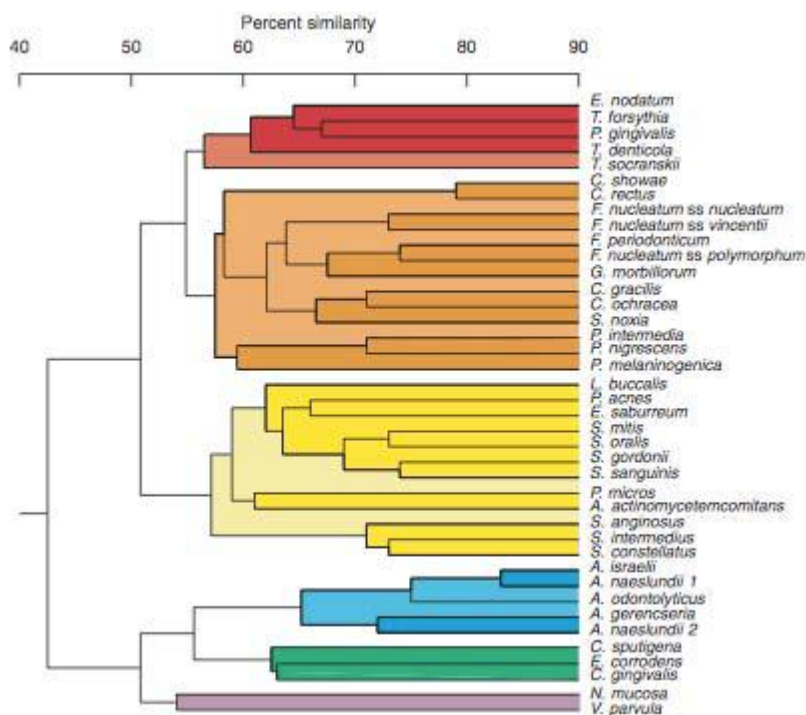


Figure 9 : Les complexes bactériens (Socransky *et al.*, 2004).

II.2. Facteurs influençant la formation et la structure du biofilm

Les caractéristiques des surfaces influencent fortement l'adhésion bactérienne. Les surfaces rugueuses sont plus facilement colonisées en raison de leur structure favorable, mais certaines bactéries peuvent aussi adhérer aux surfaces lisses. Les surfaces hydrophobes attirent davantage les bactéries hydrophobes. De plus, la présence d'un film protéique sur un matériau facilite l'attachement bactérien et encourage la formation de biofilms (Bedouh, 2023)



La formation et la dispersion des biofilms dépendent de structures et d'enzymes spécifiques activées par divers facteurs environnementaux. Ces facteurs incluent la température, le pH (idéalement neutre), la concentration en oxygène et en fer, l'osmolarité, la présence d'ions particuliers et les sources de carbone disponibles (Bedouh, 2023).

La dynamique du biofilm repose sur la communication entre bactéries via des molécules signal. Ce processus, appelé « quorum sensing », permet aux bactéries d'évaluer leur densité locale et de déclencher une réponse collective, comme la production de substances spécifiques dans le milieu extracellulaire (Abdi, 2016).

III. La Matrice extracellulaire (EPS)

III.1. Composition de l'EPS

La matrice extracellulaire d'un biofilm n'est pas seulement une colle, mais un réseau complexe qui maintient la structure du biofilm, organise les cellules, et leur assure une protection durable. Elle agit comme une barrière contre les menaces (antibiotiques, UV, bactériophages...), tout en facilitant l'accès aux nutriments grâce à ses propriétés de sorption. Elle régule aussi l'humidité, la porosité et la densité du biofilm.

Sa composition, variable selon les micro-organismes et l'environnement, inclut des polysaccharides, qui forment la base visqueuse et assurent la cohésion du biofilm ; des protéines, qui jouent un rôle structural et enzymatique ; des glycoprotéines, impliquées dans l'adhésion et la communication cellulaire ; des glycolipides, qui renforcent la stabilité et les interactions avec les surfaces ; et de l'ADN extracellulaire, qui consolide la structure du biofilm et permet parfois le transfert de gènes. Tous ces éléments sont essentiels à la stabilité et à la résistance du biofilm (Youssef, 2022).

III.2. Rôles et fonctions de l'EPS

L'adhésion, la cohésion, la stabilité mécanique et la protection sont parmi les rôles les plus essentiels des substances polymériques extracellulaires (EPS) dans les biofilms.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle central des EPS dans ces fonctions collectives. En particulier, les EPS facilitent l'adhérence des cellules aux surfaces solides et renforcent les liaisons entre cellules bactériennes, favorisant ainsi la formation de microcolonies structurées.



L'EPS joue aussi un rôle important dans la reconnaissance entre espèces, en favorisant l'agrégation bactérienne nécessaire à la formation de biofilms. Ces interactions peuvent dépendre de capteurs mécaniques ou de liaisons spécifiques entre des adhésines (protéines) et leurs récepteurs (souvent des sucres). Globalement, la matrice d'EPS sert de base à l'assemblage du biofilm en créant une structure polymérique initiale à l'endroit de l'adhésion, facilitant ainsi la colonisation et l'organisation du biofilm (Karygianni *et al.*, 2020).

Les EPS jouent un rôle clé s la résistance du biofilm aux agents antimicrobiens et la défense de l'hôte. Les biofilms protègent les bactéries contre les stress tels que la dessiccation, les agents oxydants et les réponses immunitaires de l'hôte (Singh *et al.*, 2021).

Les EPS peuvent servir de source de nutriments, notamment de carbone et d'azote, lorsque ces éléments viennent à manquer dans l'environnement. Certains de leurs composants, bien que difficiles à dégrader à cause de leur complexité, restent utilisables par les micro-organismes. De plus, la matrice extracellulaire des EPS retient l'eau, ce qui aide à protéger les micro-organismes contre la déshydratation, agissant ainsi comme une réserve d'eau (Monmeyran, 2019).

IV. Physiologie et métabolisme au sein du biofilm

IV.1. Hétérogénéité métabolique

Dans un biofilm, les micro-organismes sont soumis à des gradients de nutriments et d'oxygène, ce qui crée une hétérogénéité métabolique. Les cellules en surface restent actives, tandis que celles en profondeur deviennent dormantes ou anaérobies. Cette diversité améliore la résistance du biofilm aux agressions, notamment aux antibiotiques (Stewart et Franklin, 2008).

Cela entraîne une différenciation phénotypique, c'est-à-dire que les cellules développent des caractéristiques différentes en fonction de leur position : Cellules proches de la surface : accès à l'oxygène et aux nutriments → métabolisme aérobie cellules en profondeur : manque d'oxygène → métabolisme anaérobie ou fermentatif cela conduit à la formation de zones aérobie et anaérobies dans une même population.

IV.2. Communication intercellulaire : Le Quorum Sensing (QS)

Le Quorum Sensing (QS) est un mécanisme de communication entre bactéries qui leur permet de coordonner l'expression de certains gènes en fonction de leur densité cellulaire. Ce



processus repose sur la production, la libération, l'accumulation et la détection de petites molécules appelées auto-inducteurs. Lorsque ces molécules atteignent une concentration seuil, elles déclenchent des réponses collectives au sein de la population bactérienne.

Le QS est impliqué dans divers comportements bactériens tels que la production de facteurs de virulence, la résistance aux antibiotiques, la luminescence ou encore la synthèse d'exopolysaccharides nécessaires à la formation de biofilms. Ce système permet donc aux bactéries d'activer des fonctions coûteuses en énergie seulement lorsqu'elles sont assez nombreuses, optimisant ainsi leur efficacité. Il joue également un rôle crucial dans la coopération bactérienne pour l'accès aux ressources, la colonisation de niches spécifiques et la défense contre d'autres micro-organismes concurrents, renforçant ainsi leur survie dans des environnements hostiles (Hayek, 2018).

Un système de Quorum Sensing (QS) repose sur deux éléments : une enzyme synthase qui produit une molécule signal, et un récepteur protéique activé par cette molécule. À faible densité cellulaire, le signal se diffuse dans le milieu, mais à forte densité, il atteint une concentration seuil permettant sa détection. Le complexe formé avec le récepteur agit comme un facteur de transcription, régulant certains gènes et déclenchant des phénotypes spécifiques. Ce mécanisme permet aux bactéries de coordonner leurs comportements collectifs (Hayek, 2018).

IV.3. Échange de matériel génétique au sein du biofilm

Dans un biofilm, la proximité des bactéries et la présence d'une matrice favorisent les échanges génétiques par transformation, transduction et conjugaison. Cela facilite la propagation de la résistance aux antibiotiques et des facteurs de virulence.

1. Transformation : une bactérie capte de l'ADN libre venant de son environnement.
2. Transduction : un virus (bactériophage) transfère de l'ADN d'une bactérie à une autre.
3. Conjugaison : une bactérie transfère directement de l'ADN à une autre par contact (via un pilus).

Les principaux facteurs de virulence des bactéries sont (Perez, 2015) :



1. Les lipopolysaccharides (LPS) : Endotoxines des bactéries Gram négatif (*Pseudomonas* ou *Fusobacterium*). Ils sont cytotoxiques, déclenchent l'inflammation, agissent comme antigènes, induisent une résorption osseuse et stimulent la libération d'IL-1.
2. Les peptidoglycanes : Composants des parois bactériennes Gram positif et négatif.
3. L'acide lipotéichoïque : Propre aux bactéries Gram positif. Il active le complément, déclenche des réponses inflammatoires via les cytokines, les neutrophiles et les macrophages.
4. Les fimbriae : Filaments plus longs que les flagelles, non mobiles. Ils facilitent l'attachement des bactéries aux surfaces et aux autres bactéries.
5. La capsule : Structure de polysaccharides qui protège contre la dessiccation et les substances toxiques, augmente la résistance à la destruction.
6. Les vésicules extracellulaires : Produites par les bactéries Gram négatif. Contiennent des protéines et des lipides favorisant l'adhésion, avec des effets protéolytiques et hémolytiques.
7. Les exotoxines : Substances solubles et diffusibles produites par les bactéries Gram positif et négatif. Elles sont cytotoxiques et favorisent la lyse cellulaire ou agissent à distance.

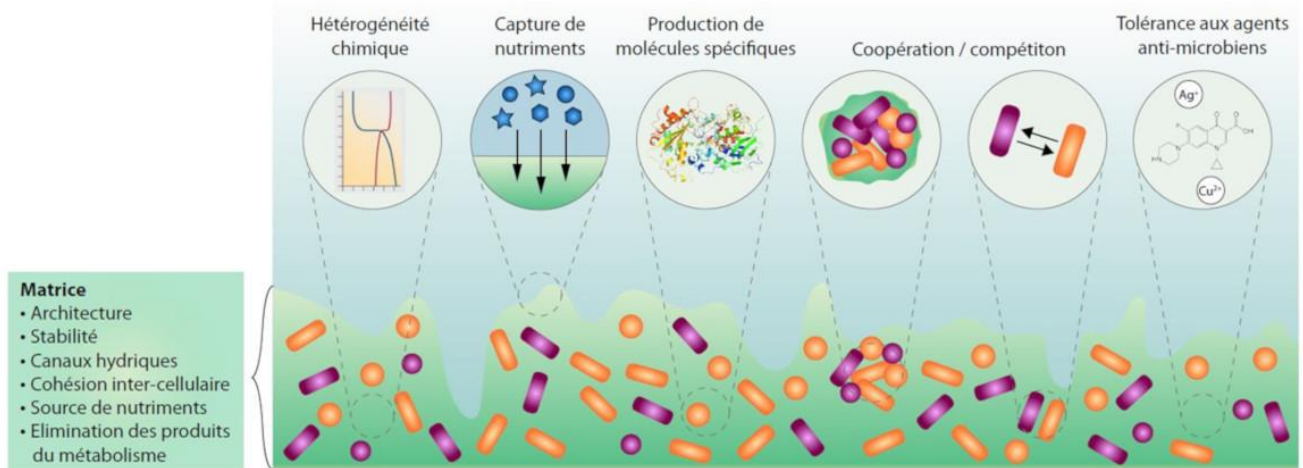


Figure 10 : Le biofilm bactérien est une structure hétérogène (Aumeran *et al.*, 2020).



IV.4. Caractéristiques du biofilm plaque dentaire qui exacerbent la pathogénicité

- ✓ **Résistance aux antimicrobiens** : La matrice de l'EPS et la physiologie altérée des bactéries au sein du biofilm confèrent une résistance accrue aux agents antibactériens (antibiotiques, antiseptiques).
- ✓ **Évasion du système immunitaire de l'hôte** : La structure du biofilm protège les bactéries des cellules immunitaires et des anticorps.
- ✓ **Tolérance aux stress** : Les bactéries en biofilm sont plus résistantes aux variations de pH, à la dessiccation et aux autres stress environnementaux présents dans la cavité buccale.
- ✓ **Synergie bactérienne** : Les interactions métaboliques et la communication intercellulaire (quorum sensing) au sein du biofilm peuvent augmenter la virulence collective de la communauté microbienne.

V. Prévention et contrôle du biofilm plaque dentaire

V.1. Hygiène buccale mécanique

Un nettoyage régulier et délicat de la bouche peut permettre de supprimer la plaque dentaire et les restes alimentaires qui contiennent des bactéries responsables de la mauvaise haleine, des caries dentaires et des maladies parodontales. Cette pratique aide à préserver la santé des dents sur le long terme. La bonne hygiène buccale comprend généralement le brossage doux des dents, l'usage des bains de bouche, le nettoyage quotidien des prothèses et l'application adéquate des produits fluorés (Belhachemi *et al.*, 2023).

Le brossage de la langue complète l'hygiène bucco-dentaire en maintenant une langue propre et en améliorant le confort oral. La surface dorsale de la langue abrite un microbiote protecteur grâce à ses papilles, mais si les mécanismes naturels d'autonettoyage (salive, frottements, desquamation) sont insuffisants, un enduit bactérien peut s'accumuler. Cela favorise la mauvaise haleine, le goût altéré et les désagréments buccaux. Un nettoyage régulier avec un grattoir ou une brosse permet de rétablir l'équilibre microbien sans le détruire, réduisant ainsi la charge bactérienne et prévenant certaines maladies buccales (Matsui *et al.*, 2014).



V.2. Hygiène buccale chimique

L'utilisation de dentifrices fluorés prévient les caries dentaires en renforçant l'émail grâce à la reminéralisation, le rendant plus résistant aux attaques acides, et en inhibant la croissance des bactéries responsables des caries, réduisant ainsi la production d'acides. Un brossage régulier avec ce type de dentifrice protège efficacement les dents et maintient une bonne santé bucco-dentaire (Benmesbah et al., 2022).

Les rinçages buccaux antiseptiques (chlorhexidine, huiles essentielles, CPC) complètent le brossage et le fil dentaire en réduisant la charge bactérienne buccale. Recommandés par des professionnels, notamment avant des soins comme la pose d'implants, ils préviennent les infections et favorisent la cicatrisation. Cependant, leur usage prolongé nécessite un encadrement, car ils peuvent déséquilibrer le microbiote oral (Yaghmoor et al., 2024).

V.3. Nettoyage professionnel : Approches ciblant spécifiquement le biofilm

Le nettoyage professionnel des dents par un dentiste ou un hygiéniste permet d'éliminer le tartre, une plaque dentaire minéralisée qui ne peut être enlevée par le brossage seul. Ce tartre favorise les caries et maladies des gencives. Le détartrage utilise des outils spéciaux pour retirer mécaniquement ce tartre, souvent indolore, suivi d'un polissage pour retarder sa réapparition. C'est une procédure préventive essentielle recommandée tous les 6 à 12 mois pour maintenir une bonne santé bucco-dentaire (Sabrae, 2023).

