



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE DE TLEMCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE A L'AGROALIMENTAIRE, AU
BIOMEDICAL ET A L'ENVIRONNEMENT « LAMAABE »

THESE

Présentée par :

Melle HOCEINI Amina

En vue de l'obtention du Diplôme de

Doctorat en Biologie

Option : Maîtrise du Développement Microbien

Thème

Caractérisation de la microflore constitutive du biofilm bucco-dentaire de la plaque
supra-gingivale chez des sujets indemnes de caries dentaires et des sujets cariés

Soutenu le 23.05.2017

Devant le jury :

BENDAHOU M.	Professeur	Président	Université de Tlemcen
BOUZIANE D.	Professeur	Examinatrice	Université d'Oran
OUMOUNA M.	Professeur	Examineur	Université de Médéa
REBIAHI S.A	Maitre de conférences	Examineur	Université de Tlemcen
KHELIL KLOUCHE N.	Professeur	Directrice de thèse	Université de Tlemcen

2016-2017

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

UNIVERSITE DE TLEMCEN

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

**LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE APPLIQUEE A L'AGROALIMENTAIRE,
AU BIOMEDICAL ET A L'ENVIRONNEMENT « LAMAABE »**

THESE

Présentée par :

Melle HOCEINI Amina

En vue de l'obtention du Diplôme de

Doctorat en Biologie

Option : Maîtrise du Développement Microbien

Thème

Caractérisation de la microflore constitutive du biofilm bucco-dentaire de la plaque supra-gingivale chez des sujets indemnes de caries dentaires et des sujets cariés

Dédicace

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

A ma mère, la lumière de ma vie

A mes chers sœurs et frères

A mes beaux frères

A ma belle sœur

A mes adorables nièces et neveux

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

Remerciements

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

Tout d'abord un grand merci à Mme KLOUCHE KHELIL Nihel, professeur à l'université de Tlemcen, pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe de recherches «les Extrémophiles» du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement «LAMAABE», pour m'avoir donnée la chance d'effectuer cette thèse. Merci pour l'encadrement, votre présence et votre disponibilité permanente, pour vos conseils et votre soutien. J'ai l'honneur de vous exprimer ma très profonde reconnaissance et mes sentiments les plus sincères.

Il m'est très agréable de remercier Mr BENDAHOU M., professeur à l'université de Tlemcen, vous qui me faites le grand honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercie profondément Mr OUMOUNA M., doyen de la faculté des sciences à l'université de Médéa, pour avoir accepté d'examiner ce travail, et pour son aide, ses précieux conseils et ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr REBIAHI S.A, maître de conférences à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

J'exprime également mes sincères remerciements à Mme BOUZIANE D., professeur à l'université d'Oran, pour avoir accepté d'examiner et discuter ce travail.

A Mr MOUSSA BOUDJEMAA B., professeur à l'université de Tlemcen et directeur du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement «LAMAABE», un grand merci et j'espère qu'il me soit permis de vous exprimer vivement ma profonde gratitude, mes sentiments très respectueux.

Un grand hommage à Mr BENKALFAT M., Professeur en chirurgie générale, qui nous a accueillie et intégrée dans son laboratoire (Laboratoire de Chirurgie Expérimentale-université de Tlemcen) et a mis à notre disposition tous ses équipements.

Un grand merci à Melle BENYELLES I, Maitre Assistante à l'Université de Tlemcen, et à Mme MEHDID C., Professeur en Odontologie Conservatrice, INESSM Alger, pour leur aide inestimable.

Mes sincères remerciements vont aussi à Dr ZILABDI M et Dr LEFKI A.C. pour leur soutien permanent, leur aide précieuse et surtout de leurs encouragements.

Je ne saurai oublier tous mes collègues du laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement «LAMAABE» avec qui j'ai toujours su entretenir une ambiance chaleureuse et amicale.

Que toutes les personnes qui m'ont aidée de près ou de loin, tout au long de mes études trouvent ici ma profonde reconnaissance et sincères remerciements.

Résumé

Objectifs: L'objectif de cette étude était de comparer les pratiques d'hygiène orale, l'éducation et le statut socio-économique, le régime alimentaire et la mauvaise haleine entre des adultes algériens ayant des dents cariées et d'autres qui sont indemnes de carie dentaire, un autre objectif de cette étude était de déterminer et comparer la composition bactérienne des plaques supra gingivales des groupes mentionnés ci-dessus. L'aptitude de formation du biofilm bucco-dentaire des isolats bactériens a été évaluée.

Méthodes: Les participants ont rempli un questionnaire et ont été examinés cliniquement pour déterminer l'indice CAO (dents cariées, absentes et obturées) selon les critères fixés par l'Organisation Mondiale de la Santé. Des échantillons des plaques supra gingivales ont été recueillis à partir de 50 sujets sans carie dentaire et 50 sujets présentant des lésions carieuses. Les méthodes classiques de culture et d'identification des bactéries aérobies et anaérobies ont été utilisées. Les données ont été analysées en utilisant le test khi deux (χ^2). Les méthodes PMT et RCA ont été utilisées pour étudier le pouvoir des souches à former le biofilm bucco-dentaire.

Résultats: 117 souches bactériennes ont été isolées à partir des plaques supragingivales des sujets indemnes de caries, 76 (64,95%) d'entre eux appartenaient à 9 genres aérobies, et 41 (35,05%) à 9 genres anaérobies ($p < 0,05$). Dans le deuxième groupe, 199 souches ont été isolées, 119 (59,79%) des souches appartenaient à 10 genres aérobies et 80 (40,21%) à 10 genres anaérobies ($p < 0,05$). *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Actinomyces meyeri*, *Lactobacillus acidophilus* et *Eubacterium limosum* ont montré une prévalence significativement élevée dans le groupe des sujets ayant des dents cariées ($p < 0,05$).

Les résultats ont révélé que les adultes présentant des dents cariées ont une forte consommation de sucre (80%). Une fréquence significativement élevée de brossage des dents ($P < 0,000$) et une faible fréquence de mauvaise haleine ($P < 0,000$) et de douleur des dents ($P < 0,000$) ont été trouvés dans le groupe des adultes indemnes de caries. Alors qu'il n'y avait pas d'association entre le niveau socio-économique et le grignotage entre les repas avec la carie dentaire ($p > 0,05$).

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

Conclusion: cette étude confirme l'association de certaines bactéries aciduriques avec la formation de caries, et une association directe de la consommation de sucre et le niveau culturel avec la carie dentaire, en outre, les pratiques d'hygiène buccale minimisent la prévalence de la carie dentaire.

Mots clés: plaque supra gingivale, carie dentaire, la composition bactérienne, les adultes algériens, niveau culturel, le régime alimentaire.

ملخص

الأهداف: كان الهدف من هذه الدراسة مقارنة الممارسات الصحية لنظافة الفم، المستوى التعليمي و الاجتماعي، النظام الغذائي والرائحة الكريهة للفم بين بالغين جزائريين يعانون من تسوس الأسنان و آخرين ذوو اسنان سليمة، كان هدف آخر من هذه الدراسة لتحديد ومقارنة تكوين البكتيريا في لويحات فوق اللثة لمجموعات المذكورة أعلاه وقمنا ايضا بتقييم قدرة البكتيريا الفموية على تكوين البيوفيلما الفموية.

الطرق: قام المشاركون بملء استبيان وتم فحص سريري لتحديد المؤشر الخاص بالأسنان المفقودة والأسنان المسوسة و المصانة وفقا للمعايير التي وضعتها منظمة الصحة العالمية. تم جمع عينات لويحات فوق اللثة من 50 بالغ بأسنان مسوسة و 50 بالغ ذو اسنان سليمة و استخدمت الطرق الميكروبيولوجية الكلاسيكية للتعرف على البكتيريا الهوائية واللاهوائية. وقد تم تحليل البيانات و (MTP) باستخدام الاختبار الاحصائي النوعي. وقد استخدمنا لدراسة قدرة البكتيريا على تكوين البيوفيلما الفموية تقنيتي (RCA)

النتائج: تم عزل 117 سلالات بكتيرية من اللويحات الفوق لثوية للأشخاص السليمين من التسوس، 76 (64.95%) منهم ينتمون إلى 9 أجناس هوائية، و 41 (35.05%) إلى 9 أجناس لاهوائية (>0.05). في المجموعة الثانية، تم عزل 199 سلالات، 119 (59.79%) من السلالات تنتمي إلى 10 اجناس هوائية و 80 (40.21%) إلى 10 اجناس لاهوائية (>0.05) اظهرت البكتيريا المذكورة ادناه معدلات عالية عند الاشخاص ذوو الاسنان المسوسة

Streptococcus mutans, Enterococcus faecium, Aerococcus viridans, Actinomyces meyeri, Lactobacillus acidophilus و Eubacterium limosum

كشفت النتائج ان الأشخاص الذين يعانون من التسوس يتناولون كميات كبيرة من السكر (80%) و اظهرت هذه الدراسة ارتفاع نسبة فرش الاسنان عند الأشخاص ذوو الاسنان السليمة. و نسبة جد ضئيلة لالم الاسنان و رائحة الفم الكريهة عند نفس المجموعة. في حين لم يكن هناك ارتباط بين المستوى الاجتماعي و تناول الطعام بين الوجبات مع التسوس

نتائج الدراسة تؤكد تأثير السكر في تحسين (MTP) بالمقارنة مع تقنية (RCA) في دراسة تشكيل البيوفيلم الفموي . القدرة على تشكيل البيوفيلم بالنسبة للسلالات المعزولة فضلا عن الاعتماد على تقنية

الخلاصة: هذه الدراسة تؤكد ارتباط بعض البكتيريا مع تشكيل تسوس الأسنان، وارتباط مباشر لتناول السكر والمستوى الثقافي مع تسوس الأسنان، و علاوة على ذلك، ممارسات النظافة الصحية الفموية تقلل من انتشار تسوس الأسنان

الكلمات الرئيسية: لوحة فوق اللثة، تسوس، التكوين البكتيريا، بالغين جزائريين، المستوى الثقافي، وتناول الطعام

Abstract

Objectives: The aim of this study was to compare oral hygiene practices, education and social background, food intake and oral malodor between Algerian adults suffering from dental caries in comparison with normal controls, another objective of the study was to determine and compare the bacterial composition of the supragingival plaques from the above-mentioned groups. The strains biofilm formation capacity was also assessed.

Methods: Participants completed a questionnaire and were clinically examined for dental caries using decayed, missing and filled teeth (DMFT) index according to the criteria laid down by the World Health Organization. Supragingival plaque samples were collected from 50 caries-free adults (CF) and 50 caries-active adults (CA). Standard procedures of culture and identification of aerobic and anaerobic bacteria were used. Data were analyzed using Chi-square test. MTP and CRA methods were used to assess the strains biofilm formation capacity.

Results: 117 bacterial strains were isolated from supragingival plaques in caries-free subjects, 76 (64.95 %) of them belonged to 9 aerobic genera, and 41 (35.05%) to 9 anaerobic genera ($p < 0.05$). While in the second group, 199 strains were isolated, 119 (59.79%) of the strains belonged to 10 aerobic genera and 80 (40.21%) to 10 anaerobic bacteria ($p < 0.05$). *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Actinomyces meyeri*, *Lactobacillus acidophilus* and *Eubacterium limosum* showed a significantly higher prevalence in the CA group ($p < 0.05$).

The findings revealed that (CA) group had a high sugar intake (80%). A significantly higher frequency of tooth brushing ($P < 0.000$) and a significantly less self-reported oral malodor ($P < 0.000$) and tooth pain ($P < 0.000$) were found in (CF) group. While, there was no association of socio economic levels and intake of between meal snacks with dental caries ($p > 0.05$).

The results of this study confirm the effect of sucrose in improving the biofilm formation capacity of isolated strains as well as the reliability of the quantitative technique of microtiter plates (PMT) compared to the qualitative method on Red Congo agar (RCA) In the study of the biofilm formation capacity.

Conclusion: this study confirms the association of some aciduric bacteria with caries formation, and a direct association of sugar intake and cultural level with dental caries, furthermore, oral hygiene practices minimises the prevalence of tooth decay.

Key words: supragingival plaque, caries-free, caries-active, bacterial composition, Algerian adults, cultural level, food intake.

Table des matières

- Liste des abréviations
- Liste des figures
- Liste des tableaux

Introduction	1
Chapitre I : Etude bibliographique	
1. Généralités sur la cavité buccale.....	4
1.1. Historique.....	4
1.2. La cavité buccale.....	5
1.3. Le rôle de la cavité buccale.....	6
1.4. Anatomie dentaire.....	6
1.5. Le biofilm buccal.....	8
1.5.1. Les étapes de formation du biofilm.....	8
1.5.1.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)	9
1.5.1.2. Phase d'adhésion réversible	9
1.5.1.3. Phase irréversible.....	10
1.5.1.4. Phase de prolifération.....	10
1.5.1.5. Phase de maturation.....	10
1.5.1.6. 1.5.1.6. Phase de détachement	12
1.6. La plaque dentaire.....	12
1.6.1. Classification des plaques dentaires	13
1.6.1.1. Selon l'habitat	13
-La plaque supragingivale.....	13
-La plaque sous-gingivale.....	14
-Le revêtement de la langue.....	14
1.6.1.2. Selon le pouvoir pathogène.....	14
-Plaque non pathogène.....	14
-Plaque cariogène.....	14
-Plaque parodontopathique	14

1.7. Composition bactérienne de la plaque dentaire.....	15
1.8. L'homéostasie.....	16
2. La carie dentaire	16
2.1. Épidémiologie.....	16
2.2. Définition de la carie dentaire.....	17
2.3. Modèles théoriques.....	17
2.3.1. Théorie de Miller (1980).....	17
2.3.2. Trilogie de Keyes (1960).....	18
2.3.3. La théorie de Newburn(1978).....	19
2.4. Les facteurs de risque.....	20
2.4.1. L'hôte susceptible	20
2.4.1.1. La salive.....	20
2.4.1.1.1. Le rôle de la salive.....	20
2.4.1.1.2. Le débit salivaire.....	20
2.4.1.1.3. Le pouvoir tompon de la salive.....	21
2.4.1.1.4. Les variations salivaires au cours de la vie.....	21
2.4.1.1.5. La déminéralisation et la reminéralisation.....	21
2.4.1.2. La dent.....	21
2.4.2. Les bactéries cariogènes.....	22
2.4.2. 1. Streptocoques.....	24
2.4.2.2. Lactobacilles.....	24
2.4.2.3. Actinomyces	25
2.4.2.4. Autres bactéries	25
2.4.3. Le facteur temps.....	26
2.4.4. Les glucides fermentescibles	27
2.4.5. Les autres facteurs de risque.....	29
2.5. Le moyen d'évaluation de l'état dentaire d'une population: l'indice CAO.....	29
2.7. Les différents outils de diagnostic microbiologique de la plaque dentaire.....	30
2.7.1. Prélèvement et transport.....	30
2.7.1.1. Le prélèvement de la plaque dentaire.....	30
2.7.1.2. Le transport d'échantillon.....	30

2.7.1.1. Le prélèvement de la plaque dentaire.....	30
2.7.1.2. Le transport d'échantillon.....	31
2.7.1.2.1. Conditions de transport.....	31
2.7.1.2.2. Milieux de transport.....	31
-Culturette anaérobie (Becton-Dickinson).....	32
-Portagerm (bioMérieux).....	32
-TGV anaérobie (Biorad).....	32
2.7.1.2.3. Les différences entre les milieux de transport.....	33
2.7.2. Analyse des prélèvements.....	33
2.7.2.1. Méthode classique de culture	33
2.7.2.1. 1. Mise en culture.....	34
2.7.2.1. 1. 1. Milieux de culture	34
2.7.2.1. 1. 2. Les conditions d'incubation.....	34
2.7.2.1. 2. L'identification.....	34
- La sensibilité aux antibiotiques.....	35
2.7.2. 2. Les sondes nucléiques.....	36
2.7.2.3. Le test BANA.....	38
2.7.2.4. Les tests salivaires.....	39
2.8. Les méthodes d'étude de formation du biofilm.....	39
2.8.1. Méthodes des microplaques de titration	40
2.8.2. Méthode de Rouge Congo	40
2.9. Les avantages de formation du biofilm	41
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
1. Matériels.....	42
1.1. Matériels de prélèvement de la plaque supra gingivale	42
1.2. Les milieux de culture.....	42
1.3. Matériels de culture anoxique.....	42
1.4. Matériels d'identification biochimique	42

1.5. Disques d'antibiotiques	43
1.6. Matériels d'étude du biofilm bucco-dentaire.....	43
2. Méthodes	44
2.1. Période et lieu d'étude.....	44
2.2. Type d'étude.....	44
2.3. Récolte des données et éthique	45
2.4. Objectifs de l'étude	45
• Objectif principal.....	45
• Objectif secondaire.....	45
2.5. Population d'étude.....	45
2.5.1. Les critères d'inclusion et d'exclusion	46
2.5.1.1. Les critères d'inclusion	46
2.5.1.2. Les critères d'exclusion	46
2.5.2. Le questionnaire médico-dentaire	46
2.6. Analyse statistique des données des fiches du questionnaire	47
2.6.1. Analyse statistique des paramètres socio-démographiques et économiques.....	48
2.6.2. Analyse statistique des paramètres cliniques	49
2.7. Prélèvement	49
2.7.1. Site et méthode de prélèvement	49
2.7.2. Acheminement des prélèvements	50
2.8. Analyse des prélèvements	50
2.8.1. Examen microscopique des prélèvements	50
2.8.1.1. Etat frais	50
2.8.1.2. Coloration de Gram.....	51
2.8.2. Préparation des dilutions	51
2.8.3. Ensemencement et incubation	51

2.8.4. Culture bactérienne	52
2.8.4.1. Culture des bactéries aérobies	52
2.8.4.2. Culture des bactéries anaérobies	52
2.8.5. Repiquage	52
2.8.6. Deuxième repiquage (subculture).....	53
2.8.7. Identification phénotypique des isolats.....	53
2.8.7.1. Etude microscopique.....	53
2.8.7.2. Etude macroscopique	53
2.8.7.3. L'identification biochimique	54
2.8.7.3.1. Test de catalase	54
2.8.7.3.2. Test d'oxydase	55
2.8.7.3.3. Galleries miniaturisées	55
2.8.7.4. Test de sensibilité des isolats aux antibiotiques.....	55
2.7.7.4.1. Technique.....	56
2.7.7.4.2. Lecture	56
2.9. Analyse statistique des fréquences des isolats bactériens.....	56
2.9.1. Fréquence d'isolement des bactéries aérobies, anaérobie, Gram+ et Gram-	57
2.9. 2. Fréquence d'isolement des espèces bactériennes.....	57
2.9. 3. Fréquence d'isolement des genres bactériens.....	57
2.10. Evaluation de l'aptitude des espèces isolées à former un biofilm	57
2.10.1. La méthode de microplaques de titration.....	57
2.10.1.1. Technique	58
2.10.1.2. Lecture.....	59
2.10.1. 3. Calcul de la valeur seuil de DO minimale et DO maximale.....	59
2.10.2. La méthode du Rouge Congo	59
2.10.2.1. Technique.....	60

2.10.2.2. Lecture	60
-------------------------	----

Chapitre III : Résultats et discussions

1. Résultats de l'analyse statistique des données des fiches du questionnaire.....	61
1.1. Les paramètres socio-démographiques et économique.....	61
1.1.1. Répartition selon le sexe	62
1.1.2. Répartition selon le statut économique.....	63
1.1.3. Répartition selon le niveau d'étude.....	63
1.2. Les paramètres cliniques	64
1.2. 1. Répartition selon la fréquence de consommation des sucres	66
1.2. 2. Répartition selon la fréquence de brossage des dents.....	67
1.2. 3. Répartition selon la douleur ressentie des dents.....	68
1.2. 4. Répartition selon la mauvaise haleine	69
1.2. 5. Répartition selon le grignotage entre les repas.....	69
2. Résultats de l'analyse des prélèvements	70
2.1. Résultats de l'examen microscopique des prélèvements	70
2.1.1. L'état frais des prélèvements.....	71
2.1.2. La coloration de Gram	71
2.2. Résultats de l'identification phénotypique des isolats.....	72
2.2.1. Les bactéries Gram positif isolées et identifiées.....	72
2.2.1.1. Les Cocci Gram positif aérobies et aéro-anaérobies facultatifs.....	72
2.2.1.1.1. Streptococcus.....	73
2.2.1.1.2. Gemella.....	76
2.2.1.1.3. Enterococcus	77
2.2.1.1.4. Aerococcus.....	78
2.2.1.1.5. Lactococcus.....	79

2.2.1.1.6. Staphylococcus.....	80
2.2.1.1.7. Micrococcus.....	81
2.2.1.2. Les bacilles Gram+ anaérobies	81
2.2.1.2.1. Actinomyces.....	82
2.2.1.2.2. Lactobacillus	83
2.2.1.2.3. Bifidobacterium.....	84
2.2.1.2.4. Propionibacterium.....	85
2.2.1.2.5. Eubacterium.....	86
2.2.2. Les bactéries Gram négatif isolées et identifiées.....	87
2.2.2.1. Les bacilles Gram négatif aéro-anaérobies.....	87
2.2.2.1.1. Aeromonas.....	88
2.2.2.1.2. Klebsella.....	88
2.2.2.1.3. Moraxella.....	89
2.2.2.2. Les bacilles Gram négatif anaérobies.....	89
2.2.2.2.1. Prevotella.....	90
2.2.2.2.2.2. Fusobacterium.....	91
2.2.2.2.3. Capnocytophaga.....	92
2.2.2.2.4. Bacteroides.....	93
2.2.2.2.5. Porphyromonas.....	94
3. Nombre des isolats bactériens présents dans les plaques supra-gingivales des deux populations.....	95
4. Résultats de l'analyse statistique des fréquences des isolats.....	99
4.1. Fréquences d'isolement des bactéries aérobies et anaérobies.....	99
4.2. Fréquences d'isolement des bactéries Gram+ et Gram-	101
4.3. Fréquences d'isolement des espèces bactériennes	103
4.4. Fréquences des isolats bactériens associés à la lésion carieuse	110
4.4.1. <i>Enterococcus faecium</i>	110
4.4.2. <i>Actinomyces meyeri</i>	111
4.4.3. <i>Aerococcus viridans</i>	112