V.4. Approches Diététiques

Les sucres fermentescibles (comme le saccharose, le glucose, le fructose et les glucides à chaîne courte) sont aisément métabolisés par les bactéries cariogènes présentes dans la bouche, notamment *Streptococcus mutans*. En fermentant ces sucres, ces bactéries produisent des acides qui abaissent le pH buccal, entraînant la déminéralisation de l'émail dentaire et favorisant ainsi le développement des caries (Sheiham et James, 2015). Pour contrer ce phénomène, il est recommandé de réduire la fréquence de consommation de ces sucres, surtout entre les repas, une stratégie efficace pour limiter la prolifération des bactéries nocives et prévenir les maladies bucco-dentaires (Moynihan et Kelly, 2014). Dans ce même objectif, l'utilisation de probiotiques (micro-organismes vivants, souvent des lactobacilles ou bifidobactéries, qui confèrent un bénéfice pour la santé lorsqu'administrés en quantités adéquates) et de prébiotiques (substrats non digestibles

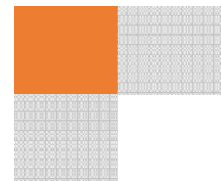


comme les fibres, qui stimulent sélectivement la croissance ou l'activité de bactéries bénéfiques) est envisagée pour moduler le microbiote oral, favoriser les bactéries protectrices et réduire les pathogènes comme *Streptococcus mutans* (Devine et Marsh, 2009). Bien que la recherche soit toujours en cours, des études préliminaires suggèrent que certains probiotiques pourraient non seulement réduire l'halitose et l'inflammation gingivale, mais aussi potentiellement prévenir les caries et la parodontite (Gruner *et al.*, 2016).

V.5. Thérapies Ciblées : Développement de stratégies pour perturber les biofilms pathogènes

La plaque dentaire est un biofilm protégé par une matrice complexe qui rend les bactéries résistantes aux traitements. La recherche vise à perturber cette matrice ou à bloquer la communication bactérienne (quorum sensing) pour empêcher la formation et la maturation du biofilm. Les enzymes dégradant la matrice, comme les protéases et DNases, sont des agents non biocides prometteurs qui désorganisent le biofilm sans nuire à l'équilibre microbien naturel. Cette stratégie innovante aide à contrôler la plaque dentaire et prévenir les caries tout en évitant la résistance bactérienne (Del Rey *et al.*, 2024).

Partie II. Etude Expérimentale



Chapitre 3: Matériel et Méthodes





1. Lieu et cadre d'étude

La présente étude a été réalisée dans le laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis – Mostaganem. Ce laboratoire offre un environnement scientifique adéquat pour la manipulation, l'analyse et l'identification des micro-organismes selon des protocoles microbiologiques rigoureux.

L'étude s'est déroulée sur une période de trois mois, du 1^{er} mars au 31 mai, et a porté sur l'isolement et l'identification des bactéries présentes dans la cavité buccale.

Le travail expérimental a consisté à effectuer un prélèvement buccal, suivi d'un ensemencement sur milieux de culture appropriés, d'une incubation, puis de l'isolement des colonies bactériennes. Ces dernières ont été ensuite soumises à différentes techniques d'identification morphologique, biochimique et microscopique, afin de déterminer les espèces bactériennes présentes dans l'échantillon.

2. Objectifs de l'étude

Notre étude s'articule autour des objectifs suivants :

- ✓ Réaliser des prélèvements à partir de la cavité buccale.
- ✓ Isoler et identifier les espèces bactériennes présentes dans la cavité buccale, dans le but de mieux comprendre la diversité microbienne buccale et son impact potentiel sur la santé humaine.
- ✓ Etudier la sensibilité des isolats vis-à-vis les antibiotiques.
- ✓ Evaluer la capacité des isolats à former le biofilm microbien.

3. Matériels utilisés

Les différents instruments, appareils, réactifs et milieux de culture liquides utilisés sont détaillés dans l'annexe 01.



4. Echantillonnage, site et techniques de prélèvement

Les échantillons microbiens ont été prélevés au niveau de la Clinique Dentaire Dr. Betedj Ouahib et au niveau de la polyclinique Multifonctionnelle Abed Belkhodja, situées à Mostaganem. Le choix de ce site s'explique par l'environnement clinique propice à l'obtention d'échantillons buccaux frais et représentatifs, en collaboration avec un praticien spécialisé dans le domaine de la santé bucco-dentaire.

Le prélèvement a été effectué dans la cavité buccale à l'aide d'un écouvillon stérile, en frottant délicatement les muqueuses buccales (langue, joue interne, ou gencive selon le cas) afin de récolter la flore bactérienne naturellement présente. L'écouvillon a ensuite été immédiatement introduit dans un tube contenant un milieu de transport stérile (comme l'eau peptonée tamponnée ou un milieu spécifique de transport bactérien), puis acheminé sans délai au laboratoire de microbiologie pour traitement.

Un total de 16 échantillons a été prélevé, selon les règles d'asepsie et dans le respect des normes éthiques, en présence des patients et avec le consentement verbal des participants (hommes et femmes), âgés de 14 à 42 ans (Tableau 2).



Figure 11 : Lieux de prélèvement des échantillons.

**Tableau 2** : La répartition des prélèvements selon leur origine, le sexe et l'âge des patients.

N° du Prélèvement	La date	Sexe	Age (ans)	Site de prélèvement	Lieu de prélèvement
E1	13/04/2025	Homme	42	Gencive	La Clinique Dentaire Dr. Betedj Ouahib, située à Mostaganem.
E2	13/04/2025	Femme	23	Gencive	
E3	13/04/2025	Femme	14	Les dents	
E4	13/04/2025	Femme	14	Gencive	
E5	13/04/2025	Femme	14	Carrée dentaire	
E6	13/04/2025	Femme	25	Muqueuse gingivales	
E7	13/04/2025	Femme	37	Sous la langue	
E8	13/04/2025	Femme	22	Carrée dentaire	
E9	13/04/2025	Homme	35	Muqueuse gingivale	
E10	13/04/2025	Femme	58	Muqueuse gingivale	
E11	13/04/2025	Femme	44	Les dents	
E12	13/04/2025	Homme	40	La langue	
E13	13/04/2025	Homme	30	Les dents	
E14	13/04/2025	Femme	37	Muqueuse gingivale	
E15	13/04/2025	Femme	24	Gencive	
E16	13/04/2025	Femme	24	La langue	

E : échantillon

5. Enrichissement et isolement

Après le prélèvement des échantillons, les écouvillons ont été immergés dans des tubes contenant du bouillon nutritif, un milieu de culture couramment utilisé pour la croissance des bactéries peu exigeantes. Les tubes ont ensuite été transportés au laboratoire dans un délai maximal de deux heures, puis incubés dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures, jusqu'à l'apparition d'une turbidité témoignant de la croissance bactérienne.

L'isolement des micro-organismes est une technique microbiologique qui consiste à répartir une quantité déterminée de ceux-ci sur la surface d'un milieu gélosé contenu dans une boîte



de Pétri. Cette méthode permet d'obtenir des colonies bien distinctes, facilitant ainsi l'identification de chaque souche bactérienne.



Figure 12 : Isolement sur différents milieux de culture après l'enrichissement.

Dans le but d'isoler les bactéries présentes sur les surfaces étudiées, plusieurs milieux de culture solides ont étéensemencés à partir des milieux d'enrichissement ayant présenté une croissance visible. L'ensemencement a été effectué selon la méthode des stries transversales sur gélose nutritive, et selon la méthode des quadrants sur les milieux Chapman et Hektoen. Les boîtes de Pétri ainsi préparées ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures.



Tableau 3 : Les différents milieux de culture utilisés pour l'isolement des germes (Camille D., 2007 ; Prescott *et al.*, 2003).

Milieux de culture		Principales caractéristiques	Bactéries
Sélectifs	Chapman	Milieu hypersalé avec la présence de chlorure de sodium et le rouge de phénol.	<i>Staphylococcus</i>
	BEA	La bile et l'azide de sodium comme inhibiteurs. Présence d'esculine.	<i>Enterococcus</i> et certains streptocoques
	MacConkey	Permet de différencier lactose + / lactose – Colonies roses (fermentent le lactose), incolores (ne fermentent pas)	Bacilles Gram-Entérobactéries
	Gélose au sang	Milieu enrichi, non sélectif. Permet de détecter l'hémolyse (alpha, bêta, gamma)	Streptocoques oraux

6. Isolement de *Candida albicans*

L'isolement de *Candida albicans* a été réalisé à partir d'échantillons ensemencés sur un milieu sélectif, principalement la gélose Sabouraud additionnée de chloramphénicol, afin d'inhiber la croissance bactérienne.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées à une température comprise entre 30 °C et 37 °C pendant 24 à 48 heures. Des colonies de levures, de couleur crème, lisses et légèrement bombées, ont été observées. Pour confirmer l'identification de *Candida albicans*, des tests complémentaires ont été effectués, tels que le test du filament germinatif ou encore des analyses biochimiques spécifiques.

7. Purification

L'aspect des colonies ayant poussés sur le milieu de culture est examinée, dans le cas où la culture est polymicrobienne, on procède à la purification des colonies bactériennes.

8. Identification des isolats

L'identification bactérienne a été réalisée en suivant les critères décrits dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity *et al.*, 2005). Cette approche repose sur une série



d'analyses incluant l'examen macroscopique et microscopique des colonies, des tests biochimiques classiques (tels que ceux réalisés à l'aide de galeries d'identification), ainsi qu'un test complémentaire d'antibiogramme permettant d'évaluer la sensibilité des souches aux antibiotiques.

8.1. Examen macroscopique

L'identification des micro-organismes débute par l'observation des colonies formées sur les milieux d'isolement. Cette étape initiale joue un rôle essentiel, car elle permet de fournir des indications précieuses pour la suite du processus d'identification (Bousseboua, 2003).

La description des colonies repose sur plusieurs critères, tels que, la taille (allant de colonies très petites (ponctiformes) à des colonies envahissantes), la forme (circulaire, irrégulière, en filaments ou en forme de racines (rhizoïde)), le relief (bombé, convexe ou plat), le contour (régulier, ondulé, bouclé, lobé ou filamenteux), la texture de surface (lisse ou rugueuse), la couleur (pouvant varier entre le rose, le jaune, le vert, le jaunâtre, le blanchâtre et le blanc) et la transparence (colonies opaques ou translucides).

8.2. Examen microscopique

8.2.1. Coloration au bleu de méthylène

La coloration au bleu de méthylène est une technique simple utilisée en microbiologie pour colorer les bactéries, les levures et d'autres structures cellulaires, permettant leur observation au microscope.

Après avoir réalisé le frottis bactérien par étalement et fixation, placez la lame sur un support de coloration et inondez-la de bleu de méthylène pendant 1 à 3 minutes. Lavez ensuite délicatement la lame à l'eau distillée, égouttez l'excès d'eau, puis épongez-la (sans frotter) avec du papier absorbant et laissez-la sécher complètement à l'air libre. Enfin, examinez la lame à l'objectif à immersion x100 avec une goutte d'huile et un éclairage important (diaphragme ouvert).



8.2.2. Coloration de Gram

L'examen microscopique après coloration de Gram est une méthode essentielle en microbiologie pour identifier et classer les bactéries selon la structure de leur paroi cellulaire (Tortora *et al.*, 2019). Elle permet de scinder les bactéries en deux grands groupes : bactéries gram-positives : elles possèdent une paroi épaisse riche en peptidoglycane (elles retiennent le cristal violet et apparaissent en violet ou bleu) et les bactéries gram-négatives : elles ont une paroi plus mince et une membrane externe (le cristal violet est éliminé, et elles sont colorées par la safranine ou fuchsine de contre-coloration, apparaissant en rose ou rouge).

La coloration de Gram consiste en une légère fixation thermique du frottis et l'ajout de quatre composants séquentiels : le cristal violet (la coloration primaire, 1 minute), l'iode (le mordant ou fixateur, 1 minute), l'alcool (le décolorant, le rinçage est rapide), et la safranine (le contre-colorant, 30 secondes). Les délais indiqués ne sont pas exacts et varient selon l'organisme ; un rinçage à l'eau entre chaque étape est important (Connie et Donald, 2019). Le frottis une fois séché, est observé au microscope optique, objectif x100 à l'immersion.

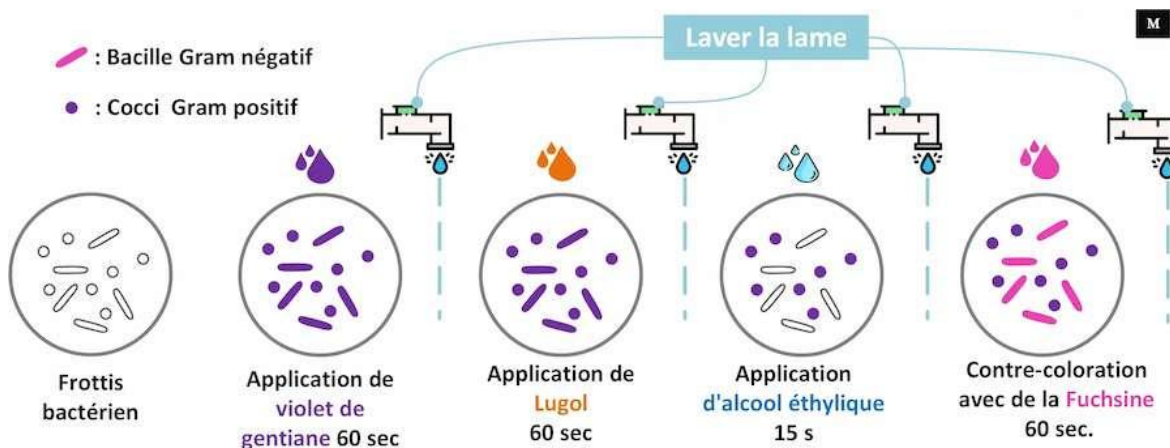


Figure 13 : Les étapes de la coloration de Gram (<https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>)



8.3. Identification des isolats

8.3.1. Test d'orientation

8.3.1.1. Test de la catalase

A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une colonie bactérienne et la déposer sur une lame. Ajouter une goutte de H₂O₂ (3%), et observer l'effervescence immédiate (formation de bulles d'air). Ce test permet de détecter la présence de l'enzyme catalase, qui décompose le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

8.3.1.2. Test de l'oxydase

Le test de l'oxydase est basé sur une éventuelle production d'une enzyme oxydase intracellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C (Vezina, et Lacroix, 2000).

Utiliser un disque de l'oxydase, sur lequel on dépose une colonie. Le développement d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat possède l'enzyme oxydase.

8.3.1.3. Test de la coagulase

La coagulase libre est une enzyme clé pour distinguer les espèces au sein du genre *Staphylococcus*. Seul *Staphylococcus aureus* produit cette enzyme, qui joue un rôle significatif dans sa pathogénicité. D'autres espèces, telles que *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*, sont dites "coagulase-négatives" (Couderc et al., 2014).

Pour détecter la coagulase libre, on ensemence des colonies suspectes de *Staphylococcus aureus* dans un tube de bouillon cœur-cerveau (BHIB), puis on incube à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, un volume du bouillon ensemencé est transféré aseptiquement dans un tube stérile avec un volume égal de plasma. Ce mélange est ensuite incubé à 37 °C pendant 16 à 24 heures. La formation d'un coagulum (caillot) indique un résultat positif, confirmant la présence de *Staphylococcus aureus*.



8.3.1.4. Test d'hémolyse

Selon Lamouri A, 2020, le test d'hémolyse sur gélose au sang frais est un critère de sélection très important en milieu clinique (Figure). Il est utilisé pour différencier les souches de *Streptococcus* et d'*Enterococcus* et la recherche de l'activité hémolytique. Après une incubation de 24 h à 37°C, on trouve trois types d'hémolyse (Gillespie et Hawkey, 2006) :

a. Hémolyse α : en cas d'hémolyse partielle.

b. Hémolyse β : en cas d'hémolyse complète.

c. Hémolyse γ : qui se caractérise par l'absence d'hémolyse, qui distingue deux souches soit *Enterococcus faecalis* de group D ou bien *Enterococcus faecium*.