4.4.4. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	113
4.4.5. <i>Streptococcus mutans</i>	114
4.4.6. <i>Eubactérium limosum</i>	115
5. Résultats de l'évaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm	116
5.1. Méthode de microplaques de titration à 96 puits	116
5.1.1. Les valeurs seuils pour l'essai de bouillon BHIB sans saccharose.....	116
5.1.2. Les valeurs seuils pour l'essai de bouillon BHIB additionné de 2% Saccharose.....	117
5.1.3. L'étude de formation de biofilm en utilisant le bouillon BHIB seul.....	117
5.1.4. L'étude de formation de biofilm en utilisant le bouillon BHIB additionné de 2% saccharose.....	120
5.2. Méthode du Rouge Congo (RCA).....	124
5.3. Comparaison de l'aptitude de formation de biofilm par les méthodes de microplaque de titration avec et sans addition de sacharose et la méthode du Rouge Congo.....	126
Discussion générale	130
Conclusion générale	136
Références bibliographiques	139
Annexes	

Liste des abréviations

LPS: Lipopolysaccharides

BHIB: Bouillon coeur cerveau (Brain Heart Infusion Broth)

EPS: Substance polymérique extracellulaire (Extra-Polymeric Substance)

UFC: Unité Formant Colonie

PAE: Pellicule Acquise Exogène

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

PCR: Polymerase Chain Reaction

Strep: Streptocoques

Sm : Streptocoques mutans

Staph: Staphylocoques

NE: Non Entérobactéries

TGV : Transport des Germes Vivants

DO: Densité Optique

VA: Vancomycine

KAN: Kanamycine

COL: Colistine

MTZ: Métronidazole

AMX: Amoxicilline

AMC: Amoxicilline associée à l'acide clavulanique

NC : population indemne de carie

C : population ayant des dents cariées

PMT: Plaque de Micro-Titration

RCA: Rouge Congo Agar

NPB: Non Productrice de Biofilm

MPB: Modérément Productrice de Biofilm

FPB: Fortement Productrice de Biofilm

Liste des Figures

Figure 1. L'organe dentaire : Coupe schématique d'une molaire inférieure.....	7
Figure 2. Représentation schématique de la formation d'un biofilm.....	9
Figure 3. Représentation de la coagrégation bactérienne dans la plaque dentaire humaine.....	12
Figure 4. La trilogie de Keyes.....	19
Figure 5. Trilogie modifiée de Keyes.....	19
Figure 6. le test Vivadent™ : test de risque carieux.....	39
Figure 7. les fréquences de consommation de sucre pour les deux populations.....	66
Figure 8. les fréquence de brossage des dents pour les deux populations.....	67
Figure 9. les fréquences des douleurs ressenties des dents pour les deux populations.....	68
Figure 10. les fréquences de la mauvaise haleine chez les deux populations.....	69
Figure 11. les fréquences de grignotage entre les repas chez les deux populations.....	70
Figure 12. Photo de la coloration de Gram d'un prélèvement supra-gingival chez un sujet indemne de carie dentaire.....	71
Figure 13. Photo de la coloration de Gram d'un prélèvement supra-gingival chez un sujet présentant des dents cariées.....	72
Figure 14. a. Pourcentages de bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supragingivales des sujets indemnes de caries dentaires.....	100
Figure 14.b. Pourcentages de bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supragingivales des sujets ayant des dents cariées.....	100
Figure 15.a. Pourcentages des bactéries Gram+ et Gram- dans les plaques supragingivales des sujets indemnes de caries dentaires	102
Figure 15.b. Pourcentages des bactéries Gram+ et Gram- dans les plaques supragingivales des sujets présentant des lésions carieuses	102
Figure 16. Fréquences d'isolement d' <i>Enterococcus faecium</i> chez les deux populations.....	110

Figure 17. Fréquences d'isolement d' <i>Actinomyces meyeri</i> chez les deux populations.....	111
Figure 18. Fréquences d'isolement d' <i>Aerococcus viridans</i> chez les deux populations.....	112
Figure 19. Fréquences d'isolement de <i>Lactobacillus acidophilus</i> chez les deux populations.....	113
Figure 20. Fréquences d'isolement de <i>Streptococcus mutans</i> chez les deux populations.....	114
Figure 21. Fréquences d'isolement d' <i>Eubacterium limosum</i> chez les deux populations.....	115
Figure 22. Pouvoir de formation de biofilm pour l'essai de BHIB seul.....	118
Figure 23. Pouvoir de formation de biofilm pour l'essai de BHIB additionné de 2% de saccharose.....	123

Liste des Tableau

Tableau 1. les bactéries de la flore présente dans les infections carieuses.....	26
Tableau 2. Fréquences des paramètres sociodémographiques et économiques (%) chez les adultes sans et avec dents cariées	61
Tableau 3. Fréquences des paramètres cliniques (%) chez les adultes sans et avec dents cariées	64
Tableau 4. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des streptocoques	74
Tableau 5. Résultats de la sensibilité des Streptocoques aux antibiotiques	74
Tableau 6. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des espèces du genre Gemella	76
Tableau 7. Résultats de la sensibilité de Gemella aux antibiotiques	76
Tableau 8. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) d' <i>Enterococcus faecium</i>	77
Tableau 9. Résultats de la sensibilité d' <i>Enterococcus faecium</i> aux antibiotiques	77
Tableau 10. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) d' <i>Aerococcus viridans</i>	78
Tableau 11. Résultats de la sensibilité d' <i>Aerococcus viridans</i> aux antibiotiques	78
Tableau 12. Résultats des tests biochimiques (API20 Strep) de <i>Lactococcus lactis ssp Cremoris</i> .79	
Tableau 13. Résultats de la sensibilité de <i>Lactococcus lactis ssp.</i> aux antibiotiques	80
Tableau 14. Résultats des tests biochimiques (Api 20 Staph) des Staphylococcus	80
Tableau 15. Résultats des tests biochimiques (Api 20 Staph) de <i>Micrococcus sp.</i>	81
Tableau 16. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) des Actinomyces	82
Tableau 17. Résultats de la sensibilité des Actinomyces aux antibiotiques	82
Tableau 18. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	83
Tableau 19. Résultats de la sensibilité de <i>Lactobacillus acidophilus</i> aux antibiotiques.....	84
Tableau 20. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de <i>Bifidobacterium spp.</i>	84
Tableau 21. Résultats de la sensibilité de <i>Bifidobacterium spp.</i> aux antibiotiques.....	85
Tableau 22. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de <i>Propionibacterium propionicum</i>	86
Tableau 23. Résultats de la sensibilité de <i>Propionibacterium propionicum</i> aux antibiotiques	86

Tableau 24. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) d' <i>Eubacterium limosum</i>	87
Tableau 25. Résultats de la sensibilité d' <i>Eubacterium limosum</i> aux antibiotiques.....	87
Tableau 26. Résultats des tests biochimiques (Api 20 E) d' <i>Aeromonas hydrophila</i>	88
Tableau 27. Résultats des tests biochimiques (Api 20 E) de <i>Klebsella pneumoniae</i>	88
Tableau 28. Résultats des tests biochimiques (API 20 NE) de <i>Moraxella sp.</i>	89
Tableau 29. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Prevotella sp.</i>	90
Tableau 30. Résultats de la sensibilité de <i>Prevotella sp.</i> aux antibiotiques	90
Tableau 31. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Fusobacterium mortiformum</i>	91
Tableau 32. Résultats de la sensibilité de <i>Fusobacterium mortiformum</i> aux antibiotiques	91
Tableau 33. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Capnocytophaga sp.</i>	91
Tableau 34. Résultats de la sensibilité de <i>Capnocytophaga sp.</i> aux antibiotiques	92
Tableau 35. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Bacteroides sp.</i>	93
Tableau 36. Résultats de la sensibilité de <i>Bacteroides sp.</i> aux antibiotiques	93
Tableau 37. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de <i>Porphyromonas Asaccharolytica</i>	94
Tableau 38. Résultats de la sensibilité de <i>Porphyromonas asaccharolytica</i> aux antibiotiques	94
Tableau 39. Nombres des espèces bactériennes isolées à partir des plaques supra – gingivales des sujets présentent des dents cariées (C) et des sujets indemnes de carie dentaire (NC).....	95
Tableau 40. Fréquences des bactéries aérobies et anaérobies (%) dans les plaques supra-gingivales des sujets sans et avec caries dentaires.....	101
Tableau 41. Fréquences des bactéries Gram+ et Gram- (%) dans les plaques supra- gingivales des sujets sans et avec caries dentaires.....	103
Tableau 42. Les fréquences (%) des espèces bactériennes isolées à partir des plaques supra-gingivales des individus présentant des dents cariées (C) et d'autres indemnes de carie dentaire (NC).....	104
Tableau 43. Valeurs de DO mesurées après coloration au cristal violet (essai BHIB seul)	118
Tableau 44. Valeurs de DO mesurées après coloration au cristal violet (essai BHIB +2% saccharose) ..	121

Tableau 45. Résultats de la production de biofilm par la méthode du Rouge Congo	124
Tableau 46. Résultats de l'aptitude de formation de biofilm des souches isolées par la méthode de microplaque de titration (MPT) avec et sans addition de saccharose et la méthode du Rouge Congo	126
Tableau 47. Résultats de nombres de souches formatrices ou non de biofilm pour les deux techniques MPT et RCA.....	128

INTRODUCTION:

Le corps humain est l'hôte d'un grand nombre de micro-organismes (**Sansonetti, 2008 ; Diaz, 2012**). Ces micro-organismes peuvent adopter deux modes de vie, soit à l'état planctonique dans lequel les micro-organismes sont isolés, soit attachés à une surface. Et souvent, elles se regroupent en un consortium de microbes appelé biofilm qui adhère à un support favorable, interagit, et produit la matrice extracellulaire (**Monroe, 2007**).

Le biofilm microbien a un effet important sur la santé humaine, en effet, plus de 60% des infections rencontrées chez l'homme sont causées par des biofilms (**Li et Yu-mei, 2011**). Le biofilm le plus accessible se trouve dans la cavité buccale et il est appelé plaque dentaire (**Zijng et al., 2012; Petersilka, 2000**).

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

La formation de la plaque dentaire chez un individu sain implique un model ordonné de colonisation par une gamme de bactéries, et une fois l'équilibre dynamique est établi, la composition de la microflore résidente de chaque site reste relativement stable au fil du temps (**Marsh, 2003**).

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

La carie dentaire est l'une des maladies infectieuses les plus répandues chez l'homme. Elle s'agit d'une maladie multifactorielle qui se caractérise par une déminéralisation acide de l'émail de la dent. Les acides organiques produits par les bactéries cariogènes, dont **STREPTOCOCCUS MUTANS** et **STREPTOCOCCUS SOBRINUS**, à la suite de la fermentation des sucres de l'alimentation (principalement le sucrose), réduisent le pH des biofilms à des niveaux inférieurs à 5,5, une condition favorable à la dissolution de l'émail de la dent (**Marsh, 2004**).

Plusieurs méthodes de diagnostique bactériologique sont utilisées, elles sont classées en deux catégories : les méthodes par culture et les méthodes moléculaires. La méthode de référence

est la technique de la culture bactérienne qui permet l'identification des bactéries pathogènes et la réalisation d'un test de sensibilité des bactéries aux antibiotiques (**Sixou, 2003**).

Le document est constitué de 4 grandes parties chapeauté par une synthèse bibliographique qui rassemble plusieurs données sur la cavité buccale et la composition bactérienne de la plaque dentaire supragingivale et sous gingivale. Aussi, une définition de la carie dentaire, la relation entre cette dernière et les différents facteurs de risque et les différents outils de diagnostic microbiologique de la plaque dentaire.

Dans une approche visant la compréhension globale de la présence du biofilm dans la plaque supragingivale, de mettre en évidence les bactéries cariogènes et les paramètres socio-démographiques, économiques et cliniques liés au processus carieux, et d'évaluer l'aptitude de formation de biofilm des bactéries isolées, nous avons adopté la démarche expérimentale suivante :

- Etude de la biodiversité bactérienne du biofilm supra-gingival pour les deux populations par l'identification phénotypique des souches bactériennes jusqu'à l'espèce en utilisant des cultures anoxiques, des tests biochimiques (**galeries API**), et le test de sensibilité aux antibiotiques.
- Etude de l'impact des paramètres du questionnaire (les paramètres socio-démographiques et économiques, les habitudes alimentaires et les pratiques d'hygiène) sur la prévalence de la carie dentaire par le biais du test khi deux réalisé à l'aide du **logiciel SPSS, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)**. Un paramètre est considéré comme facteur favorisant le processus carieux s'il ya une différence significative entre les fréquences de ce dernier chez les sujets ayant des dents cariées et ceux qui sont indemnes de caries.
- Estimation des variations de pourcentages et/ou des espèces bactériennes en cas d'une atteinte de carie dentaire en utilisant le test khi deux réalisé à l'aide du **logiciel SPSS, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)**. Une espèce bactérienne est considérée cariogènes lorsqu'il existe une différence significative entre les fréquences de cette espèce dans les plaques supra-gingivales des sujets ayant des dents cariées et ceux qui sont indemnes de caries.
- Evaluation de l'aptitude des souches bactériennes isolées à former un biofilm par deux méthodes : la méthode des microplaques de titration (MPT) et la méthode du Rouge Congo (RCA). L'aptitude de formation de biofilm par la méthode de microplaque de

Introduction

titration a été testée en présence et en absence de saccharose pour estimer l'influence de ce sucre sur la capacité de formation de biofilm des isolats bactériens.

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

Ce travail s'achève par une conclusion générale qui permettra de tirer quelques perspectives de prolongement à ce travail, Les recherches futures devraient se concentrer sur la structure ainsi que le comportement des communautés bactériennes de la plaque dentaire. Il sera également important d'établir la relation entre la microflore buccale et les pathologies bucco-dentaires et avec d'autres maladies, comme les maladies cardiovasculaires, certains types de cancer, et les infections pulmonaires.

En conclusion, les résultats de la présente étude devrait donc être pris en compte dans la stratégie de traitement de la carie chez les patients adultes.

1. Généralités sur la cavité buccale :

1.1. Historique:

« Il y a plus "d'animaux" qui vivent dans les dépôts qui s'accumulent sur les dents de chacun qu'il n'y a d'êtres humains dans un royaume entier, en particulier chez ceux qui ne se lavent jamais les dents» Telle était la conclusion qu'**Antoni van Leeuwenhoek**, drapier hollandais, avait remise à la prestigieuse Royal Society dans la désormais célèbre lettre du 17 septembre 1683. L'homme était curieux de tout et faisait défiler sous son microscope rudimentaire autant de matières et substances qu'il pouvait embrasser. Près de 300 lettres ont ainsi été adressées à la Royal Society. Après avoir observé sa propre plaque dentaire, ce pionnier de l'observation des bactéries, qu'il appelait les « animalcules », partit gratter les dents de sa seconde femme et de sa fille, d'un enfant qui passait par là, de nouveau de sa propre plaque dentaire après 3 jours sans brossage et, enfin, sur un homme âgé qui n'avait, de l'avis de l'auteur, probablement jamais brossé ses dents. Les croquis qu'il réalisa montraient déjà la diversité des espèces bactériennes tant en termes de morphologie que de capacité à se mouvoir plus ou moins rapidement (**Ford, 1986**).

Ce n'est qu'en 1965, après que quelques études épidémiologiques eurent montré une relation entre certaines maladies parodontales et la présence de plaque dentaire, que l'équipe de **Löe** observe expérimentalement une corrélation évidente entre les bactéries et l'inflammation gingivale chez l'homme (**Löe et al., 1965**). Les bactéries officiellement associées à la gingivite ou à certaines formes de parodontites sont de forme ronde (cocci), de bâtonnets, de filaments, de tire-bouchon (spirochètes) et montrent une capacité à se mouvoir par reptation ou à l'aide de flagelle. Il aura fallu attendre 282 années, pour que la cause bactérienne soit enfin corrélée aux symptômes de pathologies invalidantes qui conduisaient nos ancêtres à se déplacer la peur au ventre sur la place du village pour se faire littéralement arracher l'organe dentaire malade avec une tenaille (**Duffau et Baehni, 2007**).

Dès lors, la technologie se met au service de la science. Grâce aux travaux de **Listgarten**, la complexité de la plaque bactérienne se révèle quelque peu. Les observations au microscope électronique à transmission montrent une agrégation organisée de centaines de microorganismes qui varie autant en quantité qu'en diversité selon la maturation des dépôts (**Listgarten et al., 1975**) et la forme clinique de la parodontite (**Listgarten, 1976**).

Une organisation spatiale commence à être décrite avec notamment, en périphérie des dépôts recueillis, des combinaisons spectaculaires de filaments et cocci ou de filaments et bâtonnets en forme d'épis de maïs. Les techniques de culture permettent alors d'offrir des noms à certaines de ces bactéries. De grandes familles se dessinent. Les bactéries à Gram⁺ d'un côté, les Gram⁻ de l'autre. Les bactéries anaérobies contre les aérobies, mais aussi les anaérobies facultatives (qui supportent la présence d'O₂), les capnophiles (culture favorisée par une atmosphère enrichie en CO₂ de 5 à 10 %). Le choix du milieu de culture permet également de discriminer certaines espèces. On obtient alors des descriptions de grandes familles, tels les bacilles Gram⁻, facultatifs, motiles ou cocci Gram⁺, anaérobies, ...etc (**Mouton et Robert, 1994**).

Par la suite, les techniques sérologiques et d'immunofluorescence ont permis de préciser la taxonomie. Les sondes ADN, ARN, puis les techniques de PCR (qui multiplient une séquence oligonucléotidique spécifique) ont mené ensuite à l'identification précise de nombreuses espèces. Avec le perfectionnement des techniques, quelques noms ont été modifiés.

Plus que la taxonomie, la connaissance du génome permet de poser un nom sur la majorité des espèces bactériennes en mesure de coloniser la cavité buccale. Ainsi, **Paster** identifie sur 31 sujets, avec des atteintes parodontales diverses, 347 espèces bactériennes au sein de la plaque sous-gingivale. Cette étude évalue également à 68 le nombre d'espèces de la plaque sous-gingivale non identifiées et à environ 500 le nombre d'espèces capables de coloniser la cavité buccale (**Paster et al., 2001**).

1.2. La cavité buccale

La cavité buccale est l'entrée du tube digestif. Le tube digestif est anatomiquement continu et abrite environ 1×10^{14} micro-organismes, ce qui est plus que les quelque 6×10^{13} cellules qui constituent le corps humain tout entier. Sur les différents sites du corps, la cavité orale est l'une des plus densément peuplées et plus de 500 espèces de micro-organismes ont été isolés à partir de la cavité buccale en utilisant des méthodes de biologie moléculaire récemment développées. Ces micro-organismes colonisent les surfaces orales où ils forment un consortium microbien appelé plaque dentaire ou biofilm oral (**Takahashi, 2005**).

1.3. Le rôle de la cavité buccale

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

1.4. Anatomie dentaire

Chaque dent (ou odonte) possède deux parties anatomiques principales : la partie coronaire, visible et la partie radiculaire implantée dans la cavité osseuse de l'alvéole (Cavézian et al., 2006). La zone de jonction entre la couronne et la racine est représentée par le collet (Cavézian et al., 2006 ; Lautrou, 1998 ; Woelfel et Scheid, 2007) (Voir Figure 1). La dent est constituée de trois tissus minéralisés : l'émail, la dentine et le ciment et d'un tissu conjonctif : la pulpe dentaire composée notamment de nerfs et de vaisseaux sanguins qui acheminent les éléments nourriciers vers la dent par l'intermédiaire de l'apex radiculaire. La majeure partie de la dent est formée par la dentine, recouverte, au niveau de la couronne, par l'émail et, au niveau de la racine, par une fine couche de ciment (Cavézian et al., 2006 ; Lautrou, 1998). La jonction entre l'émail et le ciment ou jonction amélo-cémentaire est représentée par le collet anatomique de la dent. Ce dernier diffère du collet physiologique qui est une zone d'insertion de la gencive et dont le niveau se modifie au cours du temps (Cavézian et al., 2006). Les structures de soutien de la dent ou parodonte comprennent l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire, la gencive ou muqueuse gingivale et le ciment (Lautrou, 1998). L'os alvéolaire, qui est un os spongieux, soit histologiquement indissociable de l'os maxillaire, son existence est tributaire de la présence des dents (Cavézian et al., 2006 ; Piette et Goldberg, 2001). La cavité osseuse de l'alvéole est articulée à la partie radiculaire par l'intermédiaire du ligament alvéolo-dentaire qui constitue le desmodonte (Cavézian et al., 2006 ; Lautrou, 1998 ; Woelfel et Scheid, 2007) (Voir Figure 1).

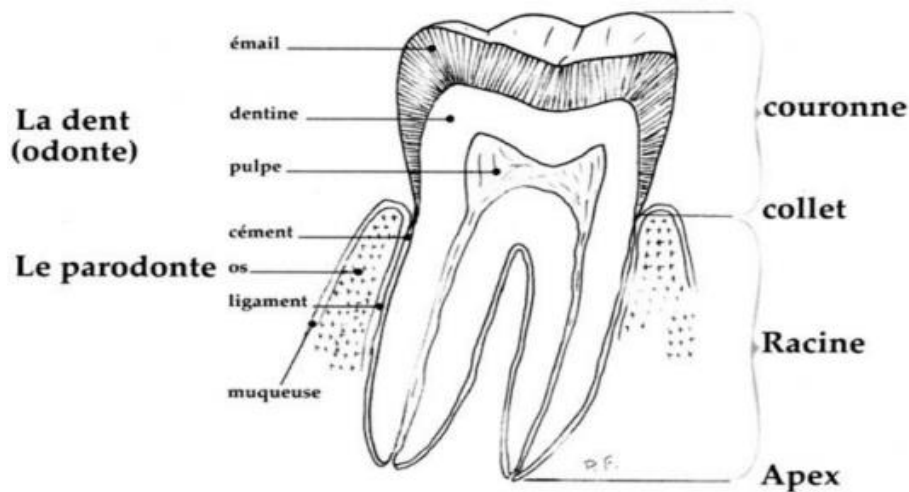


Figure 1. L'organe dentaire : Coupe schématique d'une molaire inférieure (Fronty *et al.*, 2005)

La couronne est scindée en trois parties à parts égales : le tiers incisif ou occlusal, le tiers moyen et le tiers cervical, plus proche du collet. La racine se compose également de trois parties en proportions égales : le tiers supérieur ou cervical qui est proche de la jonction coronoradiculaire, le tiers moyen et le tiers apical (Bass, 2005 ; Beauthier, 2007). Les dents peuvent être mono ou pluriradiculées. Le point de jonction entre les deux racines s'appelle l'embrasure interradiculaire ou furcation (Beauthier, 2007 ; Cavézian *et al.*, 2006 ; Piette et Goldberg, 2001).