Figure 14 : Différents types d'hémolyse (α , β et γ) sur gélose au sang frais (Lamouri, 2020).

8.3.1.5. Test de blastèse ou de formation de filaments de germination (bourgeonnement) chez *Candida albicans*

Le test de blastèse, aussi appelé test du tube germinatif, est une méthode courante pour identifier *Candida albicans*. Il repose sur la capacité de cette levure à former des tubes germinatifs (des prolongements filamenteux) lorsqu'elle est cultivée dans du sérum humain.

Pour réaliser ce test, un petit prélèvement d'une colonie de *Candida* est mis en suspension dans 0,3 à 0,5 ml de sérum humain normal, dans un tube à hémolyse. Le tube est ensuite incubé à 42 °C pendant 3 heures. Après l'incubation, une goutte du mélange est déposée sur une lame de



verre, recouverte d'une lamelle, et examinée au microscope optique pour y déceler la présence de tubes germinatifs (Williams et Lewis, 2000 ; Saigal *et al.*, 2011).

8.3.2. Les tests biochimiques classiques

L'identification biochimique par la galerie classique est une méthode utilisée en microbiologie pour identifier les bactéries en se basant sur leurs caractéristiques métaboliques. Cette technique consiste à utiliser une série de tests biochimiques organisés dans une « galerie » (batterie de tests), qui permettent de déterminer les activités enzymatiques et les capacités métaboliques d'une souche bactérienne (Murray *et al.*, 2022).

La galerie classique est constituée de plusieurs milieux de culture contenant des substrats spécifiques (Tableau 4). Lorsqu'une bactérie est inoculée dans ces milieux, elle peut produire des enzymes qui réagissent avec les substrats, entraînant une modification visible (changement de couleur, production de gaz, précipité, etc.). Chaque test correspond à une activité enzymatique ou à une voie métabolique (Murray *et al.*, 2022).

Les résultats sont ensuite comparés à des profils connus pour identifier l'espèce bactérienne (Tortora *et al.*, 2019).

Tableau 4 : Tests d'identification biochimique.

Tests	Milieu	Technique d'ensemencement	Caractère recherché	Résultats attendus
Test de mobilité	Mannitol mobilité	Ensemencement par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur, chargé de culture en milieu solide. Incubation à 37°C pendant 24h.	-Fermentation du mannitol. - Mobilité de la bactérie.	Rouge : pas de fermentation de mannitol (-). - Jaune : fermentation de mannitol (+) . Mobilité : - Pas de diffusion : bactérie immobile. - Diffusion : bactérie mobile .



Test de Citrate	Citrate de Simmons	Ensemencement par des stries longitudinales de la pente à l'aide d'une pipette pasteur stérile à partir de la culture solide. Mettre à l'étuve 24h à 37°C	Utilisation du citrate comme source unique de carbone.	-Virage de l'indicateur de pH au bleu : citrate (+) . -Pas de virage de couleur milieu reste Vert: citrate (-)
Test TSI	Le milieu TSI (Triple Sugar Iron)	A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensemercer abondamment la surface de la pente par des stries serrées puis le culot par simple piqûre. Incuber à l'étuve 24h à 37°C.	Fermentation des sucres	Pente jaune : lactose/ saccharose (+) . - Pente rouge : lactose et saccharose (-). - Culot jaune : glucose (+) . - L'apparition des bulles dans le culot : Gaz+ - Noircissement du milieu: H₂S+
Recherche de la nitrate réductase	Bouillon nitraté	Ensemencement du milieu avec une suspension bactérienne et incubation à 37°C/24h.	Production de nitrate réductase.	Nitrate réductase+ : virage au rouge du milieu après l'ajout des deux réactifs NR1 et NR2 Le milieu jaune : on ajoute la poudre de zinc. NR- : virage au rouge. NR+ : le milieu reste jaune.
Test de	Clark et Lubs	Ensemencement du milieu par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne, puis incuber à 37°C/24h.	Déterminer les voies fermentaires.	VP+ : virage au rouge cerise après l'ajout des réactifs VP1 et VP2. RM+ : coloration rouge après l'ajout de réactifs RM.
ONPG	Ortho-nitrophényl-β-galactoside)	Préparer une suspension bactérienne dans une solution tampon. Ajouter une pastille ou une solution d'ONPG. Incuber à 35–37°C pendant 1 à 24 heures.	Détecter l'activité de la β-galactosidase, une enzyme qui hydrolyse le lactose.	Résultat positif : apparition d'une couleur jaune (production d'orthonitrophénol). Résultat négatif : absence de coloration jaune.

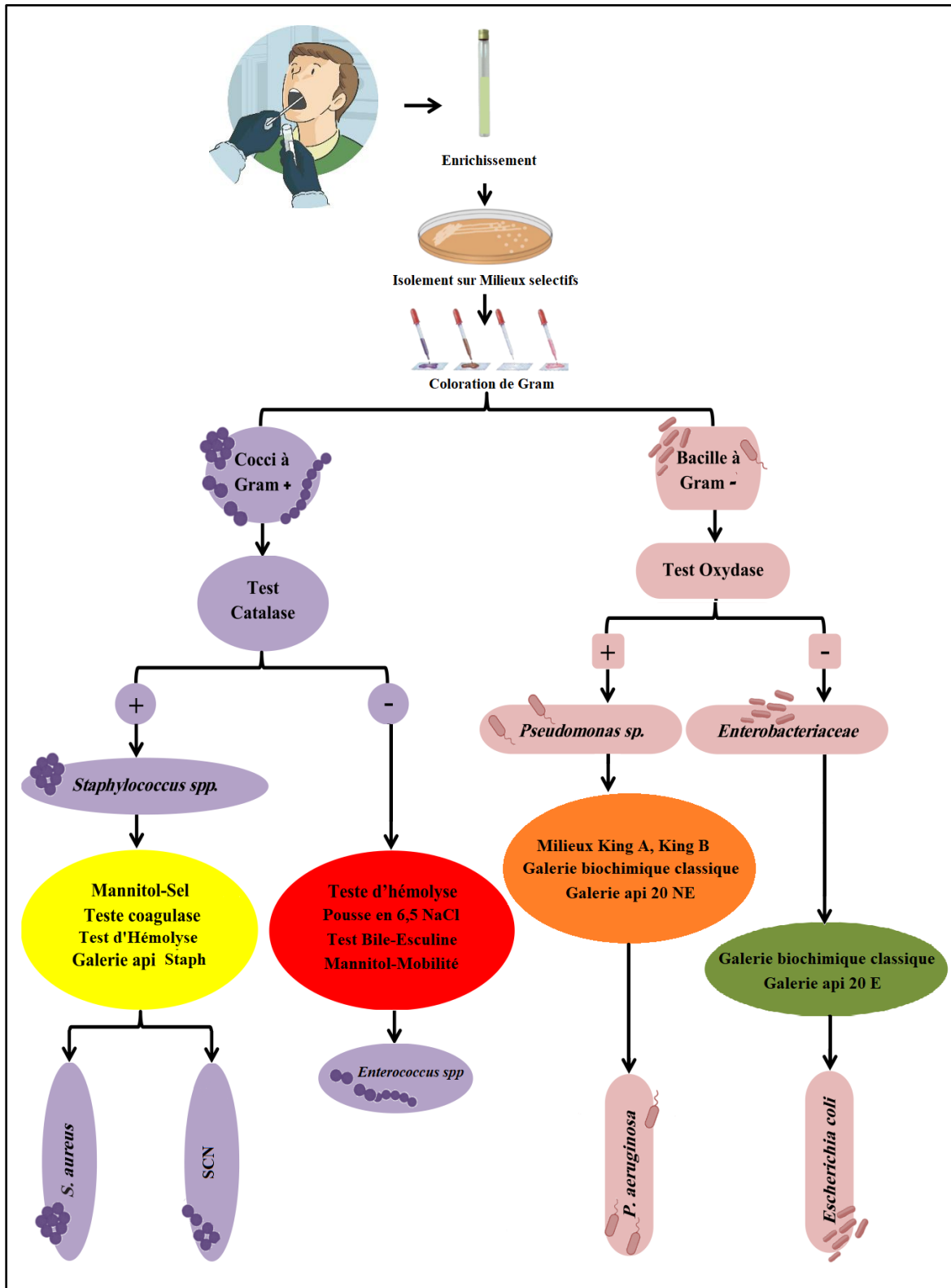


Figure 15 : Schématisation du protocole d'identification des CGP et BGN (Bouabsa, 2021).



9. Réalisation de l'antibiogramme (CASFM, 2024 PIA, 2020)

Nous avons évalué la sensibilité aux antibiotiques en utilisant la méthode de diffusion des disques sur milieu Mueller-Hinton, conformément aux directives du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Cette technique implique de déposer des disques, chacun imprégné d'une concentration spécifique d'antibiotique, à la surface d'une gélose. Dès leur application, l'antibiotique se diffuse uniformément dans le milieu. Après incubation, des zones d'inhibition circulaires se forment autour des disques, indiquant l'absence de croissance bactérienne (Soude S., 2005).

9.1. Le milieu de culture

Le milieu de culture universellement reconnu et recommandé pour la réalisation de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en disque est la gélose Mueller-Hinton. Après avoir fait fondre la gélose Mueller-Hinton au bain-marie, nous l'avons versée dans des boîtes de Petri en veillant à obtenir une épaisseur uniforme d'environ 4 mm.

9.2. Préparation de l'inoculum

À partir d'une culture pure et jeune (24 heures) d'une souche bactérienne, quelques colonies bien isolées et morphologiquement identiques sont prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile. Ces colonies sont ensuite transférées dans un tube à essai contenant 5 mL d'eau physiologique stérile, puis homogénéisées manuellement pour obtenir une suspension bactérienne uniforme. Ensuite l'inoculum est ajusté à une DO de 0,08 à 0,1 à l'aide d'un spectrophotomètre.

9.1. Ensemencement

L'ensemencement se fait en nappe à l'aide d'un râteau stérile (ou d'une pipette Pasteur courbée), en répartissant la suspension de manière homogène sur toute la surface. On laisse ensuite sécher quelques minutes à température ambiante.



9.3. Dépôt des disques d'antibiotiques

Des disques imprégnés d'antibiotiques (Tableau 5) à concentrations connues sont déposés à l'aide d'une pince stérile préalablement flambée. Chaque disque est pressé légèrement pour assurer un bon contact avec la surface de la gélose, sans glissement. Les disques doivent être espacés entre eux, et à une distance du bord de la boîte.

9.4. Incubation et lecture interprétative

Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C. Après l'incubation, des effets sur la croissance et la survie des souches bactériennes sont observés. En général, si l'antibiotique est inefficace, les bactéries continuent à se développer normalement. En revanche, si l'antibiotique est efficace, il apparaît autour du disque une zone claire appelée zone d'inhibition, indiquant l'absence de croissance bactérienne.

L'interprétation de l'antibiogramme réalisé par diffusion sur gélose repose sur la mesure du diamètre de ces zones d'inhibition à l'aide d'une règle. Ces diamètres sont ensuite comparés aux valeurs de référence contenues dans des abaques standards ou aux normes de la CASFM, 2024.

Tableau 5 : Liste des antibiotiques utilisés (CASFM, 2024).

Famille bactérienne	Famille d'antibiotique	Antibiotique utilisé	Abréviation
<i>Enterobacteriaceae</i>	Bêta-lactamines	Ampicilline	AMP
	Fluoroquinolones	Acide nalidixique	NA
	Aminosides	Gentamicine	CN
	Autres	Nitroxoline	NTX
<i>Staphylococcaceae</i>	Bêta-lactamines	Pénicilline G	P
	Bêta-lactamines	Amoxicilline	AMX
	Rifamycines	Rifampicine	RFP
	Macrolides, lincosamides et streptogramines	Erythromycine	E
		Clindamycine	CD
<i>Streptococcaceae</i>	Bêta-lactamines	Amoxicilline	AMX
	Aminosides	Streptomycine	S
	Macrolides, lincosamides et streptogramines	Erythromycine	E



10. Détection de la production de biofilm chez les souches isolées

La détection de la production de biofilms bactérien repose sur différentes approches expérimentales. Dans cette étude, deux méthodes qualitatives ont été employées :

Le test du tube à essai, décrit par Christensen et al. (1985), repose sur la capacité des bactéries à adhérer aux parois d'un tube en verre après incubation. La coloration au cristal violet permet ensuite de visualiser la formation d'un film, indiquant une production de biofilm.

La méthode à la gélose au Rouge Congo (Congo Red Agar, CRA), telle que rapportée par Freeman et al. (1989), consiste à cultiver les souches sur une gélose enrichie en saccharose et en rouge Congo. La production de biofilm est révélée par un changement de la couleur des colonies : les souches positives apparaissent noirâtres et sèches, tandis que les négatives restent rouges ou rosées et brillantes.

Ces deux méthodes permettent une évaluation simple et efficace de la capacité des souches bactériennes à former des biofilms.

10.1. Méthode des tubes à essai en verre

Nous avons évalué la capacité des souches à former des biofilms en utilisant une méthode qualitative inspirée de Christensen et al. (1985).

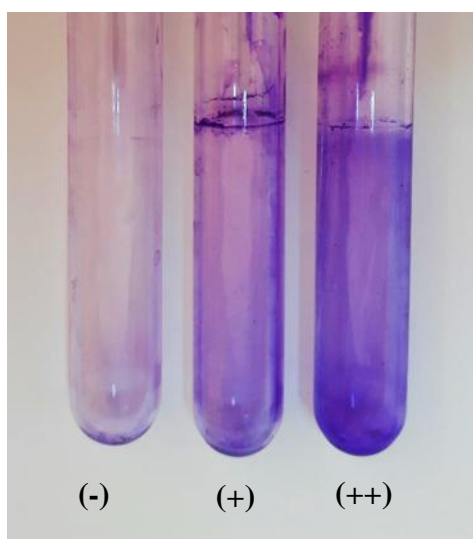
Chaque souche a été mise en culture dans des tubes en verre contenant 4 ml de bouillon trypticase soja (TSB) enrichi de 1 % de glucose, puis incubée à 37 °C pendant 24 heures.

Après l'incubation, les cultures ont été délicatement décantées. Les tubes ont ensuite été lavés avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) à pH 7,3, puis colorés avec 0,1 % de cristal violet. Les tubes ont été à nouveau incubés à 37 °C pendant 15 minutes, rincés à l'eau distillée et séchés en position inversée. Les biofilms, s'ils étaient présents à l'interface air-liquide, sont apparus colorés en pourpre.



La formation de biofilm était considérée comme positive si un film visible adhérait à la paroi et au fond du tube. L'observation des tubes nous a permis de classer la formation de biofilms en trois catégories : absente (-), modérée (+), ou forte (++) (Ouchar *et al.*, 2013).

Pour garantir la fiabilité des résultats, toutes les souches ont été testées en triplicata.



(-) : absence ; (+) : modérée ; (++) : forte.

Figure 16 : Production de biofilms par la méthode de tube à essai en verre (Bouabsa, 2021).

10.2. Méthode Gélose Rouge Congo (RCA)

La méthode décrite par Freeman *et al.* (1989) a été utilisée pour évaluer la formation de biofilms, en cultivant les souches sur un milieu Gélose Rouge Congo, suivi d'une incubation de 24 heures à 37 °C en conditions aérobies. Ce milieu est composé de 37 g/L de bouillon cœur-cerveille (BHIB), 50 g/L de saccharose, 10 g/L de gélose et 0,8 g/L de rouge Congo. Le colorant rouge Congo a été préparé sous forme de solution aqueuse concentrée, stérilisée par autoclavage.

Pour déterminer précisément toutes les variations de couleur des colonies, une échelle de référence en cinq couleurs a été employée. Les isolats présentant deux nuances de noir ont été catégorisés comme producteurs de biofilms, tandis que les colonies rouges, roses et bordeaux ont été classées comme négatives (non-productrices de biofilm) (Oliveira *et Cunha*, 2010).