Topographiquement, une dent présente cinq faces (Fronty *et al.*, 2005) :

- la face mésiale en regard du point inter-incisif médian,
- la face distale, opposée à la face mésiale,
- la face vestibulaire orientée vers l'extérieur, en regard de la muqueuse jugale,
- la face linguale orientée vers l'intérieur,
- la face occlusale ou triturante des prémolaires et molaires, le bord libre des incisives et la pointe canine, représentant la partie disposée en vis-à-vis des dents antagonistes. Les faces proximales sont les faces mésiale et distale (Fronty *et al.*, 2005).

1.5. Le biofilm buccal

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

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

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

1.5.1. Les étapes de formation du biofilm

La formation de la plaque dentaire peut se décrire schématiquement selon une séquence d'évènements : l'adhésion des bactéries pionnières, la prolifération des bactéries buccales, la formation des microcolonies et le détachement **(Figure 2) (Hojo et al., 2009)**. Cependant, le biofilm dentaire est en constant remaniement. Il s'agit d'un processus dynamique dans lequel l'adhésion, la croissance, l'élimination et le rattachement sont continus **(Bouchard, 2015)**.

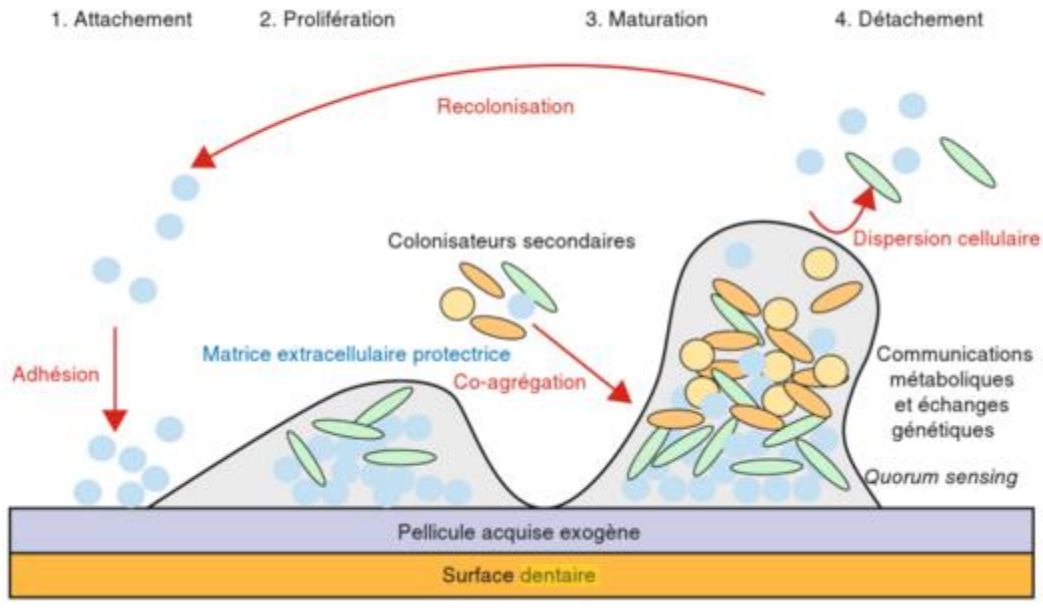


Figure 2. Représentation schématique de la formation d'un biofilm (Socransky *et al.*, 1998).

1.5.1. 1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

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

1.5.1.2. Phase d'adhésion réversible

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

1.5.1.3. Phase d'adhésion irréversible

L'adhérence devient irréversible lorsque la liaison se fait par des interactions de plus courtes distances (liaison ioniques, covalentes ou de ponts hydrogènes) et, surtout, par la reconnaissance de molécules spécifiques. Différents motifs protéiques de la pellicule sont reconnus spécifiquement par les adhésines d'un nombre restreint de bactéries. Parmi ces colonisateurs précoces, également appelés bactéries pionnières, figurent principalement des cocci à Gram positif et des bâtonnets à Gram positif : *Streptococcus sanguis*, *gordonii*, *oralis* et *mitis*, *Actinomyces naeslundii* (**Li et al., 2004**).

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

1.5.1.4. Phase de prolifération :

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

1.5.1.5. Phase de maturation :

Les bactéries pionnières vont ensuite permettre l'agrégation de nouvelles bactéries qui n'étaient par capables de se fixer directement à la PAE. Ces conglomerats bactériens

s'organisent en microcolonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm dentaire.

Les colonisateurs secondaires ou tardifs sont essentiellement à Gram négatif : *Fusobacterium sp.*, *Haemophilus sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Veillonella sp.*, et *Treponema sp.* leur recrutement repose sur les propriétés de co-adhérence bactérienne, c'est-à-dire la capacité d'une bactérie libre de se lier à une bactérie fixée (**Bouchard, 2015**) (**Figure 3**).

Il fait intervenir des interactions de type ligand-récepteur (protéines de surface-adhésines). Chaque souche bactérienne présente une spécificité de partenaires. Par exemple, certains streptocoques sont capables de co-agréger avec certains veillonelles, tandis que d'autres streptocoques en sont incapables. *F.nucleatum* peut, quant à lui, se lier à de multiples espèces de sorte qu'il joue le rôle de pont entre les premières bactéries colonisatrices et les colonisateurs tardifs. L'arrivée de nouvelles espèces bactériennes est favorisée par le micro-environnement créé par le métabolisme des bactéries pionnières. Progressivement, le taux d'oxygène du milieu diminue, permettant le développement des bactéries anaérobies. Au fur et à mesure de sa maturation, le biofilm bactérien voit sa composante cellulaire se modifier. La plaque dentaire peut contenir 10^9 bactéries par mg et recenser plus de 500 taxons différents. Le taux de croissance des bactéries durant la phase de maturation est plus lent que pendant la phase de colonisation de la PAE. Après 2 à 3 semaines, il existe un degré de stabilité entre les différents types d'espèces, en dépit des contraintes environnementales telles que le flux salivaire ou les défenses de l'hôte. Cette stabilité ou homéostasie microbienne est le résultat des nombreuses interactions synergiques ou compétitives entre les bactéries (**Bouchard, 2015**) (**Figure 3**).

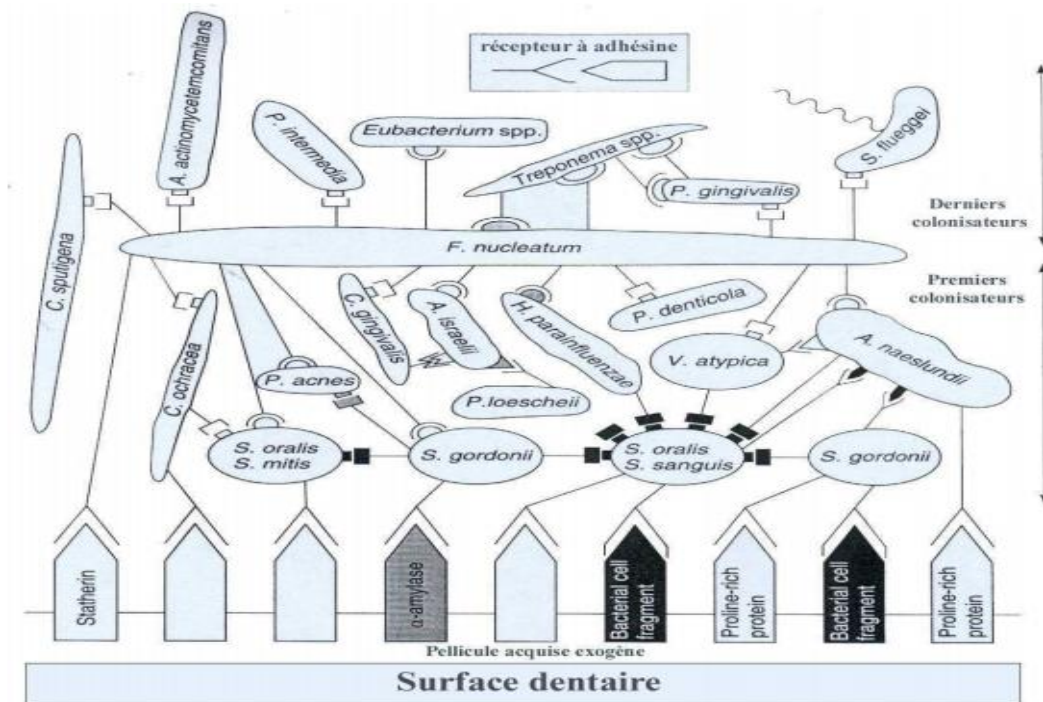


Figure 3. Représentation de la coagrégation bactérienne dans la plaque dentaire humaine : Les colonisateurs précoces se lient à des récepteurs présents dans la pellicule acquise à la surface dentaire. Par la suite, d'autres micro-organismes peuvent s'agréger à ce lit bactérien (Marsh et al., 1999).

1.5.1.6. Phase de détachement :

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

1.6. La plaque dentaire:

La plaque dentaire est une accumulation hétérogène, adhérente à la surface des dents ou située dans l'espace gingivo-dentaire, composée d'une communauté microbienne riche en bactéries

aérobies et anaérobies, enrobées dans une matrice intercellulaire de polymères d'origine bactérienne et salivaire (Mouton et Robert, 1994).

1.6.1. Classification des plaques dentaires :

1.6.1.1. Selon l'habitat :

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

- La plaque supragingivale

La plaque supra-gingivale commence à se former en quelques minutes après le brossage des dents. Les bactéries pionnières commencent le processus de colonisation et sont bientôt rejoints par d'autres espèces bactériennes et de levures (Trisha, 2011)

Les micro-organismes saccharolytiques présents dans les sites supragingivales fermentent les glucides principalement en acide lactique, et créent un environnement acide temporaire. Les changements des facteurs environnementaux peuvent inciter le développement de réponses adaptatives des micro-organismes individuels aux nouvelles conditions environnementales et d'introduire des micro-organismes pathogènes dans la communauté microbienne. Les **Streptocoques** non-mutans et les **Actinomyces** sont prédominants dans l'écosystème supragingival, ils causent l'acidification de milieu, entraînant alors la déminéralisation de la surface dentaire et l'introduction de plusieurs micro-organismes cariogènes comme *Streptococcus mutans* (Takahashi, 2005).