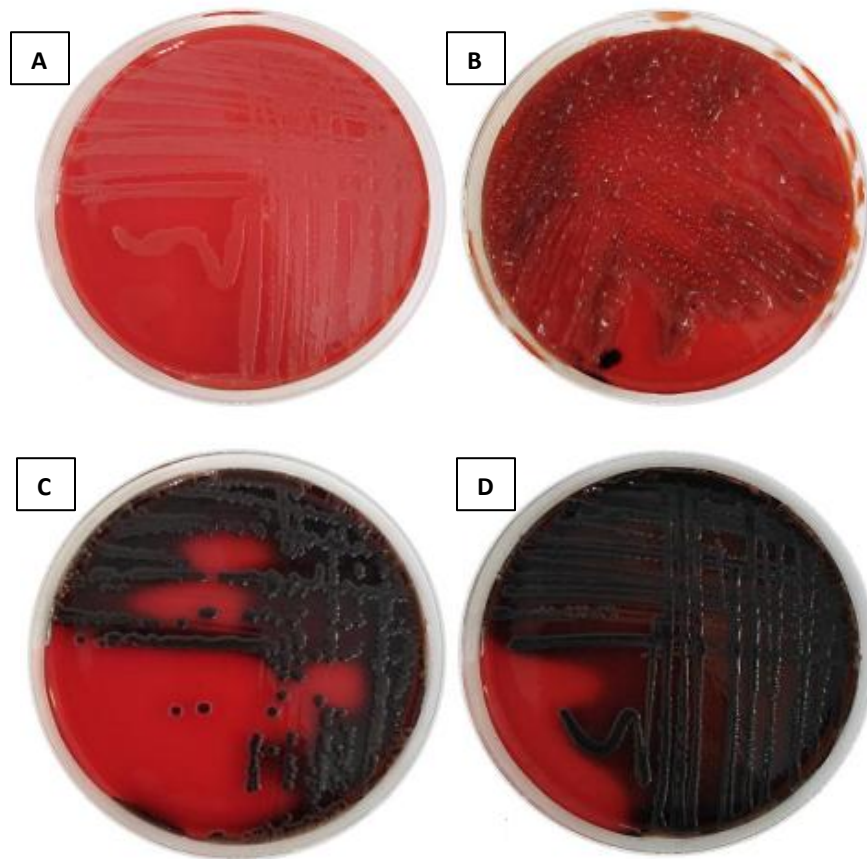
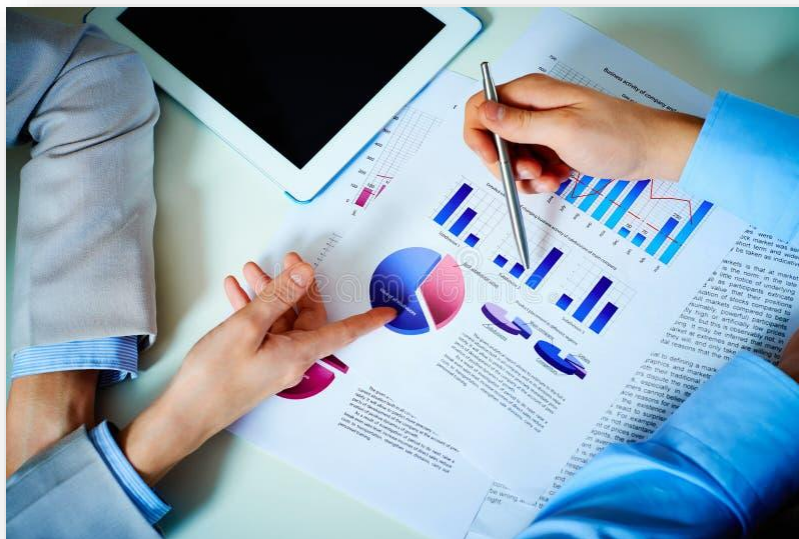


Figure 17 : Détection de la production de slim et formation de biofilm sur RCA. **A et B** : Absence de production ; **C et D** : Forte production de biofilm (**Lamouri, 2020**).

Chapitre 4: Résultats et Discussion





Résultats et discussions

I. Isolement et identification des isolats

Après une incubation de 24 heures à 37 °C (48 heures pour le milieu Sabouraud+ Chloramphénicol), une turbidité a été observée dans les tubes d'enrichissement, indiquant une croissance bactérienne. Ces résultats sont cohérents avec le fait que la cavité buccale humaine abrite une flore commensale constituée de divers micro-organismes, notamment des bactéries, des levures et des champignons. Ces tubes ont fait l'objet d'un isolement sur différents milieux sélectifs.

I.1. Identification macroscopique

L'observation macroscopique des colonies bactériennes a été réalisée après incubation sur différents milieux, permettant une première orientation dans l'identification des espèces isolées.

Sur la gélose MacConkey : les colonies ont apparu avec des caractéristiques distinctes selon leur capacité à fermenter le lactose. Les bactéries lactose-positives, telles que *Escherichia coli*, forment des colonies de couleur rose à rouge. En revanche, les bactéries lactose-négatives, comme *Salmonella* ou *Shigella*, produisent des colonies incolores à beige.

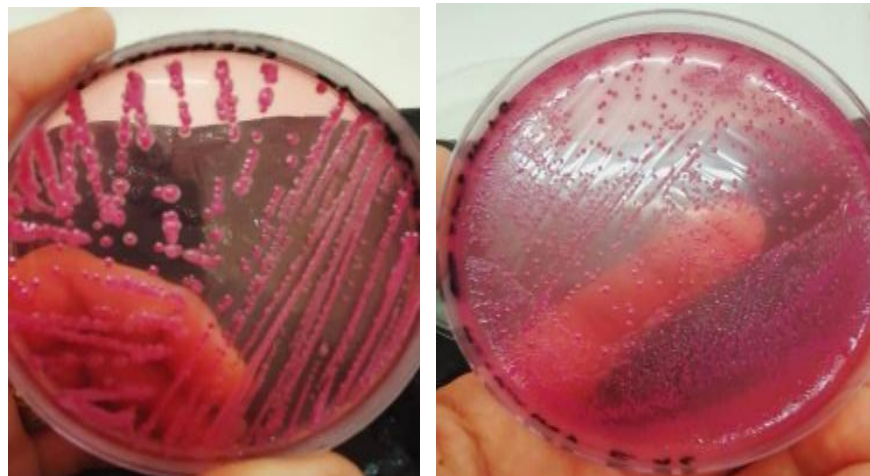


Figure 18 : Aspect des colonies sur le milieu MacConkey.



Sur la gélose BEA (Bile Esculine Azide) : les entérocoques, s'ils sont présents, donnent des colonies grisâtres accompagnées d'un noircissement du milieu, résultat de l'hydrolyse de l'esculine.

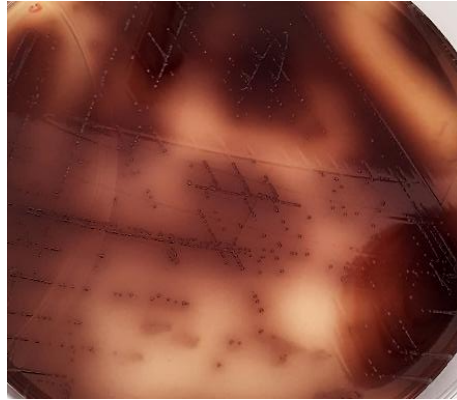


Figure 19 : Aspect des colonies sur milieu BEA.

Sur la gélose au Sang : les colonies bactériennes se présentent sous diverses formes et couleurs selon les espèces. Les streptocoques bêta-hémolytiques, par exemple, montrent des colonies avec une hémolyse complète (zone claire autour des colonies), tandis que d'autres bactéries peuvent provoquer une hémolyse partielle (alpha) ou être non hémolytiques (gamma).



Figure 20 : Aspect des colonies sur la gélose au sang.



Sur la gélose Chapman (milieu salé au mannitol) : *Staphylococcus aureus* forme des colonies jaunes dorées accompagnées d'un changement de couleur du milieu vers le jaune (fermentation du mannitol). *Staphylococcus epidermidis*, en revanche, forme des colonies blanches ou grisâtres sans altération de la couleur du milieu.

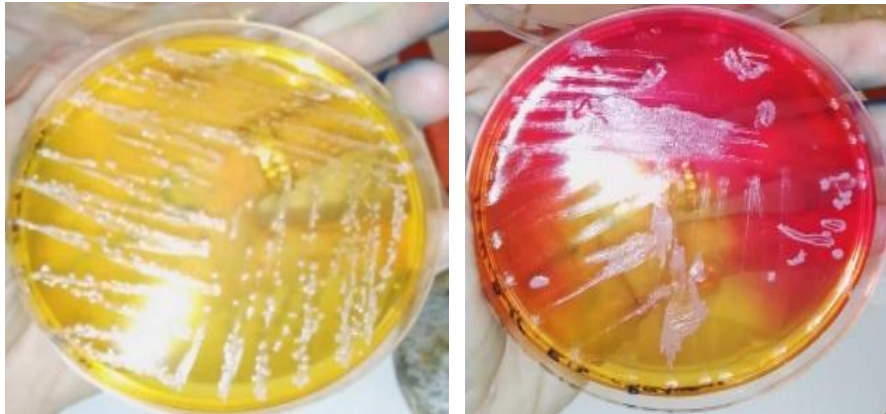


Figure 21 : Aspect des colonies sur gélose Chapman.

Sur gélose Sabouraud+Chloramphénicol : *Candida albicans* forme des colonies blanches à crème, lisses et d'apparence levurienne. Ces colonies apparaissent généralement après 48 à 72 heures d'incubation à 37°C.



Figure 22 : Aspect des colonies sur gélose Sabouraud+Chloramphénicol.

Le tableau 6 regroupe les résultats des isollements effectués sur différents milieux sélectifs, après les 24-48 heures d'incubation à 37°C (Aspect macroscopique).

Un total de 28 souches sont isolées dont 7 (25%) sur gélose Chapman, 8 (28.57%) sur gélose BEA, 3 (10.71%) sur gélose MacConkey, 7 (25%) sur gélose au sang et 3 (10.71%) sur gélose Sabouraud +Chloramphénicol (Tableau).



Tableau 6 : Résultats de l'identification macroscopique des isolats.

Milieu de Culture	Identification phénotypique				Prélèvement
	Couleur	Forme et taille	Opacité et consistance	Contour et relief	
MacConkey	Rose-rouge	Petites a moyennes	Opaques	Lisses et régulières	E10, E14, E16
BEA	Incolore+ halo noir	Rondes plates	Translucides	Lisses et irrégulières	E1, E2, E4, E5, E7, E8, E14, E15
Chapman	Jaune doré	Rondes petites	Brillantes	Lisses et régulières	E1, E2, E3, E4, E10, E12, E15
	Blanches	Rondes	Opaques	Lisses et régulières	E3
Gélose au sang	Blanchâtres	Rondes petites	Opaques	Lisses régulières	E1, E3, E4, E5, E7, E10, E12
Sabouraud+ Chloramphénicol	Blanches et crémeuses	Rondes bombées	Opaques	Lisses et régulières	E2, E5, E15

I.2. Identification microscopique des isolats

L'examen microscopique des prélèvements retenus met en évidence une diversité morphologique au sein de la flore microbienne. La coloration de Gram révèle la présence simultanée de plusieurs types de bactéries : des coques regroupés chainettes ou en amas évoquant une disposition en grappe, typique des Staphylocoques. Par ailleurs, les bacilles colorés en rose, caractéristiques des bactéries à Gram négatif, appartiennent au groupe des Entérobactéries.

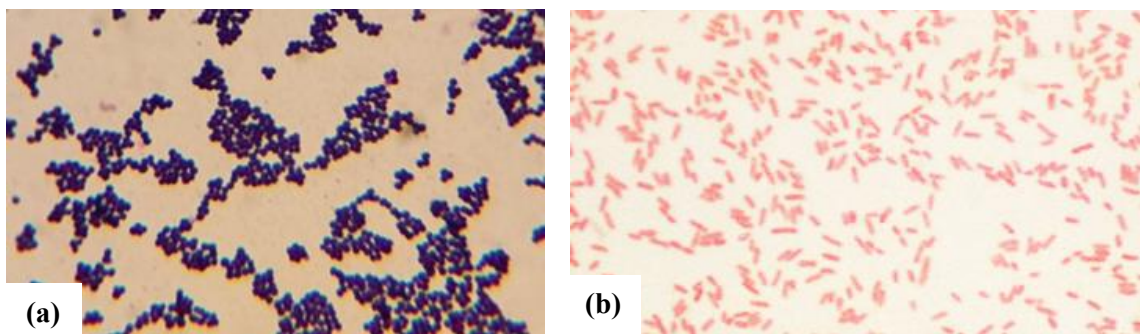


Figure 23 : Résultats de la coloration de Gram (a : Cocci Gram+ ; b : Bacille Gram-).

Sur les 25 souches identifiées à partir des différents milieux sélectifs, 3 (12%) souches sont Gram négatif et 22 (88%) souches sont Gram positif.



Le tableau 7 regroupe les observations microscopiques après coloration de Gram des différents isolats.

Tableau 7 : Résultats de l'identification microscopique des isolats (X100).

Milieu de Culture	Identification microscopique			Prélèvement
	Gram	Forme	Regroupement	
MacConkey	Positif	Bacille et coccobacille	Isolé	E10, E14, E16
BEA	Négatif	Cocci	Diplocoques et en chaînettes	E1, E2, E4, E5, E7, E8, E14, E15
Chapman	Positif	Cocci	Coques isolés, diplocoques, tétrades et en grappe de raisin (amas)	E1, E3, E4, E10, E12, E15
	Positif	Cocci	Diplocoques et en Grappe de raisin (amas)	E3
Gélose au sang	Positif	Cocci	En chaînettes	E1, E3, E4, E5, E7, E10, E12

Les colonies des souches isolées sur la gélose Chapman se présentant sous forme de grappes de cocci Gram-positifs suggèrent des Staphylocoques. Celles poussant sur la gélose BEA sont des Entérocoques présumés.

Les bactéries isolées sur gélose MacConkey apparaissent comme des bacilles Gram-négatifs, ce qui conduit à suspecter des *Enterobacteriaceae*.

L'observation après coloration simple des souches isolées sur le milieu Sabouraud+ Chloramphénicol montre des levures ovales ou sphériques (blastocoonidies), la présence possible de pseudo-hyphes, une caractéristique typique de *Candida albicans*, une distribution dense des cellules, suggérant une prolifération active.

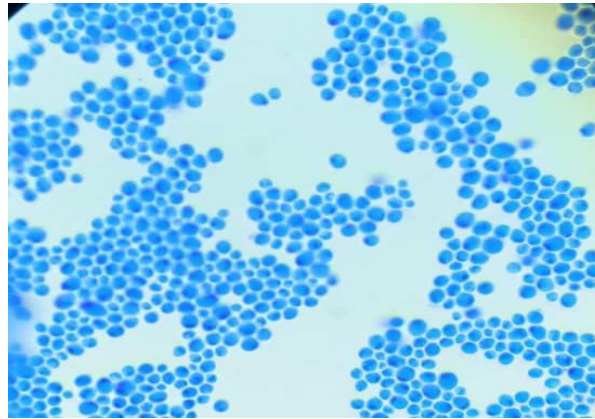


Figure 24 : observation microscopique de d'une levure suspecte d'être *Candida albicans*.

II. Résultats de l'identification biochimique

II.1. Identification des bacilles Gram-

Le tableau 8 illustre les résultats de l'identification biochimique des isolats suspects d'être des *Enterobacteriaceae*.

Tableau 8 : Résultats de l'identification des Entérobactéries présumées.

Echantillons	Citrate	Glucose	Lactose	Gaz	H2S	Mannitol	Mobilité	Indole	Nitrate-réductase	VP	RM	ONPG	Oxydase	Souches
E10	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	<i>Enterobacter aerogenes</i>
E14	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	<i>Escherichia coli</i>
E16	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

VP : Voges Prauskauser ; RM : Rouge de Méthyle ; ONPG : OrthoNitroPhényl ; Nitr-rédu : nitrate réductase ; TDA : Tryptophane désaminase ; LDC : lysine-décarboxylase ; ODC : Ornithine-décarboxylase ; ADH : Arginine-dihydrolase.

Le test du citrate de Simmons est un critère important dans les galeries d'identification biochimique des bactéries, notamment pour différencier les espèces au sein des *Enterobacteriaceae*. Par exemple, il permet de distinguer *Escherichia coli* (citrate négatif) de *Klebsiella pneumoniae* et



Enterobacter aerogenes (citrate positif). Il est souvent inclus dans des batteries de tests comme le test IMViC (Indole, Rouge de Méthyle, Voges-Proskauer, Citrate).



Figure 25 : Résultat du test de Citrate de Simmons (tube vert : test négatif ; tube bleu : test positif).

Ce test détecte la présence de cytochrome c oxydase, une enzyme impliquée dans la chaîne respiratoire. Il est utile pour différencier les bactéries oxydase positives comme *Pseudomonas spp.* des entérobactéries, généralement oxydase négatives. La présence d'une coloration violette indique un résultat positif.

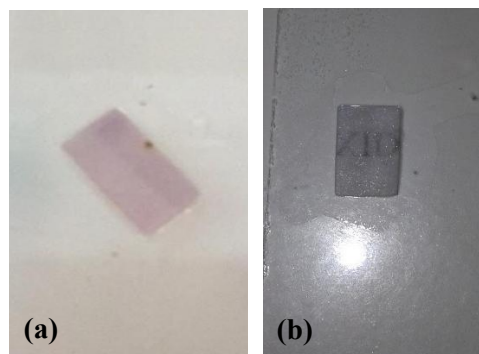


Figure 26 : Résultats du test d'oxydase (a : positif ; b : négatif).



II.2. Identification des coques Gram+

Les tableaux 9 et 10 illustrent les résultats de l'identification biochimique des isolats suspects d'être des staphylocoques, les streptocoques et les entérocoques, respectivement.

Tableau 9 : Résultats de l'identification des Staphylocoques présumées.

Echantillon	Catalase	Mannitol	Hémolyse	Coagulase	Souche
E01	+	+	-	-	<i>Staphylococcus</i> CN
E03	+	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> CN
E04	+	+	-	-	<i>Staphylococcus</i> CN
E12	+	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> CN
E02	+	+	α	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
E03	+	+	α	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
E09	+	+	α	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
E10	+	+	α	+	<i>Staphylococcus aureus</i>
E15	+	+	α	+	<i>Staphylococcus aureus</i>

CN : coagulase négative

Tableau 10 : Résultats de l'identification des Entérocoques et Streptocoques présumées.

Echantillon	Catalase	Hémolyse	Esculine	Mannitol	Mobilité	Souche
E01	-	β	+	+	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>
E03	-	γ	+	+	-	<i>Streptococcus</i> sp
E04	-	γ	+	+	-	<i>Streptococcus</i> sp
E05	-	α	+	+	-	<i>Streptococcus</i> sp
E07	-	α	+	-	-	<i>Streptococcus</i> sp
E10	-	α	+	-	-	<i>Streptococcus</i> sp
E12	-	α	+	+	-	<i>Streptococcus</i> sp
E01	-	α	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp
E02	-	α	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp
E04	-	γ	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp
E05	-	γ	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp
E07	-	γ	+	-	-	<i>Enterococcus</i> sp
E08	-	γ	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp
E14	-	γ	+	-	-	<i>Enterococcus</i> sp
E15	-	γ	+	+	-	<i>Enterococcus</i> sp



Le test de la catalase permet de vérifier la capacité des bactéries à décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), libérant ainsi de l'oxygène gazeux, sous l'action de l'enzyme catalase. Cette réaction enzymatique met en évidence la présence de catalase chez certaines bactéries. Il s'agit d'un test de base pour différencier les genres bactériens, notamment les *Staphylococcus* (catalase +) et les *Streptococcus* (catalase -).



Figure 27 : Test de catalase positif.

Pour le test d'hémolyse, une culture bactérienne a été réalisée sur une gélose au sang, un milieu enrichi permettant d'observer l'activité hémolytique des bactéries. L'hémolyse de type β , est caractérisée par une zone claire et translucide autour des colonies, indiquant une lyse complète des globules rouges due à la production d'hémolysines (Murray *et al.*, 2023).

Ce type d'hémolyse est typique de bactéries pathogènes, notamment : *Streptococcus pyogenes* (Groupe A), *Streptococcus agalactiae* (Groupe B) et certaines souches de *Staphylococcus aureus* (CLSI, 2024).

La souche E1 présente une activité β -hémolytique, indiquant la production d'hémolysines, un facteur de virulence important. Cette observation suggère que la souche peut être pathogène. Une identification complémentaire est nécessaire pour confirmer l'espèce bactérienne en cause.

L'hémolyse β est un marqueur diagnostique majeur utilisé en microbiologie pour différencier les streptocoques du groupe A, B, etc. Elle est associée à une production d'exotoxines (comme la streptolysine S ou O) (Jensen et Kilian, 2021).

L'observation de β -hémolyse est souvent le premier indice d'une bactérie potentiellement pathogène, notamment dans les infections respiratoires, cutanées ou néonatales (Facklam et Collins, 2023).



Figure 28 : Culture sur gélose au sang présentant une β -hémolyse.

Le test de coagulase, mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus*, Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma oxalaté de l'homme et de la souche à tester, de préférence à partir d'une culture en gélose Chapman. L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°C.

Ce phénomène est un critère de diagnostic fondamental permettant de distinguer *S. aureus* des autres staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Becker *et al.*, 2020) .



Figure 29: Résultats d'un test de coagulase positif.



II.4. Résultats de l'identification de *Candida albicans*

II.4.1. Test de blastèse (formation du tube germinatif)

Le "test de blastèse" ou plus précisément le test de filamentation (ou de production de tubes germinatifs) pour *Candida albicans* est une méthode rapide et simple, très utile pour son identification présomptive en laboratoire de microbiologie.

Ce test exploite une caractéristique morphologique unique de *Candida albicans* : sa capacité à former rapidement des tubes germinatifs (des ébauches d'hyphes vrais) lorsqu'elle est mise en présence de sérum (ou de plasma) animal ou humain, et incubée dans des conditions spécifiques.

La présence de tubes germinatifs est observée. Il s'agit de filaments fins et allongés qui émergent des blastospores sans constriction à leur base (c'est le critère distinctif). Les tubes germinatifs sont généralement plus longs que larges (au moins une fois et demie la taille de la cellule mère).

La levure est très probablement *Candida albicans*. Environ 90-95% des souches de *Candida albicans* produisent des tubes germinatifs dans ces conditions.

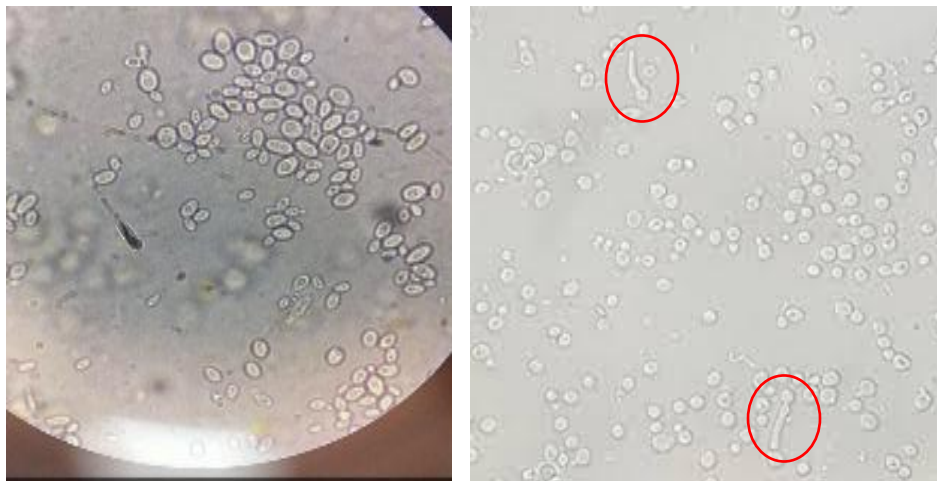


Figure 30 : Observation microscopique du test de blastèse.



II.4.2. Identification biochimique avec galerie Api Candida

Les Api sont des systèmes miniaturisés qui combinent plusieurs tests biochimiques (assimilation de sucres, détection d'enzymes spécifiques) dans une seule bandelette ou galerie. La lecture des réactions colorées génère un code numérique, qui est ensuite comparé à une base de données pour une identification précise.

Ces tests déterminent la capacité d'une levure à utiliser différents sucres (glucose, saccharose, galactose, tréhalose, etc.) comme unique source de carbone pour sa croissance en aérobiose. Le milieu de base est un milieu synthétique sans carbone, auquel on ajoute le sucre à tester. La croissance indique l'assimilation.

Pour *C. albicans* : Le profil d'assimilation des sucres est un critère clé. Généralement positif (+) pour : Glucose, Saccharose, Tréhalose parfois Galactose. Et (-) pour : Lactose et Xylose.

Tests enzymatiques :

- ✓ Beta-glucosidase : Souvent négative (-).
- ✓ Proline aminopeptidase : Souvent positive (+) (cette activité est souvent recherchée spécifiquement pour *C. albicans* et *C. dubliniensis*).
- ✓ Uréase : Négative (-) (permet de différencier de *Cryptococcus* par exemple).



Figure 31 : Résultat de l'identification biochimique de *Candida albicans*.

D'après l'étude macroscopique, microscopique, les tests biochimiques et les tests complémentaires, on conclue que les souches isolées sont les suivantes :



Les 3 bacilles Gram négatif isolés, sont des *Enterobacteriaceae* ; dont une *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* et une *Klebsiella pneumoniae*.

Et sur les 24 coques Gram positif, 9 (37,5%) sont des *Staphylococcaceae* ; dont 4 (44,44%) *Staphylococcus* à coagulase négative (SCN) et 5 (55,55%) *Staphylococcus aureus*. De plus, les 15 (62,5%) restant sont des *Streptococcaceae* (46.66%) et *Enterococcaceae* (53.33%).

III. Résultats de l'antibiogramme

L'antibiogramme est un test essentiel en microbiologie médicale qui permet de déterminer la sensibilité ou la résistance d'une souche bactérienne (ou fongique, mais ici nous nous concentrerons sur les bactéries) à différents antibiotiques.

Les diamètres des zones d'inhibition mesurés autour des disques d'antibiotiques permettent de classer la souche bactérienne comme sensible (S), intermédiaire (I) ou résistante [®] selon les normes du CA-SFM 2024 et les standards de PIA 2020.

Le but de la réalisation de l'antibiogramme c'était de choisir les souches ayant une multirésistance vis-à-vis les antibiotiques pour mettre en évidence leur capacité à former du biofilm.

Après 18-24h d'incubation, les résultats de la sensibilité aux antibiotiques ont été révélés. Des profils de résistance variés parmi les souches testées ont été observés. Le diamètre des zones d'inhibition a été mesuré à l'aide d'une règle. Les résultats sont affichés dans le tableau 24.

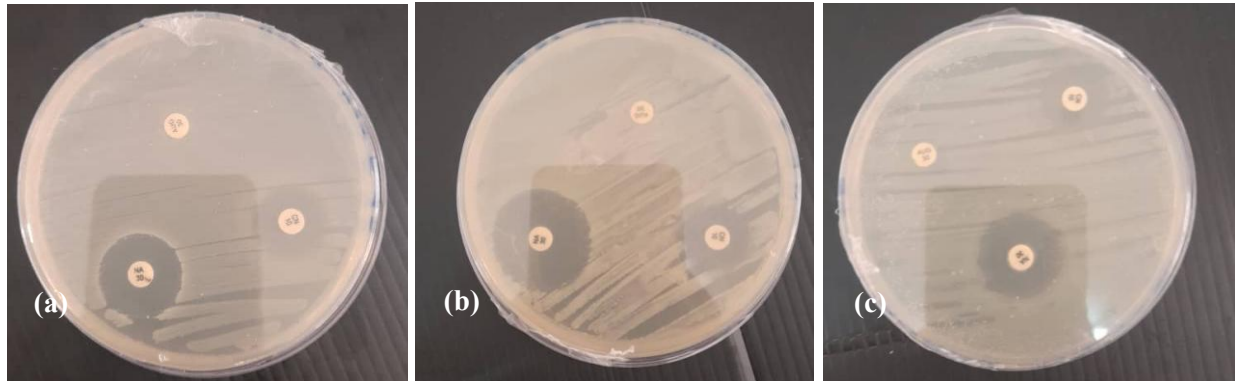
III.1. Sensibilité/Résistance des Entérobactéries

Les trois souches d'*Enterobacteriaceae* testées (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, et *Enterobacter aerogenes*) montrent une résistance à l'Ampicilline (D=0 mm pour toutes les souches) (Tableau 11), ce qui est une observation clinique fréquente compte tenu des mécanismes de résistance (ex: production de bêta-lactamases) largement répandus pour cet antibiotique.



Tableau 11 : Résultats de l'antibiogramme des Entérobactéries.

	Ampicilline AMP		Acide nalidixique NA		Gentamicine CN	
	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R
<i>Escherichia coli</i>	0	R	20	S	15	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	R	24	S	15	S
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	R	9	R	17	S

Figure 32 : Résultat de l'antibiogramme de : a : *E. coli* ; b : *K. pneumoniae* ; c : *E. aerogenes*.

III.2. Sensibilité/Résistance des Staphylocoques

Toutes les souches de *Staphylococcus* testées, qu'il s'agisse de *Staphylococcus CN* (probablement *Staphylococcus coagulase négative*) ou de *Staphylococcus aureus*, présentent une résistance généralisée à la Pénicilline G, à l'Amoxicilline et à la Clindamycine (D=0 mm pour la plupart des souches). Cette résistance aux pénicillines est très fréquente chez les staphylocoques, notamment due à la production de pénicillinase. La résistance à la Clindamycine est également notable (Tableau 12).



Tableau 12 : Résultats de l'antibiogramme des Staphylocoques.

Code	Souche identifiée	Pénicilline G P		Amoxicilline AMX		Rifampicine RFP		Erythromicine E		Clindamycine CD	
		D (mm)	S/R	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R
E01	<i>Staphylococcus CN</i>	0	R	0	R	0	R	09	R	0	R
E03	<i>Staphylococcus CN</i>	0	R	0	R	23	S	25	S	0	R
E04	<i>Staphylococcus CN</i>	0	R	0	R	20	S	25	S	0	R
E12	<i>Staphylococcus CN</i>	0	R	0	R	20	S	28	S	0	R
E02	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	R	0	R	21	S	27	S	0	R
E03	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	R	0	R	21	S	25	S	0	R
E09	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	R	0	R	21	S	25	S	0	R
E10	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	R	0	R	13	R	10	R	0	R
E15	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	R	0	R	22	S	27	S	0	R

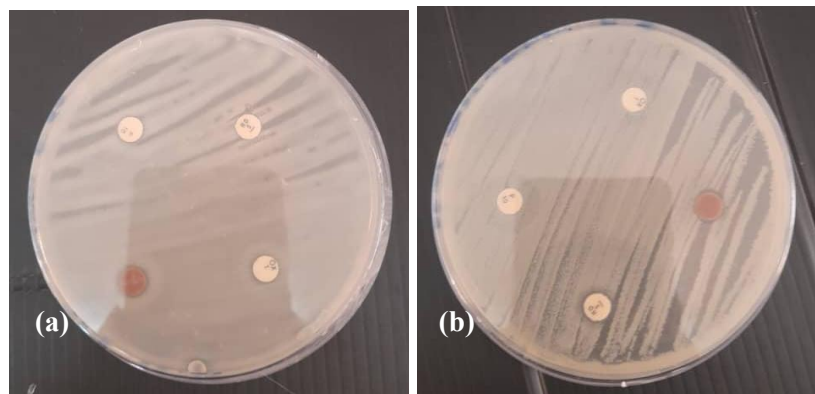


Figure 33 : Résultat de l'antibiogramme de : a : E01 ; b : 10.