- La plaque sous-gingivale:

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

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

- Le revêtement de la langue :

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

1.6.1.2. Selon le pouvoir pathogène :

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

- **Plaque non pathogène :** compatible avec un état satisfaisant de santé dentaire et parodontale. Cette plaque n'entraîne aucune pathologie. Elle comprend essentiellement des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Streptococcus* et *Actinomyces*.

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

- **Plaque parodontopathique :** qui se développe dans l'espace gingivo-dentaire. Son contenu bactérien évolue progressivement d'une flore aéro-anaérobie facultative, composée de cocci à Gram positif vers une flore anaérobie stricte à Gram négatif.

Cette flore est à l'origine de nombreuses maladies parodontales telles que les gingivites et les parodontites.

1.7. Composition bactérienne de la plaque dentaire

De nouvelles techniques comme l'analyse de la séquence nucléotidique du gène de la sous-unité 16S des ARN ribosomiaux ont permis d'identifier de nouvelles bactéries incapables de survivre avec les moyens de culture actuels. Ces bactéries représenteraient environ 50% de la totalité de la population bactérienne (**Jenkinson et Lamont, 2005**). Ces techniques ont permis de montrer que la flore sous-gingivale était très diversifiée, que la composition des plaques supra-gingivale et sous-gingivale était différente (**Marsh, 2005**). De même, la composition de la plaque dentaire varie en fonction la pathologie (**Socransky et Haffajee, 2005**).

La plaque dentaire est constituée de colonisateurs précoces représentés à 60% par des *Streptococcus*. Le reste est constitué par des *Actinomyces*, des *Veillonella* et des *Neisseria* (**Jenkinson et Lamont, 2005**). Cette première adhésion implique la liaison entre des composants de la salive adsorbés à la surface de la cavité buccale et les bactéries. Ces composants qui varient selon la composition de la surface (dent ou gencive) déterminent la composition du biofilm. La bactérie pionnière dépend donc de la nature des composants qui sont adsorbés à la surface de la dent (**Socransky et Haffajee, 2005**). Or, la structure de la plaque est elle-même dépendante de la bactérie pionnière car les associations entre les premières colonisatrices et les autres sont spécifiques. Ainsi, les bactéries du « complexe rouge » comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Treponema denticola*, indicateurs cliniques des maladies parodontales sont rarement détectées en absence de bactéries d'autres complexes comme le complexe orange (*Fusobacterium, Prevotella*) (**Marsh, 2005**).

La composition de la plaque dentaire évolue avec l'état pathologique de la gencive (**Socransky et Haffajee, 2005**). Cela montre qu'avec la progression de la maladie, on observe une diminution du pourcentage des bactéries à Gram positif tels que les *Streptococcus* et *Actinomyces* au profit de bactéries à Gram négatif et plus particulièrement de bâtonnets à Gram négatif (**Lindhe, 1986**).

1.8. L'homéostasie

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

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

2. La carie dentaire

2.1. Épidémiologie

La carie dentaire est la maladie la plus courante dans le monde, elle touche plus de 95% de la population mondiale (**Sixou et al., 2004**) mais il existe de fortes disparités entre les pays. Selon l'OMS, 60 à 90% des enfants scolarisés dans le monde et près de 100% des adultes ont des caries qui entraînent souvent des douleurs et une sensation de gêne. En dépit de l'amélioration de la situation buccodentaire dans les pays industrialisés, il existe de grandes disparités dans leur population. Ainsi, il est admis que 20% de la population regroupe 80% des lésions (**Lasfargues et Colon, 2009**). La maladie carieuse se concentre sur des sujets à risque. Si les lésions des surfaces lisses vestibulaires disparaissent de nos jours, les lésions des surfaces proximales et des puits et sillons restent fréquentes (**Lasfargues et Colon, 2009**). **Pitts, en 2001**, met en avant la sous-estimation de l'état carieux réel, les besoins de prévention et la nécessité d'effectuer un diagnostic de qualité à travers sa métaphore de l'Iceberg. En effet, pour cet auteur, les enquêtes épidémiologiques ne reflètent pas la réalité

des « caries cachées » car l'examen épidémiologique conventionnel pratiqué de façon générale sans radiographie entraîne des retards de diagnostic (Pitts, 2001). L'épidémiologie établit clairement que les dentistes devraient de plus en plus s'orienter vers des mesures de traitements préventifs et non opératoires (Lasfargues et Colon, 2009).

2.2. Définition de la carie dentaire

La carie dentaire est classée par les experts de l'OMS au 3ème rang des fléaux mondiaux, immédiatement après les affections cancéreuses et les maladies cardio-vasculaires.

Étymologiquement, le mot carie provient du latin caries, qui signifie pourriture, mais la carie dentaire n'est pas une simple lésion dégradant les tissus minéralisés de la dent mais bien une maladie d'origine infectieuse (Hess, 1970).

La carie dentaire est une maladie infectieuse, transmissible post-éruptives des tissus durs de la dent (émail, dentine, cément) (Axelsson, 2000). Elle est d'origine multifactorielle initiée et influencée par de nombreux facteurs (Selwitz et al., 2007).

La carie se forme, si la phase d'acidification-déminéralisation est plus fréquente que la phase d'alcalinisation-reminéralisation (Marquis, 1995), elle peut aller d'une simple perte de minéraux non détectable à l'œil nu, à une destruction complète de la dent (Fejerskov et Kidd., 2003). Elle est aussi associée à des bactéries orales à Gram-positif, dont le membre le plus éminent est *Streptococcus mutans* (Rocas et al., 2001).

2.3. Modèles théoriques

2.3.1. Théorie de Miller (1980)

En 1980, Miller décrit, le premier, la carie comme l'action d'acide organique sur le phosphate de calcium de la dent. Il a montré que l'incubation d'une dent avec de la salive et des carbohydrates est à l'origine de produits acides qui dissolvent la partie minéralisée de la dent (Birked, 1989).

La théorie acide de Miller repose sur une série de faits :

Le pH de la plaque peut descendre à 5,5 pour des périodes de plusieurs heures, à la suite de la production d'acides organiques par les bactéries, La mesure du pH au contact ou à l'intérieur d'une lésion carieuse est inférieure à celui des tissus périphériques (**Birked, 1989**).

Il y a une corrélation étroite entre l'incidence des caries et la présence de *S. mutans* et de lactobacilles (bactéries capables de produire des acides organiques par fermentation des sucres) (**Birked, 1989**).

2.3.2. Trilogie de Keyes (1960)

S'il est vrai que certains auteurs avaient à la fin du siècle dernier établi un rapport entre les bactéries buccales et la carie dentaire, ce n'est que dans les années 1960 que la nature infectieuse de la carie a été mise en évidence, grâce aux travaux de **Paul H. Keyes** et de ses collaborateurs (**Clergeau et al., 1999**). Ils ont en effet montré que la carie était une maladie causée par certains microorganismes de la cavité buccale : les bactéries cariogènes de la plaque dentaire sont les agents infectieux de cette maladie (**Clergeau et al., 1999**).

Cette plaque dentaire s'organise à la surface des dents à partir de congglomérats formés de débris alimentaires, de cellules desquamées (cellules des muqueuses remplacées par des cellules plus jeunes) et de certains constituants de la salive, sur lesquels agissent les bactéries (**Clergeau et al., 1999**). Toutefois, ces bactéries ne survivent et ne jouent un rôle que si elles trouvent des substances nécessaires à leur développement. Ceux-ci représentent donc le deuxième facteur indispensable pour la formation d'une carie (**Clergeau et al., 1999**).

Il n'y a donc apparition d'une carie dentaire que lorsque différents éléments sont réunis : les bactéries cariogènes de la plaque dentaire, les glucides fermentescibles (ou les nutriments cariogènes) apportés par l'alimentation et le terrain sur lequel s'expriment ces facteurs, la dent. Tout est affaire d'équilibre : si les défenses antibactériennes de l'organisme (et surtout de la salive) sont débordées, le processus

carieux se met en marche. La carie dentaire est ainsi reconnue comme une maladie d'origine infectieuse, liée à des facteurs multiples, qui entraînent une destruction des tissus minéralisés de la dent (Clergeau et al., 1999).

Cette théorie de l'acidogénèse de la plaque dentaire, ou mécanisme étiopatogénique de la carie dentaire à été décrite en 1962 sous la forme d'un schéma dénommé **la trilogie de Keyes** (Clergeau et al., 1999) (Voir Figure 4).

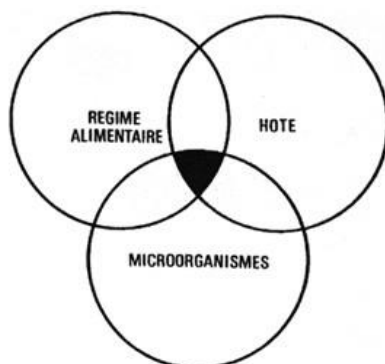


Figure 4. La trilogie de Keyes (Clergeau et al., 1999).

2.3.3. La théorie de Newburn (1978)

En 1978, le théoricien Newburn ajoute le temps à la théorie de Keyes car on n'attrape pas une carie comme un rhume : c'est un processus relativement lent, où l'exposition des surfaces dentaires à l'acidité buccale est importante (Courson et al., 1998) (Voir Figure 5).

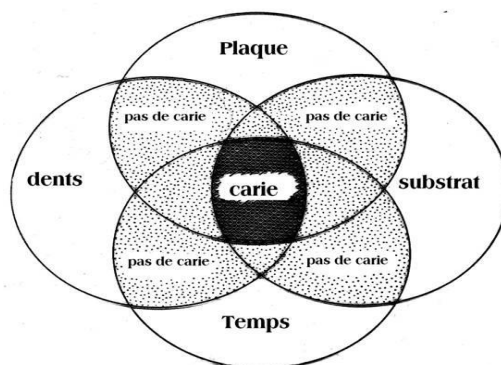


Figure 5. Trilogie modifiée de Keyes (Courson et al., 1998).

2.4. Les facteurs de risque

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

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

2.4.1. L'hôte susceptible :

2.4.1.1. La salive

2.4.1.1.1. Le rôle de la salive

La salive est le principal système de défense contre les facteurs de virulence des bactéries cariogènes. Toutes les fonctions salivaires sont impliquées dans le maintien de la santé orale et dentaire (**Van nieuwamerongen et al., 2004**). Elle a un rôle de protection par son action d'auto-nettoyage de la cavité buccale, elle régule le pH buccal, elle apporte des sels minéraux nécessaires à la reminéralisation de l'émail et elle a ainsi une action antibactérienne (**Clergeau et al., 1999**).

2.4.1.1.2. Le débit salivaire

Le débit salivaire est soumis à des variations physiologiques, il est même arrêté durant le sommeil et augmente pendant la prise d'aliments. Au repos, le flux est de 0,3 à 0,4 ml par minute et augmente de 1 à 2 ml par minute s'il est stimulé (**Clergeau et al., 1999**).

2.4.1.1.3. Le pouvoir tampon de la salive

La valeur du pH in situ (6,7), est proche de la neutralité et traduit bien l'équilibre acido- basique de la salive. Le pH peut aussi diminuer par augmentation du nombre de bactéries acidophiles.