III.3. Sensibilité/Résistance des Streptocoques

La souche *Streptococcus pyogenes* (E01) montre une résistance à l'Amoxicilline, la Streptomycine et l'Erythromycine (D=0 mm pour les trois). Cette souche de *S. pyogenes* est multi-résistante aux antibiotiques testés, ce qui est une observation clinique préoccupante pour une bactérie souvent traitée par des bêta-lactamines.



Pour les Streptocoques, une résistance fréquente à l'Amoxicilline est observée. La Streptomycine et l'Erythromycine sont parfois efficaces, mais plusieurs souches montrent des profils de multi-résistance, notamment *Streptococcus pyogenes* E01 et les *Streptococcus sp* E07 et E12, ce qui est très préoccupant pour la prise en charge clinique.

Tableau 13 : Résultats de l'antibiogramme des Streptocoques.

Code	Souche identifiée	Amoxicilline AMX		Streptomycine S		Erythromicine E	
		D (mm)	S/R	D (mm)	S/R	D (mm)	S/R
E01	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	R	0	R	0	R
E03	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	28	S	24	S
E04	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	28	S	25	S
E05	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	30	S	25	S
E07	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	0	R	10	R
E10	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	27	S	0	R
E12	<i>Streptococcus sp</i>	0	R	0	R	8	R

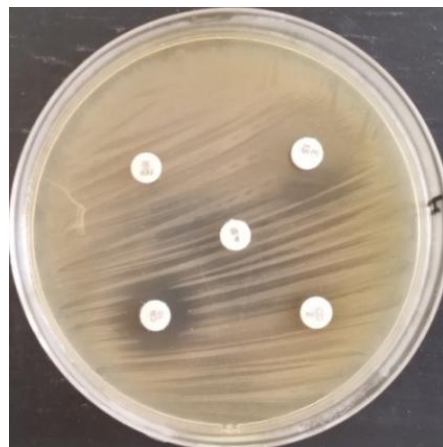


Figure 34 : Résultat de l'antibiogramme de *Streptococcus pyogenes* (E01).

IV. Résultats de la caractérisation pour la formation de biofilm

Pour détecter la production du biofilm *in vitro*, et sur les 28 souches isolées durant notre étude, nous avons choisi souches microbiennes présentant une multirésistance vis-à-vis les antibiotiques.



Nous avons employé deux méthodes classiques et qualitatives : le test en tube à essai (décrit par Christensen et al., 1985) et la méthode à la Gélose Rouge Congo (selon Freeman et al., 1989). Les résultats détaillés de ces analyses sont présentés ci-dessous.

IV.1. Méthode des tubes à essai en verre

Après incubation, nous avons observé une coloration violette intense adhérente aux parois de tous les tubes testés pour *Staphylococcus aureus*. Cette observation est cruciale, car la coloration (Cristal Violet, un colorant couramment utilisé pour visualiser les biofilms) révèle la présence d'une matrice extracellulaire riche en polysaccharides, protéines et ADN qui caractérise un biofilm.

Ces résultats indiquent de manière concluante une forte capacité de formation de biofilm par les souches de *Staphylococcus aureus* que nous avons testés. La nature adhérente et intense de la coloration violette sur les parois des tubes est le signe distinctif d'un biofilm mature et bien structuré.

Les résultats de nos tests pour les streptocoques ont révélé une forte coloration violette, visiblement fixée aux parois de l'ensemble des tubes.

Les tubes des entérocoques présentent une coloration violette modérée, moins uniforme et moins intense que celle observée avec *S. aureus*.

Ces résultats suggèrent que les souches de *Enterococcus sp.* testées ont une capacité intermédiaire à former des biofilms. La coloration violette, bien que présente, n'atteint pas l'intensité et l'homogénéité observées chez *S. aureus*, qui est un fort producteur de biofilm. Cette variabilité dans l'intensité et l'uniformité de la coloration entre les tubes indique également une hétérogénéité au sein des souches elles-mêmes. Cela signifie que certaines souches ou espèces de entérocoques pourraient être de meilleurs producteurs de biofilm que d'autres, même au sein du même groupe.

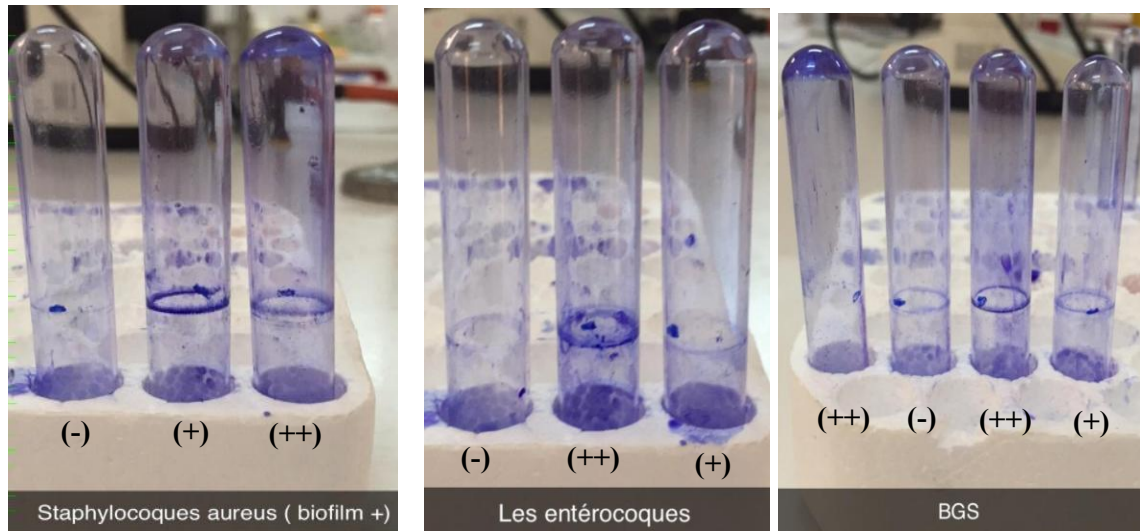


Figure : (-) : absence ; (+) : modérée ; (++) : forte.

Figure 35 : Production de biofilms chez les staphylocoques, entérocoques et les streptocoques.

Cette différenciation est cruciale car la capacité de former des biofilms est un facteur de virulence majeur pour de nombreuses bactéries, y compris les streptocoques et les staphylocoques, influençant leur persistance dans l'organisme, leur résistance aux antibiotiques et leur capacité à provoquer des infections chroniques.

IV.2. Méthode Gélose Rouge Congo

L'analyse de la production de biofilms par la méthode de la Gélose Rouge Congo a révélé que la majorité des souches testées sont productrices de biofilms. Ces souches se caractérisent par des colonies noires avec une consistance sèche sur la Gélose Rouge Congo, un aspect dû à la production d'exopolysaccharides qui réagissent avec le colorant.

À l'inverse, les souches de *Candida albicans* n'étaient pas productrices de biofilms, se présentant sous forme de colonies rouges sur le même milieu. Ces résultats sont présentés dans les figures.



Figure 36 : Production de biofilm sur Gélrose Rouge Congo (a : *Streptococcus* ; b : *Staphylococcus aureus* ; c : *E. coli*).

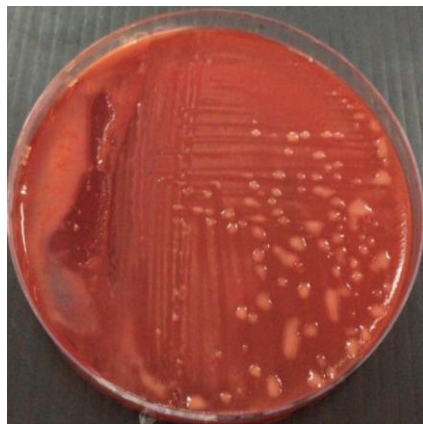


Figure 37 : Absence de production de biofilm sur Gélrose Rouge Congo par *Candida albicans*.

V. Discussion

La cavité buccale est un écosystème complexe et l'un des sites les plus peuplés de microbes dans le corps humain. Elle abrite plus de 500 espèces bactériennes différentes, formant une flore normale qui joue un rôle dans l'équilibre de l'organisme. La relation entre l'hôte (le corps humain) et les microbes buccaux est particulière en raison de la grande diversité de ces microorganismes et de la complexité des facteurs qui influencent cet environnement. La cavité buccale fait partie du tube digestif, qui abrite un grand nombre de micro-organismes. Ces microbes forment un biofilm oral ou plaque dentaire, essentiel à la santé buccale (Benkacher et Hamoud, 2018).



Le biofilm buccal est une communauté structurée de micro-organismes (principalement des bactéries) adhérant à une surface buccale (comme les dents, la langue ou les muqueuses) et enveloppée dans une matrice auto-produite de polymères extracellulaires. Ce biofilm se forme progressivement et joue un rôle central dans l'apparition de diverses maladies buccales telles que la carie dentaire et les maladies parodontales. (Kolenbrander *et al.*, 2010).

Notre étude avait pour objectif l'isolement et l'identification des bactéries présentes dans la cavité buccale humaine. Pour cela, nous avons analysé 16 prélèvements issus de différents sites buccaux : la plaque dentaire, la gencive, la langue et les caries dentaires, chez des individus de 14 à 50 ans.

Le choix de ces sites repose sur leur richesse en micro-organismes et leur implication dans la formation des biofilms (tels que la plaque dentaire), qui jouent un rôle majeur dans le développement des maladies parodontales et de la carie dentaire.

L'étude a permis de mettre en évidence la richesse microbienne de la cavité buccale humaine. Les résultats montrent une croissance bactérienne notable après une incubation à 37 °C pendant 48 heures, ce qui confirme que la cavité buccale constitue un écosystème complexe abritant une diversité microbienne importante (Dewhirst *et al.*, 2020).

La présence de différents types de colonies bactériennes sur les milieux sélectifs, tels que la gélose MacConkey, BEA, gélose au sang, et Chapman, a permis une première orientation dans l'identification des espèces présentes. Ces milieux sont spécifiquement conçus pour isoler certains groupes bactériens, en fonction de leurs caractéristiques biochimiques et physiologiques (Brooks *et al.*, 2021). Par exemple, la gélose MacConkey, utilisée pour l'isolement des entérobactéries, permet de distinguer les bactéries lactose-positives comme *Escherichia coli*, qui produisent des colonies roses, des bactéries lactose-négatives comme *Salmonella* et *Shigella*, qui donnent des colonies incolores ou beiges (Snyder *et al.*, 2021).

Sur la gélose BEA (Bile Esculine Azide), les entérocoques ont été identifiés par la coloration noire du milieu, témoignant de l'hydrolyse de l'esculine en présence de bile. Ce phénomène est bien documenté par Messaoudi *et al.* (2020), qui expliquent que le produit hydrolysé (esculetine) réagit avec les ions ferriques pour former un complexe noir.



Concernant la gélose au sang, la distinction des hémolyses a permis de différencier les types de streptocoques. Les streptocoques bêta-hémolytiques présentent une zone claire autour des colonies traduisant une lyse complète des globules rouges, alors que les streptocoques alpha-hémolytiques montrent une hémolyse partielle (verdissement). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Zhang *et al.* (2022), qui soulignent l'importance de la lecture correcte des hémolyses dans le diagnostic des infections streptococciques.

Sur la gélose Chapman (milieu salé au mannitol), *Staphylococcus aureus* a formé des colonies jaunes avec un changement de la couleur du milieu, indiquant la fermentation du mannitol et l'acidification du milieu. À l'inverse, *Staphylococcus CN* n'a pas produit de changement de couleur. Cette différenciation est confirmée par les travaux de Fernandes *et al.* (2023), qui montrent que cette capacité de fermentation est un critère clé dans la différenciation des staphylocoques pathogènes.

L'isolement des entérocoques sur la gélose BEA et des streptocoques sur la gélose au sang est également cohérent avec les données épidémiologiques actuelles, qui indiquent une fréquence élevée de ces genres bactériens dans la flore orale, en particulier chez les individus présentant des lésions carieuses (Zhou *et al.*, 2023). Par ailleurs, la gélose Chapman a permis la mise en évidence de staphylocoques, dont certains peuvent être pathogènes opportunistes en cas de déséquilibre du microbiote buccal (Gupta *et al.*, 2022).

Les résultats observés corroborent les données de la littérature selon lesquelles la plaque dentaire et d'autres sites buccaux sont des niches écologiques favorables à la colonisation bactérienne (Lamont *et al.*, 2020).

Certaines souches d'entérobactéries peuvent causer des infections graves, en particulier chez les personnes immunodéprimées. Du côté des *Staphylococcaceae*, *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus CN* ont été isolés, espèces connues pour leur rôle opportuniste dans les infections buccales. Ces résultats sont cohérents avec les données de la littérature, mettant en évidence le lien entre microbiote buccal, hygiène et état de santé buccodentaire (Robertson et Smith, 2009).



Les souches identifiées ont majoritairement été classées en familles : *Enterobacteriaceae* (Gram négatif), *Staphylococcaceae* (Gram positif), *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae* conformément aux méthodes d'identification classiques et aux critères mentionnés par Robertson et Smith (2009).

Au sein de la famille des *Enterobacteriaceae*, la présence de souches *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* a été mise en évidence par des tests biochimiques spécifiques. Par exemple, la positivité du test de l'indole pour certaines souches est fortement suggestive d'*E. coli*, tandis que la non-mobilité et d'autres réactions (citrate de Simmons négatif, urée positive ou négative, H₂S négatif) orientent vers *Klebsiella spp.* (Kaufmann *et al.*, 2012). La mobilité est un critère discriminant important, la plupart des *Klebsiella* étant immobiles, à l'inverse de la majorité des *Escherichia coli* (Robertson et Smith, 2009).

Concernant les *Staphylococcaceae*, leur identification repose sur des critères morphologiques et tinctoriaux (Gram positif, cocci en amas) qui les distinguent clairement des *Enterobacteriaceae*.

Les tests biochimiques classiques utilisés dans cette étude sont des outils fondamentaux pour l'identification bactérienne. Cependant, leur interprétation doit être rigoureuse et complétée, si possible, par d'autres méthodes pour une identification plus précise, notamment au niveau de l'espèce. Des techniques plus récentes comme la spectrométrie de masse (MALDI-TOF MS) ou le séquençage de l'ADN pourraient confirmer ces identifications et apporter des informations supplémentaires sur la virulence ou la résistance aux antibiotiques des souches isolées.

L'analyse des cultures sur gélose Rouge Congo a permis de différencier les souches bactériennes par leurs caractéristiques morphologiques et chromatiques, en particulier la production de substances extracellulaires. La gélose Rouge Congo est une méthode bien établie pour la détection qualitative de la production de polysaccharide extracellulaire (EPS) chez diverses espèces bactériennes, un facteur clé dans la formation de biofilm (Freeman *et al.*, 1989 ; Kim *et al.*, 2021).

Les observations des colonies sur gélose Rouge Congo, présentant des phénotypes rugueux ou lisses, ainsi que des couleurs variées (rouge vif, rouge foncé, noir), sont cohérentes avec la littérature. Un phénotype rugueux et une coloration rouge ou noire intense sont généralement



associés à une production élevée de polysaccharide extracellulaire et à une forte capacité de formation de biofilm chez plusieurs bactéries pathogènes (O'Toole et Kolter, 1998 ; Stepanović *et al.*, 2007). À l'inverse, un phénotype lisse et une coloration plus claire pourraient indiquer une production d'EPS plus faible ou l'absence de biofilm.

En ce qui concerne les souches de *Candida albicans*, les tests sur gélose Rouge Congo ont révélé des propriétés variables, notamment l'absence de formation de biofilm. *Candida albicans* est un champignon commensal et pathogène majeur, dont la capacité à former des biofilms est cruciale pour sa virulence et sa résistance aux antifongiques (Donlan et Costerton, 2002 ; Kumamoto et Vences, 2017).

Les résultats obtenus, tels que la formation de biofilm sur gélose Rouge Congo, ne sont pas dans la même ligne que ceux dans la littérature (Piras *et al.*, 2020).

Il est important de noter que si la gélose Rouge Congo est un outil précieux pour le criblage phénotypique, des méthodes complémentaires telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie confocale à balayage laser (CLSM) et des méthodes quantitatives de mesure du biofilm (par exemple, le test au cristal violet) sont nécessaires pour une caractérisation complète et une quantification précise de la production d'EPS et de la formation de biofilm (Azeredo *et al.*, 2017 ; Ramage *et al.*, 2012). De plus, des études moléculaires, comme l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'EPS et la formation du biofilm, pourraient apporter des informations plus approfondies sur les mécanismes sous-jacents aux phénotypes observés (Uppuluri *et al.*, 2009).

Les résultats de cette étude confirment l'utilité de la gélose Rouge Congo comme méthode rapide et efficace pour la détection et la différenciation des souches bactériennes et de *Candida albicans* en fonction de leur capacité à produire des substances extracellulaires et à former des biofilms. Ces observations préliminaires jettent les bases de futures investigations visant à élucider les mécanismes moléculaires de la formation de biofilm et à identifier de nouvelles stratégies pour cibler les infections associées aux biofilms.

Les résultats obtenus à partir de la méthode des tubes à essai en verre montrent des différences notables dans la capacité de formation de biofilms parmi les différentes souches



bactériennes testées. Les souches de *Staphylococcus aureus* ont montré une forte capacité de formation de biofilm, caractérisée par une coloration violette intense et homogène sur les parois internes des tubes. Ce résultat est en accord avec plusieurs études qui ont mis en évidence le fort potentiel de biofilm des souches de *S. aureus*, souvent associé à leur virulence et à leur résistance aux antibiotiques (Otto, 2008 ; Archer et Mazaitis, 1991).

La formation de biofilm est une stratégie de survie majeure pour *Staphylococcus aureus*, lui conférant plusieurs avantages significatifs :

Protection accrue : Au sein d'un biofilm, les bactéries sont englobées dans une matrice protectrice qui les rend considérablement plus résistantes aux antibiotiques, aux désinfectants et aux mécanismes de défense de l'hôte. Les antibiotiques peinent à pénétrer cette matrice, et les bactéries à l'intérieur peuvent se trouver dans des états métaboliques altérés, moins sensibles aux traitements.

Adhésion et colonisation persistante : La capacité à former un biofilm permet à *S. aureus* de coloniser durablement des surfaces inertes (comme les cathéters, prothèses, implants) ainsi que des tissus vivants de l'hôte, rendant les infections chroniques et difficiles à éradiquer.

Résistance aux défenses immunitaires : Le biofilm agit comme une barrière physique, protégeant les bactéries des phagocytes et d'autres composants du système immunitaire, ce qui complique l'élimination de l'infection par l'organisme.

Échange génétique : Le biofilm favorise également un environnement propice à l'échange de matériel génétique entre bactéries, contribuant potentiellement à la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques.

La présence d'un tel biofilm positif pour *Staphylococcus aureus* dans nos tests souligne l'importance clinique de cette caractéristique. Elle peut expliquer pourquoi certaines infections à *S. Aureus* sont particulièrement tenaces et requièrent des approches thérapeutiques spécifiques, souvent plus agressives ou combinées, pour être résolues.

Les streptocoques oraux (ou streptocoques buccaux) sont des acteurs fondamentaux dans la formation du biofilm dentaire, communément appelé plaque dentaire. Leur rôle est complexe et



ambivalent : ils sont à la fois des composants essentiels d'une flore buccale saine et des initiateurs potentiels de maladies bucco-dentaires comme la carie dentaire et les parodontites.

Les streptocoques oraux sont souvent considérés comme les colonisateurs primaires de la cavité buccale. Cela signifie qu'ils sont parmi les premières bactéries à adhérer aux surfaces de la bouche (dents, gencives, langue, muqueuses) après leur nettoyage. Leur capacité à former des biofilms est leur mode de vie naturel et privilégié.

Par ailleurs, la capacité de *S. pyogenes* à former un biofilm est un facteur de virulence de plus en plus étudié. Il ne s'agit pas toujours d'un biofilm aussi robuste et dense que celui produit par *Staphylococcus aureus* ou certains streptocoques oraux sur les dents, mais sa formation est néanmoins cliniquement pertinente.

Les entérobactéries ont, quant à eux, montré une capacité modérée de formation de biofilm, avec une hétérogénéité visible entre les tubes. Ce comportement intermédiaire a été décrit dans la littérature, notamment chez *E. coli*, dont la production de biofilm varie selon les souches et les conditions environnementales (Mohamed *et al.*, 2004 ; Hancock et Perego, 2002). Ces variations peuvent être dues à des différences dans l'expression des gènes liés à la production de substances extracellulaires et à l'adhésion.

Ces résultats confirment que la méthode de coloration au cristal violet, combinée à l'observation visuelle des tubes, constitue un outil simple mais efficace pour discriminer les capacités de formation de biofilm parmi différentes espèces bactériennes. Toutefois, cette méthode reste semi-quantitative et devrait idéalement être complétée par des analyses spectrophotométriques ou microscopiques pour une évaluation plus précise.

Dans l'étude de Belbase *et al.* (2017), il a été observé des taux plus élevés de multi-résistance chez les souches bactériennes productrices de biofilms comparativement aux souches non productrices. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par Ghasemian *et al.* (2015). La nature protectrice du biofilm confère aux bactéries qui y résident une résistance intrinsèque à de nombreux antibiotiques. Il est estimé que la résistance aux antibiotiques des bactéries au sein d'un biofilm peut être augmentée jusqu'à 1000 fois (Neupane *et al.*, 2016).



Les bactéries sous forme de biofilm sont généralement moins sensibles aux antibiotiques que leurs homologues planctoniques. Plusieurs facteurs pourraient contribuer à cette résistance accrue, notamment une pénétration réduite de l'antibiotique, la liaison des antibiotiques aux composants du biofilm, une densité bactérienne élevée et une croissance bactérienne plus lente à l'intérieur du biofilm (Shrestha *et al.*, 2018). Par ailleurs, la structure du biofilm favorise le transfert horizontal de gènes entre bactéries, ce qui contribue à la propagation de la résistance aux médicaments et d'autres facteurs de virulence (Belbase *et al.*, 2017).

Conclusion



Conclusion

L'étude menée sur le microbiote buccal et la formation du biofilm buccal a permis de mieux comprendre la diversité microbienne présente dans la cavité buccale et son implication dans le développement de pathologies bucco-dentaires. Grâce à l'enrichissement, l'isolement sur milieux sélectifs et l'identification morphologique, biochimique et microscopique, plusieurs espèces bactériennes ont été mises en évidence.

Les résultats expérimentaux ont permis d'isoler différentes espèces bactériennes responsables de la formation du biofilm, notamment des cocci Gram positif tels que *Streptococcus sp*, ainsi que des bacilles Gram négatif comme *Klebsiella pneumoniae*. Les tests de formation de biofilm ont révélé un forte capacité d'adhésion chez certaines souches, confirmant leur rôle dans les infections chroniques de la cavité buccale.

Ces résultats confirment que le biofilm buccal est une structure organisée, colonisée par des bactéries capables de résister aux antimicrobiens et aux mécanismes de défense de l'hôte. Leur présence contribue à l'apparition de pathologies comme la carie, la gingivite ou encore la parodontite.

L'identification des bactéries clés impliquées dans la formation de biofilms pathogènes et la quantification de leur potentiel biofilmogène ouvrent de nouvelles perspectives pour le diagnostic précoce et la prévention personnalisée des maladies bucco-dentaires telles que la carie dentaire, la parodontite et la péri-implantite. De plus, ces connaissances pourraient mener à la conception de molécules spécifiques capables d'inhiber la formation de biofilms ou de perturber leur structure, offrant ainsi des alternatives aux traitements antibiotiques conventionnels.

D'autres études peuvent être menées dans ce contexte, notamment :

1. Utilisation des méthodes moléculaires comme la PCR ou le séquençage 16S rRNA, afin d'identifier des bactéries non cultivables et affiner la taxonomie des espèces présentes.
2. Évaluation de la sensibilité des biofilms aux agents antimicrobiens ou aux huiles essentielles naturelles, pour proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.
3. Études longitudinales pour analyser l'évolution du microbiote et du biofilm buccal selon l'âge, les habitudes alimentaires ou l'hygiène bucco-dentaire.
4. Modélisation *in vitro* du biofilm sur des surfaces dentaires artificielles, afin de mieux comprendre son développement en conditions contrôlées.

Références

Liste des références

A

ABDI, F. Z. (2016). Quels Rôles des Exopolysaccharides (EPS) dans l'expression et l'implantation de la flore microbienne commensale ?.

AIT ABDERRAHIM, L. (2022). Interactions microorganisms-hosts-environment.

Archer, G. L., & Mazaitis, M. J. (1991). Detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* using microtiter plate assay. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 12(12), 838–844.

Aumeran Claire, Balestrino Damien et Forestier Christiane, (2020). Biofilms bactériens et santé. Encyclopédie de l'environnement. <https://www.encyclopedie-environnement.org/sante/biofilms-bacteriens/>

Azeredo, J., Gomes, L. C., & Costa, L. R. (2017). *Biofilms : Methods for Biofilm Research*. Springer. (Ce n'est pas une référence spécifique à un article, mais un livre récent qui pourrait couvrir les méthodes de caractérisation des biofilms).

B

Bastard, A. (2015). Interactions micro-organismes-bois et impact sur les propriétés physico-chimiques du vin : fermentation malolactique par le biofilm de *Cenococcus oeni* (Doctoral dissertation, Université de Bourgogne).

Becker, K., Schaumburg, F., Fegeler, C., Friedrich, A. W., & Köck, R. (2020). *Staphylococcus aureus* : diagnostics and antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3), e00152-19.

Bedouh Hiba, G. M. D. I. (2023). Effet de l'hespéridine extrait d'une plante médicinale sur la formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*.

Belbase, M., Adhikari, J., Khan, T. & Jalan, R. (2017). Demographic profile and pathway to care in patients with schizophrenia in a tertiary care hospital from western Nepal. *Journal of Psychiatrists' Association of Nepal*, 4(1), 27–29.

BELHACHEMI, B., BENZAADA, F., AMAR BEKADA, R., & CHIBANI, H. (2023). Contribution à la caractérisation des bactéries isolées à partir de la cavité buccale (Doctoral dissertation).

Ben Saleh, N., & Ben Abdallah, H. (2024). Caractérisation des biofilms microbiens dans la cavité buccale : étude clinique et microbiologique. *Revue Maghrébine de Biotechnologie*, 12(1), 45–59.

Benkacher Sabiha, Hamoud Norelhouda. « Isolement, Identification et étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries des caries dentaires. » (2018).

BENMESBAH, L., CHALAL, A., KANOUNI, A., MASSA, L., CHALAL, M. E. A., REMITA, B., & SMAIL, W. (2022). Fluor et Carie Dentaire : Apport et Limite.

Bouabsa A. (2021). Caractérisation des espèces bactériennes productrices de biofilm isolées à partir d'équipements médicaux. Université Mustapha Stambouli- Mascara.

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

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., & Morse, S. A. (2021). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology (28th ed.). McGraw-Hill Education.

Burton, J. P., Cowley, S., W. M., & Tagg, J. R. (2006). *Oral Streptococci as potential probiotics*. The Journal of Pediatrics, 149(3), S140–S143.

C

Camille, J. (2007). La flore buccale et ses implications cliniques. Paris : Éditions Odontologie Française.

Chalmers N. I., Palmer R. J. Jr., Cisar J. O., Kolenbrander P. E. (2008). Characterization of a Streptococcus sp.-Veillonella sp. Community micromanipulated from dental plaque. Journal of Bacteriology, 190(24), 8145–8154.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces. Infection and Immunity, 37(1), 318–326.

CLSI (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100.

Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM/EUCAST), Recommandations 2024.

Connie, R. M., & Donald, S. M. (2019). Microbiology : An Introduction (13th ed.). Pearson Education.

Costa, R. C., Bertolini, M., Costa Oliveira, B. E., Nagay, B. E., Dini, C., Benso, B., ... et Souza, J. G. S. (2023). Biofilms polymicrobiens liés aux maladies des implants dentaires : démêler le rôle critique de la matrice du biofilm extracellulaire. Revues critiques en microbiologie, 49(3), 370-390.

Couderc, M., Briandet, R., & Deschamps, J. (2014). Les biofilms microbiens : une stratégie collective pour coloniser les surfaces. Médecine/Sciences, 30(2), 155–162.

Cutler, C. W., & Genco, C. A. (2011). *Oral microbiology in the 21st century*. ASM Press.

D

Del Rey, Y. C., Parize, H., Assar, S., Göstemeyer, G., & Schlafer, S. (2024). Effect of mutanase and dextranase on biofilms of cariogenic bacteria : a systematic review of in vitro studies. Biofilm, 100202.

Devine, D. A., & Marsh, P. D. (2009). Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. Journal of Oral Microbiology, 1(1), 1949

Dewhirst, F. E., Chen, T., & Izard, J. (2020). The human oral microbiome. Periodontology 2000, 82(1), 1–12.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms : Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, 15(2), 167-193.

Drider, D., Fimland, R., Héchard, Y., McMullen, L. M., & Préfontaine, G. (2006). *The Food Applications of Bacteriocins: From the Dairy Industry to Meat Products*. International Journal of Molecular Sciences, 7(3), 291–306.

Dubois, M., Ortis, M., Doglio, A., & Bougault, V. (2024). Microbiote oral et santé bucco-dentaire des sportifs : revue narrative. Cahiers de Nutrition et de Diététique.

E

El Khoury, N. (2021). Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez *Bacillus thuringiensis* (Doctoral dissertation, Université Paris-Saclay ; Université Saint-Joseph (Beyrouth)).

F

Facklam, R. & Collins, M. D. (2023). Identification of β -hemolytic streptococci : current approaches and new developments. Clinical Microbiology Reviews, 36(1), e00123-22.

Flemming H.-C. et al. (2016). Biofilms : an emergent form of bacterial life. Nature Reviews Microbiology, 14(9), 563–575.

Fernandes, M., Freitas, F., & Pereira, A. (2023). Biofilm-forming bacteria and resistance patterns in oral infections : Current perspectives. Microorganisms, 11(2), 389.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology, 42(8), 872-874.

G

Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Springer.

Gillespie, S. H., & Hawkey, P. M. (2006). *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed.). Wiley-Blackwell.

Ghasmian, A., Bahador, A., & Pourakbari, B. (2015). Antimicrobial resistance patterns of oral pathogens : Emerging trends and implications. Iranian Journal of Microbiology, 7(5), 280–285.

Gruner, D., Paris, S., & Schwendicke, F. (2016). Probiotics for managing caries and periodontitis : Systematic review and meta-analysis. Journal of Dentistry, 48, 16-25.

Gupta, A., Singh, S.K., Gupta, B.B., et al. (2023). Evaluating the Sustainable COVID-19 Vaccination Framework of India Using Recurrent Neural Networks. Wireless Personal Communications, 133, 73–91.

H

Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). *Beyond the red complex: the microbial drivers of periodontal disease*. Molecular Oral Microbiology, 27(6), 405–409.

Hancock, L. E., & Perego, M. (2002). The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. Journal of Bacteriology, 184(23), 6876–6880.