Le pouvoir tampon de la salive est dû pour 64 à 85% aux bicarbonates. La stimulation des glandes salivaires augmente la production de CO₂ et donc le pouvoir tampon. Celui-ci est maximal pendant les repas. Le brassage des aliments entraîne une diminution de la flore buccale qui augmente à nouveau quand le pouvoir tampon atteint son minimum entre les repas (**Fejerskov et Kidd, 2003**). Le pouvoir tampon dépend aussi du renouvellement salivaire. Dans les zones de stagnation salivaire, la production d'acides et de bases par les bactéries est en concurrence avec le pouvoir tampon de la salive et augmente donc le développement bactérien (**Miller et al., 2004**).

2.4.1.1.4. Les variations salivaires au cours de la vie

Avec l'âge, le volume de sécrétion salivaire diminue et la composition salivaire se modifie. La salive devient plus visqueuse, plus concentrée, ce qui entraîne une diminution de sa capacité à lubrifier les tissus de la cavité buccale. Tous ces changements représentent un facteur de risque supplémentaire à prendre en compte chez les patients âgés, car ils limitent de façon considérable la fonction protectrice de la salive sur les surfaces dentaires (**Nagler et Hershkovich, 2005**).

2.4.1.1.5. La déminéralisation et la reminéralisation

Dès que la dent est dans la cavité buccale, sa surface d'émail subit en permanence une alternance de cycles de déminéralisation et de reminéralisation (**Clergeau et al., 1999**). Ces modifications ne sont pas observables cliniquement et ont généralement pour résultat un enrichissement progressif de la surface de l'émail en apatites fluorés, ces apatites confèrent à la surface de l'émail une résistance aux attaques acides subséquentes. Cet enrichissement n'est pas une prise passive de minéral et de fluorure, il est hautement dépendant de réactions complexes (**Clergeau et al., 1999**). La lésion

carieuse est le résultat d'un déséquilibre de ces cycles en faveur de la phase de déminéralisation (**Clergeau et al., 1999**).

Le développement d'une lésion carieuse, depuis la dissolution de quelques apatites, au niveau de la surface de l'émail, par les acides du métabolisme glucidiques des bactéries cariogènes de la plaque, la diffusion de quelques ions minéraux hors de l'émail dans le milieu buccal, jusqu'à la cavitation, en passant par la lésion dite « tache blanche » est un processus dynamique, qui peut s'étaler plusieurs années et se solder par la destruction de la dent (**Clergeau et al., 1999**).

2.4.1.2. La dent

Chez l'enfant en particulier, la dent en éruption est encore immature, car la calcification est incomplète. L'émail est alors perméable et plus vulnérable à la dissolution par l'acide. Avec la maturation, au contact de la salive et des nutriments, l'émail incorpore des ions phosphate, calcium et fluor dans les cristaux d'hydroxyapatites. Avec le temps, la porosité et la perméabilité seront ainsi fortement réduites (**Simmer et Hu, 2001**).

Ainsi l'exposition au fluor durant l'enfance sera également un facteur à prendre en considération. Les dents ayant reçu un apport en fluor, de façon interne, lors de leur formation, par administration de comprimés de fluor, de sel de table fluoré et, de façon externe, sous forme de dentifrices, gels et bains de bouche à haute teneur en fluor, sont beaucoup plus résistantes vis-à-vis de l'attaque carieuse (**Riethe et Rau, 1989**).

Certains défauts anatomiques de la dent, comme les puits, sillons et fissures, ou les anomalies telles que les hypoplasies amélaire, constituent des zones de vulnérabilité à la carie (**Oliveira et al., 2006**). La présence de malpositions dentaires, ou le port d'appareillages orthodontiques, en favorisant l'accumulation de la plaque dentaire, et en rendant le brossage plus difficile, augmentent grandement le risque carieux. (**Rosenbloom et Tinanoff, 1991**).

4.2. Les bactéries cariogènes

Après un bon brossage, les surfaces dentaires sont propres et donc dépourvues de toute présence bactérienne. Trois à quatre heures plus tard, une couche de protéines, essentiellement d'origine salivaire (pellicule acquise) va se déposer sur les dents. Les bactéries vont coloniser la pellicule acquise par couches successives et former le biofilm. La salive et certains glucides alimentaires comme le saccharose jouent un rôle important dans la formation du biofilm (**Rudney, 2000**). Le flux salivaire véhicule les bactéries vers les dents, mais en même temps assure partiellement leur élimination ; le métabolisme du saccharose par les bactéries aboutit, entre autre, à la formation de polysaccharides intracellulaires (glycogène) assurant l'énergie nécessaire à la survie et au développement des bactéries et, d'autre part, à la formation de polysaccharides extracellulaires (glycanes et fructanes) qui constituent l'essentiel de la matrice interbactérienne. Matrice et bactéries constituent le biofilm. Les premières couches bactériennes du biofilm sont des bactéries aérobies. Au fur et à mesure de leur multiplication, les conditions d'anaérobiose devenant favorables, les bactéries anaérobies vont progressivement se développer au détriment des aérobies. Schématiquement le biofilm supra-gingival est à forte prédominance d'aérobies alors que le biofilm sous-gingival est à forte prédominance d'anaérobies. Le pouvoir cariogène d'une bactérie est lié à sa capacité de métaboliser un glucide fermentescible pour aboutir à la production d'un acide à fort pouvoir de dissolution des phosphates de calcium de l'émail. C'est le processus de déminéralisation. Le *Streptococcus mutans* est la bactérie la plus impliquée dans le processus carieux initial de l'émail dentaire, aussi bien au niveau des surfaces lisses qu'au niveau des sillons et des fosses. Le potentiel cariogène de cette bactérie est considéré comme étant le plus important de toutes les bactéries de la plaque bactérienne (**Kohler et al., 1981**), (**Salonen et al., 1990**), (**Bowden, 1997**), (**van Ruyven et al., 2000**), (**Kleinberg, 2002**).

D'autres streptocoques possèdent un pouvoir cariogène mais moindre que celui de streptocoque mutans. Parmi ces bactéries on retrouve : *S. sobrinus* , *S. sanguis* , *S. mitis* , *S. salivarius*. Les lactobacilles et certaines variétés d'Actinomyces sont particulièrement impliqués dans les caries des racines dentaires (**Van Houte et al., 1990**), (**Zambon et al., 1995**), (**Reiker et al., 2000**).

2.4.2. 1. Streptocoques :

Les principaux groupes de bactéries impliqués dans la physiopathologie de la carie dentaire sont les streptocoques : *Streptococcus mutans* (Sm) (sérotypes c, e, f) et *Streptococcus sobrinus* (sérotypes d et g) sont les principales bactéries. Cependant *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus anginosus* interviennent également dans le développement des lésions carieuses. Ces bactéries sont de type cocci à gram positif. Les propriétés acidogéniques et aciduriques des Sm en font les bactéries les plus cariogènes de la plaque dentaire (Marsh, 2004). A partir des sucres provenant de l'alimentation, les Sm synthétisent des polysaccharides extracellulaires, glucanes et fructanes, qui leur confèrent la capacité d'adhérer aux surfaces dentaires (Jenkinson et Lamont, 1997). De plus, en métabolisant les hydrates de carbone alimentaires, les Sm produisent de l'acide, surtout de l'acide lactique (Lasfargues et Colon, 2009). La baisse de pH qui s'ensuit entraîne une perte de minéraux à la surface de l'émail dentaire. Par ailleurs, Sm peut survivre et même se développer dans un milieu extrêmement acide à un pH auquel la majeure partie des bactéries ne sont plus actives. Faiblement présent au début dans la plaque dentaire (moins de 1%), Sm devient majoritaire dans la plaque cariogène active (Lasfargues et Colon, 2009 ; Fitzgerald et Keyes, 1960). Cette bactérie est particulièrement virulente du fait de son utilisation optimale du saccharose. En effet, Sm est dotée d'un facteur de virulence supplémentaire : lorsque les glucides exogènes sont abondants, celui-ci peut polymériser le glucose à l'intérieur de la cellule et le stocker. Ces polysaccharides intracellulaires sont dépolymérisés quand les hydrates de carbone exogènes ne sont plus disponibles. Cette particularité entraîne une production d'acide continue (Rosan et Lamont, 2000).

2.4.2.2. Lactobacilles :

Les lactobacilles sont des bactéries à gram positif, anaérobies facultatives qui convertissent le lactose et les autres sucres simples en acide lactique. Les espèces les plus fréquemment isolées dans la cavité buccale sont *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus oris*, *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus salivarius* (Lasfargues et Colon, 2009). Les lactobacilles sont des germes commensaux du tractus digestif et possèdent un pouvoir pathogène pour les tissus durs

de la dent (**Mouton et Robert, 1994**) : comme les lactobacilles possèdent une faible adhérence aux surfaces lisses, leur nombre et leur proportion augmentent proportionnellement à la rétention de sucre dans la cavité buccale et la cavitation carieuse. Ces bactéries acidophiles sont capables de produire une quantité importante d'acide lactique.

2.4.2.3. Actinomyces :

Ce genre est surtout impliqué dans les caries radiculaires et les caries secondaires que nous ne développerons pas.

2.4.2.4. Autres bactéries :

Il existe de nombreuses espèces bactériennes qui jouent un rôle dans la balance acido-basique du biofilm, en transformant l'acide lactique en acides plus faibles par exemple. Par leurs actions, elles permettent une stabilité du pH et de la flore buccale lors des périodes de jeûne mais elles ne peuvent pas rivaliser avec l'acidogénicité induite par la prise de sucre (**Lasfargues et Colon, 2009**).

Des études menées chez l'homme suggèrent que des proportions élevées de Sm adhérents à l'émail n'initient pas systématiquement des lésions carieuses et qu'inversement, le processus carieux peut être observé en l'absence de *Streptococcus mutans* (**Carlsson et al., 1985**). Ainsi, dès 1987, la spécificité de cette bactérie à l'égard du processus carieux a été totalement remise en question, l'hypothèse d'un biofilm inducteur de la carie étant à considérer (**Nyvad et Fejerskov, 1987**). Cependant, *Streptococcus mutans* est encore considéré comme le principal germe impliqué dans le développement des caries coronaires (**Garcia-Godoy et Hicks, 2011**).

Streptococcus mutans et *Streptococcus sanguinis* sont retrouvés dans les premiers stades de la lésion carieuse. *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* se développent après la formation d'une cavité, tandis que les proportions d'Actinomyces et de lactobacilles s'élèvent lorsque la dentine est atteinte (**Aas et al., 2008 ; Siqueira et Rocas, 2008**) (Voir Tableau1).

Tableau 1. les bactéries de la flore présente dans les infections carieuses (Aas et al., 2008 ; Becker et al., 2002).

Caries		
Email	Dentine coronaire	Racine
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomuces spp.</i>	<i>Actinomuces spp.</i>
<i>Actinomyces viscosus</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Fusobacterium animalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Fusobacterium nucleatum sub sp.polymorphum</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Propionibacterium spp.</i>	<i>Selenomonas spp.</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Atopobium spp.</i>
<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Olsenella spp.</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Prevotella multisaccharivorax</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Veillonella spp.</i>	<i>Propionibacterium spp.</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Streptococcus sangiunis</i>		
<i>Veillonella sp.</i>		

2.4.4. Le facteur temps

Newbrun a modifié le schéma de **Keyes** pour y ajouter le facteur temps. Il considère ainsi que la durée et la fréquence pendant lesquelles les bactéries, l'hôte et le substrat sont présents simultanément, conditionnent également le déclenchement de la maladie carieuse (**Newbrun, 1978**).