Hathroubi, S. (2016). Rôle des Polysaccharides de Surface dans la Formation des Biofilms et rôle du Biofilm D'*actinobacillus Pleuropneumoniae* dans la Pathogénicité.

Hayek, M. (2018). Le Quorum Sensing chez la bactérie marine *Shewanella woodyi* : Rôle dans l'émission de luminescence et dans la formation du biofilm (Doctoral dissertation, Université de Toulon).

Heller, G., Bonafe, A., Gibert, P., & Orti, V. (2021). Classification des maladies et des affections parodontales et péri-implantaires. Encyclopédie Médico-Chirurgicale EMC, Elsevier SAS, Paris.

Houvion, E. (2014). Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

J

Jensen, A. & Kilian, M. (2021). Streptococcal β -hemolysins : Functions and pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 12, 668346.

JF Perrin mise à jour 2006-2017-2022.

K

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H. et Thurnheer, T. (2020). Biofilm matrixome : composants extracellulaires dans des communautés microbiennes structurées. *Tendances en microbiologie*, 28(8), 668-681.

Kaufmann, E. W., et al. (2012). *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press.

Kazarina, A., Kuzmicka, J., Bortkevica, S., Zayakin, P., Kimsis, J., Igumnova, V., ... & Ranka, R. (2023). Oral microbiome variations related to ageing : possible implications beyond oral health. *Archives of Microbiology*, 205(4), 116.

Khelaifia, S. (2023). The human oral microbiota, updating methodologies and culture techniques.

Khelaifia, S., Raoult, D., & Lagier, J. C. (2023). Advances in culturomics and implications for the human microbiome studies. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(2), e00245-21.

Kientz, P. (2019). La mise en évidence de la plaque dentaire : données actuelles (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).

Kilian, M., et al. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10), 657–666.

Kim, Y., Han, S., Lee, J., Jeon, C., & Kim, J. (2021). Congo Red Agar as a Screening Medium for Detection of Extracellular Polymeric Substance Production by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(6), e00057-21. (Exemple d'utilisation récente de la gélose Rouge Congo pour une bactérie spécifique)

Kolenbrander, P. E., Palmer Jr, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 471–480.

Kumamoto, C. A., & Vines, M. D. (2017). Contributions of *Candida albicans* Biofilms to Pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 16(12), 1011-1022.

L

La Scola, B. (2015). Nouvelle technique d'étude du microbiote: la culturomique. *Revue francophone des laboratoires*, 2015(469), 83-87.

- Lamont, R. J., Koo, H., & Hajishengallis, G. (2020). The oral microbiota
- Lamouri, A. (2020). Etude comparative de biofilm clinique in vitro de secteurs médicaux entre quelques souches bactériennes : cas de l'hôpital d'El-Meghaier.
- Langella, P. (2017). Le biofilm dentaire et l'équilibre du microbiote oral: des concepts majeurs pour le maintien de la santé buccale.
- Laurent, M., Gogly, B., Tahmasebi, F., & Paillaud, E. (2011). Les candidoses oropharyngées des personnes âgées. *Geriatr. Psychol. Neuropsychiatr. Vieil*, 9, 21-28.
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). *A Model for the Role of the Streptococcus mutans VicRK (VicR/VicK) Two-Component System in Regulation of Virulence Gene Expression*. *Journal of Bacteriology*, 190(19), 6524–6530.
- Loreto Abuselme et collaborateurs, de l'université de Santiago (Chili), paru dans le journal *Perio* 2000 en 2021. (86 :57-78.)

M

- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Marsh, P. D., Moter, A., & Devine, D. A. (2011). *Dental plaque biofilms: what are they and how do they form?*. *Dental Clinics of North America*, 55(4), 629–642.
- Matsui, M., Chosa, N., Shimoyama, Y., Minami, K., Kimura, S., & Kishi, M. (2014). Effects of tongue cleaning on bacterial flora in tongue coating and dental plaque : a crossover study. *BMC oral health*, 14, 1-8.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2021). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 12(1), 45–62.
- Messaoudi, A., Khelef, D., & Bellal, M. (2020). Antibioresistance chez les bactéries buccales isolées : enjeux cliniques et prophylaxie. *Algérienne de Biologie Clinique*, 33(4), 251–260.
- Minne, X. (2024). Étude de l'adhérence de bactéries buccales sur un hydrogel à base de gélatine et d'alginate.
- Minty M, Loubières P, Canceill T, Azalbert V, Burcelin R, Tercé F, Blasco-Baque V. Gender-associated differences in oral microbiota and salivary biochemical parameters in response to feeding. *J Physiol Biochem*. Jul 2020, Vol. 10, p. 1007.
- Minty, M. (2021). Le microbiote oral, acteur majeur de notre santé générale (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).
- Mme Laurence, L. U. P. I. (2020). Effet de la prophylaxie orale individuelle sur l'inflammation interdentaire (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard Lyon 1).
- Mohamed, J. A., Huang, D. B. (2007). Biofilm formation by enterococci. *Journal of Medical Microbiology*, 56(Pt 12), 1581–1588.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2022). *Medical Microbiology* (10th ed.).

N

- Nagi, M., Chapple, I. L., Sharma, P., Kuehne, S. A., & Hirschfeld, J. (2023). Quorum sensing in oral biofilms : influence on host cells. *Microorganisms*, 11(7), 1688.

Nguyen, D. (2018). Influence de variations de conditions environnementales sur l'évolution des biofilms oraux (Doctoral dissertation, Université de Bordeaux).

O

Olivares, E. (2017). *Évaluation de l'impact des antibiotiques sur la formation de biofilms par P. aeruginosa: place de l'Antibiofilmogramme*. (Doctoral dissertation, Université de Strasbourg).

Oliveira, R., & Cunha, Â. (2010). Biofilm formation and its role in infection and antimicrobial resistance. In : Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* (pp. 734–743). Formatex.

O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar motility plays a role in biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*—a true biofilm. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449-461.

Otto, M. (2008). Staphylococcal biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 207–228 .

Otto, M. (2013). Staphylococcal infections : mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64, 175-188.

P

Piras, S., Arru, A., Mularoni, M., Mura, C., Fadda, P., & Campus, G. (2020). Evaluation of *Candida albicans* biofilm formation on different denture base resins. *Clinical Oral Investigations*, 24(10), 3749-3756. (Même si le focus est sur les résines, l'article pourrait discuter des méthodes d'évaluation de biofilm de *C. albicans*).

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2003). *Microbiology* (5th ed.). New York : McGraw-Hill.

R

Rajasekaran, J. J., Krishnamurthy, H. K., Bosco, J., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., & Bei, K. (2024). Oral microbiome : a review of its impact on oral and systemic health. *Microorganisms*, 12(9), 1797.

Ramage, G., Rajendran, R., Sherry, L., & Williams, C. (2012). Fungal biofilms : an update. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 367(1598), 2656-2670.

Robertson, D., & Smith, A. J. (2009). The microbiology of the acute dental abscess. *Journal of Medical Microbiology*, 58(2), 155–162.

S

Sabrae, A. (2023). Le rôle du pharmacien d'officine dans le traitement et la prise en charge des pathologies bucco-dentaires.

Saigal, S., Bhargava, A., Mehta, V., & Gupta, S. (2011). Drug resistance in *Candida albicans* : Mechanisms and clinical relevance. *International Journal of Microbiology*, 2011, 1–7.

Serino M, Nicolas S, Trabelsi M S, Burcelin R, Blasco-Baque V,. Young microbes for adult obesity. *Pediatr Obes*. Aug 2017, Vol. 12, 4, pp. 28-32.

Sheiham, A., & James, W. P. T. (2015). A new understanding of the relationship between sugars, dental caries and fluoride use : implications for limits on sugars consumption. *Public Health Nutrition*, 17(10), 2176-2184.

Shetty, B., Fazal, I., Khan, S. F., Nambiar, M., Prasad, R., & Raj, A. (2023). Association between cardiovascular diseases and periodontal disease : more than what meets the eye. *Drug Target Insights*, 17, 31.

Shrestha, J., Subedi, S., Shokati, B. & Chaudhary, A. (2018). Predatory Journals : A Threat to Scholarly Publishing. *Journal of Education and Research*, 8(1), 89–101.

Simain-Sato, F., Rompen, E., & Heinen, E. (2010). Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Revue médicale de Liège*, 65.

Singh, R., et al. (2021). « Comparative evaluation of biochemical and molecular methods in identifying clinical *Pseudomonas* isolates. » *Journal of Medical Microbiology*, 70(3), 001261.

Singh, S., Datta, S., Narayanan, K. B., & Rajnish, K. N. (2021). Bacterial exo-polysaccharides in biofilms : role in antimicrobial resistance and treatments. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19, 1-19.

Snyder, L., Champness, W., & Henkin, T. (2021). *Molecular Genetics of Bacteria* (5th ed.). ASM Press.

Socransky S, Haffajee A, Smith C et al. Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 352–362.

Soude, S. (2005). Biofilms bactériens : formation, implications pathogènes et moyens de lutte. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France.

Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179.

Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6(3), 199–210.

T

Thomas, C. (2021). Microbiote oral et obésité : de la signature du microbiote oral dysbiotique chez l'Homme à la causalité chez la souris (Doctoral dissertation, Université Paul Sabatier-Toulouse III).

THOMAS, Charlotte. Microbiote oral et obésité : de la signature du microbiote oral dysbiotique chez l'Homme à la causalité chez la souris. 2021. Thèse de doctorat. Université Paul Sabatier-Toulouse III.

Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2019). *Microbiology : An Introduction* (13th ed.). Pearson.

Tremblay, Y. D., Hathroubi, S., & Jacques, M. (2014). Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 78(2), 110-116

U

Uppuluri, P., Nett, J., & Andes, D. (2009). The Global Burden of *Candida* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 5(9), e1000673.

V

Vézine, L., & Lacroix, G. (2000). Les biofilms bactériens : mécanismes de formation et impact en santé humaine. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2000(323), 27–36.

W

Williams, R. J., & Lewis, M. A. O. (2000). Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*, 89(1), 21–28.

Y

Yaghmoor, W., Ruiz-Torruella, M., Ogata, Y., Natto, Z. S., Finkelman, M., Kawai, T. et Hur, Y. (2024). Effet des bains de bouche préopératoires à base de chlorhexidine, d'huile essentielle et de chlorure de cétalpyridinium sur la contamination bactérienne lors de la chirurgie d'implant dentaire : un essai clinique contrôlé randomisé. *Le Saudi Dental Journal*, 36(3), 492-497.

Youssef, W. B. (2022). Distribution spatio-temporelle de l'O₂ en biofilm bactérien multiespèces (Doctoral dissertation, Sorbonne Université).

Z

Zhang, L., Liang, Y., Wu, M., & Zhang, W. (2022). Oral microbiota : A new frontier in systemic disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 854123.

Zhou, W., Spoto, M., Hardy, A. B., et al. (2021). Rifampicin resistance mechanisms, evolution, and clinical implications. *The Lancet Microbe*, 2(8), e419–e428.

Les Annexes

Annexe 1 : Matériels et milieux utilisés dans l'étude

1. Matériel d'échantillonnage

Matériel	Description
Écouvillons stériles	Utilisés pour le prélèvement des échantillons de la cavité buccale.
Tubes stériles contenant du PBS	Solution tamponnée servant au transport et à la dilution des échantillons.
Gants, masques, blouses	Équipements de protection individuelle pour garantir l'asepsie.
Cotons de transport	Permettent le transport des échantillons à température contrôlée, si nécessaire.

2. Milieux de culture utilisés pour l'isolement bactérien

Milieu	Utilité	Caractéristiques
Chapman (gélose au mannitol salé)	Sélectif pour <i>Staphylococcus</i> spp.	Milieu salé + mannitol. <i>S. aureus</i> fermente le mannitol → colonies jaunes.
BEA (Bile Esculine Agar)	Sélectif pour entérocoques et certains streptocoques	Hydrolyse de l'esculine → coloration noire.
BGS (Brilliant Green Agar)	Sélectif pour <i>Salmonella</i> et autres entérobactéries	Inhibe les bactéries Gram +. Colonies caractéristiques.
Gélose au sang	Milieu enrichi non sélectif	Observation de l'hémolyse (α , β , γ), utile pour les streptocoques oraux.
MacConkey	Sélectif pour entérobactéries Gram -	Différencie lactose + (colonies roses) et lactose - (colonies incolores).

3. Milieux pour l'étude de la formation du biofilm

Milieu	Utilité	Caractéristiques
BHIB (Brain Heart Infusion Broth)	Étude de la formation du biofilm	Milieu liquide riche. Utilisé en microplaque 96 puits avec coloration au cristal violet.
MH (Müller-Hinton)	Antibiogramme	Milieu standardisé utilisé pour tester la sensibilité aux antibiotiques.

4. Appareils et équipements utilisés

Appareil	Fonction / Utilité
Incubateur	Maintien des cultures à 37°C pour favoriser la croissance bactérienne.
Four Pasteur	Stérilisation des instruments par chaleur sèche.
Autoclave	Stérilisation des milieux de culture et matériel à 121°C sous pression.
Hotte à flux laminaire	Travail en conditions stériles pour éviter les contaminations.
Microscope optique	Observation microscopique des bactéries et coloration de Gram.
Spectrophotomètre	Lecture de la densité optique des biofilms colorés au cristal violet.

Annexe 2 : Composition des milieux de culture

Chapman (gélose au mannitol salé)

Ingrédient	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de viande	1 g
Chlorure de sodium	75 g
D-mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

BEA (Bile Esculine Agar)

Ingrédient	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de levure	3 g
Esculine	1 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Oxgall (sels biliaires)	4 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 mL

BGS (Brilliant Green Agar)

Ingrédient	Quantité
Peptone	10 g
Extrait de levure	3 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Rouge neutre	0,03 g
Vert brillant	0,0125 g
Phosphate dihydrogène de sodium	1 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 mL

Gélose au sang (Blood Agar)

Ingrédient	Quantité
Base de gélose nutritive	40 g
Sang défibriné de mouton/cheval	5 à 10 %
Eau distillée	1000 mL

MacConkey

Ingrédient	Quantité
Peptone trypsique	17 g
Extrait de viande	3 g
Lactose	10 g
Sels biliaires	1,5 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,001 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	13,5 g
Eau distillée	1000 mL

BHIB (Brain Heart Infusion Broth)

Ingrédient	Quantité
Infusion de cerveau de porc	200 mL
Infusion de cœur de bœuf	250 mL
Peptone	10 g
Glucose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2,5 g
Eau distillée	compléter à 1000 mL

MH (Müller-Hinton)

Ingrédient	Quantité
Infusion de bœuf	300 mL
Acide caséique hydrolysé	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-
كلية العلوم الطبيعية والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث
أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة):.....شراد حفيظة.....رقم التسجيل

الجامعي:.....202037034106.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم:.....110000977009470002.....والصادرة بتاريخ:

.....2023/10/27

عن.....سيدي علي.....

المسجل بكلية العلوم الطبيعية والحياة/ قسمالبيولوجيا

شعبة البيولوجيا...../ التخصص الميكرو بيولوجيا التطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان.....

Isolement et l'identification des bactéries de la cavité buccale et caractérisation de la formation de
biofilms buccal

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية الم
طلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ:.....2025/06/21.....

إمضاء المعني

HAFI
M

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-
كلية العلوم الطبيعية والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث
أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة): صالح حليلة..... رقم التسجيل

الجامعي:.....202037073193.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم:.....117861244..... والصادرة بتاريخ: 2020/03/19....

عن.....بلدية سيدي امحمد بن علي غليزان.....

المسجل بكلية العلوم الطبيعية والحياة/ قسم العالم البيولوجية
شعبة البيولوجيا..... / التخصص الميكرو بيولوجيا التطبيقية

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

**Isolement et identification des bactéries du microbiote buccal résident et leur
caractérisation pour la formation des biofilms dans la cavité orale**

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ:.....2025/06/19.....

إمضاء المعني

* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.