Les bactéries cariogènes (*Streptococcus mutans*...) métabolisent les glucides fermentescibles d'origine alimentaire (saccharose...) ou à défaut, les polysaccharides de la matrice du biofilm.

Ce métabolisme aboutit à la production d'acides organiques dont le plus important est l'acide lactique qui va entraîner une baisse du pH salivaire et du biofilm (de 7 à 4,5). La présence d'acides sur la surface dentaire va entraîner une déminéralisation de l'émail par un processus de dissolution de cristaux d'hydroxyapatite avec libération de Ca et PO₄ sous forme d'ions. Ce processus de déminéralisation débute environ 15 minutes après l'ingestion alimentaire et dure entre 40 à 60 minutes : c'est le pic de « l'attaque acide ».

En l'absence d'un nouvel apport glucidique, les bicarbonates salivaires vont neutraliser les acides et rétablir un pH neutre qui va permettre à l'émail de se reminéraliser. Dans ce cas le processus carieux ne se développe pas. En revanche, si les apports glucidiques sont fréquents (grignotage), le pouvoir tampon de la salive sera insuffisant pour neutraliser l'action déminéralisatrice des acides et le processus carieux sera initié. la consommation de saccharose au cours des repas ne provoque pas le développement de la carie dentaire mais la consommation pluriquotidienne entre les repas, des glucides fermentescibles est particulièrement nocive (**Moreno et al., 1979**), (**Hicks et al., 2003**).

2.4.2. Les glucides fermentescibles :

Depuis **Miller** en 1890, de nombreux auteurs ont décrit une relation directe entre la consommation de sucres fermentescibles et la carie. Leur ingestion provoque une diminution du pH salivaire responsable d'une dissolution de l'émail.

Tous les glucides ne possèdent pas le même pouvoir cariogène. En effet, les sucres extrinsèques, c'est à dire ajoutés ou modifiés, ont des propriétés cariogènes beaucoup plus importantes que les sucres intrinsèques qui se trouvent de façon naturelle dans les aliments (**Lingström et al., 2000**).

Le saccharose est le glucide alimentaire le plus consommé dans l'alimentation des sociétés actuelles. Il est considéré comme le plus cariogène des hydrates de carbone car son bas poids moléculaire permet une fermentation rapide pour la production de polysaccharides extracellulaires (**Lasfargues et Colon, 2009**).

Le glucose, fructose, lactose et maltose n'ont pas fait l'objet d'études spécifiques, mais sont cités dans quelques publications sur le saccharose comme glucides dont l'influence sur la

carie dentaire est faible car leur consommation entre les principaux repas est rare et leur présence dans la cavité buccale est courte car ingérés sous forme liquide le plus souvent (lactose du lait, fructose du jus de fruits) (**Touger-Decker et al., 2003**). Toutefois, ces glucides en présence de bactéries cariogènes sont métabolisés comme le saccharose avec production d'acide lactique. L'amidon n'est pas directement métabolisé par les bactéries cariogènes. Il est hydrolysé par l'alpha-amylase salivaire en glucose, qui sera à son tour métabolisé par les bactéries cariogènes. A ce titre, l'amidon a été considéré comme un glucide jouant un rôle dans le développement de la carie dentaire (**Scannapieco et al., 1993**). Une étude récente (**Lingstrom et al., 2000**) précise qu'une alimentation uniquement à base d'amidon ne provoque pas le développement du processus carieux ; les auteurs estiment que la cariogénicité de l'amidon est liée à d'autres facteurs : fréquence d'ingestion, temps de présence en bouche, débit salivaire et présence d'autres glucides fermentescibles. De plus, le type de préparation culinaire qu'il subit modifie sa cariogénicité : les amidons bien cuits, comportant du saccharose incorporé, sont plus cariogènes que le saccharose seul. La cuisson, même si elle fragmente les molécules et les rend donc plus petites, rend l'amidon collant au contact de la salive, augmentant ainsi son potentiel cariogène (**Julien, 2006**).

Le xylitol (un polyol) est un glucide non fermentescible, qui a une action cario-préventive lorsqu'il est utilisé comme substitut partiel ou total du saccharose. Des études antérieures ont rapporté que pratiquement aucune bactérie du biofilm ne métabolise le xylitol. Le risque carieux est donc quasiment nul avec ce glucide, il réduit alors la quantité de *S. mutans* dans le biofilm et dans la salive et il réduit le risque carieux lorsqu'il est utilisé comme composant de gomme à mâcher. (**Trahan, 1995**), (**Dumas et al., 1980**).

Le sorbitol (un polyol), utilisé parfois comme substitut du saccharose dans certains chewing-gums, pastilles à sucer ou dentifrices, est considéré comme faiblement cariogène (**Birkhed et al., 1984**). En 2001, après la revue de la littérature concernant une quarantaine d'études sur les sucres de substitution, **Hayes** concluait que le sorbitol et le xylitol sont peu ou pas cariogènes, une baisse de la carie dentaire de l'ordre de 30 à 60 % est constatée chez les personnes utilisant des dentifrices ou mastiquant régulièrement du chewing-gum à base de sorbitol ou de xylitol ou de l'association des deux.

2.4.5. Les autres facteurs de risque :

D'autres facteurs comme la texture de l'aliment, collant ou non, et sa forme solide ou liquide, modifient la capacité et le temps de rétention de la nourriture sur les dents (**Gustafsson et al., 1954**). De plus, le moment de la consommation est important : la salive diluant et neutralisant l'acidité de la plaque. Or la salive est plus abondante au cours des repas qu'entre les repas et le jour que la nuit (**Lasfargues et Colon, 2009**). Le grignotage et le sirotage sont des comportements qui allongent la période d'acidité en bouche (**Gustafsson et al., 1954**) et augmentent par conséquent le risque carieux.

De nombreuses études ont donc confirmé l'existence d'une interaction entre les facteurs biologiques et les facteurs socioéconomiques, culturels, comportementaux, et environnementaux (**Evans et al., 1996**).

2.5. Le moyen d'évaluation de l'état dentaire d'une population: l'indice CAO

Imaginé par **Klein et Palmer** en 1940 (**Chaves et al., 1984**), l'indice CAO comptabilise le nombre de dents adultes Cariées, Absentes et Obturées d'un individu (**WHO 1997**). Lorsque l'unité de mesure est la dent, on parle d'indice CAOD. Chez un adulte ayant 28 dents, le score maximum résultant de la mesure de l'indice CAOD sera donc de 28 (**Marthaler, 1965 ; Menghini et al., 1994**). L'indice co comptabilise le nombre de dents lactéales cariées ou obturées. Les dents lactéales absentes ne sont pas comptabilisées. Il n'est pas possible sur la base d'un simple dépistage de préciser si la dent a été perdue par exfoliation naturelle ou suite à une carie (**Carlos et al., 1972**). Lorsque l'unité de mesure est la dent, on parle d'indice cod. Chez un enfant ayant 20 dents, le score maximum résultant de la mesure de l'indice cod sera donc de 20 (**Marthaler, 1965 ; Menghini et al., 1994**).

Un individu présente des dents saines lorsque la somme des indices CAOD et cod est nulle.

En plaçant la somme des indices CAOD individuels d'une population donnée au numérateur et en plaçant le nombre d'individus composant cette même population au dénominateur, on obtient l'indice CAOD moyen pour cette population (**Hescot et al., 2000**). On obtient de la même façon l'indice cod moyen d'une population.

2.7. Les différents outils de diagnostic microbiologique de la plaque dentaire

2.7. 1. Prélèvement et transport

Les principales causes d'échec de l'isolement des bactéries anaérobies sont la mauvaise qualité du prélèvement et du transport, ainsi que l'emploi de méthodes de culture inadéquates (Sédallian, 1998).

2.7. 1.1. Le prélèvement de la plaque dentaire

Les prélèvements dentaires nécessitent beaucoup de précaution. Il faut isoler la région concernée en plaçant des rouleaux de coton autour de la dent à prélever, après avoir nettoyé la région concernée.

En pratique, l'écouvillon demeure le moyen de prélèvement le plus utilisé. Il est facile à manier. Il nécessite de prendre plus de précautions pour son transport. Après prélèvement, il faut veiller à :

- empêcher la dessiccation du produit pathologique,
- protéger les bactéries de l'oxygène de l'air.
- préserver la multiplication ultérieure des bactéries aérobies et anaérobies

2.7.1.2. Le transport de l'échantillon

2.7.1.2.1. Conditions de transport

Le milieu de transport idéal doit préserver la multiplication ultérieure des anaérobies, mais aussi des aérobies.

Les conditions de transport du prélèvement restent un point sensible. La mise en évidence des bactéries anaérobies est toujours délicate. Cependant, les principales causes d'échec sont de mauvais prélèvements, de mauvaises conditions de transport et des méthodes de culture inadéquates (Sédallian et al., 1999)

La plupart des anaérobies survivent bien pendant six heures d'exposition à l'air : en revanche, leur taux chute ensuite très vite et de façon inégale selon les espèces. En fait,

si son volume est important (> 2 ml), le produit pathologique peut constituer en soi un bon milieu de transport (Sédallian et al., 1999) et on peut se dispenser d'un milieu de transport, si l'ensemencement a lieu dans un délai maximum de 6 heures. En dessous de 2 ml, on dispose de trente minutes maximum, au-delà un milieu de transport est indispensable.

2.7.1.2.2. Milieux de transport

le milieu de transport protège les bactéries de l'oxygène (présence de substances oxydo-réductrices) et bloque leur multiplication durant le transport (absence de facteurs de croissance) (Sédallian et al., 1999). Soit en le mettant dans un milieu réducteur semi-solide (Portagerm, TGV anaérobie), soit en le maintenant dans une atmosphère anaérobie stricte (Culture anaérobie, TGV pré-réduit).

Des études ont été réalisées pour évaluer les résultats de ces méthodologies. La plupart d'entre elles comparent le transport des échantillons en tube simple (atmosphère oxygène), au transport en tube scellé contenant un mélange gazeux ($\text{CO}_2 + \text{H}_2 + \text{N}_2$) ou sur écouvillon maintenu dans un milieu non nutritif réducteur.

En atmosphère oxygénée, le nombre de bactéries anaérobies diminue à partir de la 2^{ème} heure pour certaines espèces : *P. anaerobius*, *Fusobacterium nucleatum*. Elles ne sont plus isolées à partir de la 48^{ème} heure (Hill, 1978). En revanche, la culture de *Bacteroides fragilis* ne semble pas affectée pendant 8 heures et les colonies sont encore isolées après 72 heures (Miller et al., 1995).

- Culturette anaérobie (Becton-Dickinson)

Elle comprend : un étui plastique contenant un écouvillon monté sur tige plastique, une compresse de polyester qui maintient le prélèvement en atmosphère humide sans diluer l'échantillon ; une ampoule de milieu de Cary Blair modifié contenant des sels minéraux et des substances réductrices que l'on écrase pour humidifier la compresse ; un catalyseur et un système générateur d'hydrogène et de dioxyde de carbone.

Cet ensemble est contenu dans un sac en plastique (Biobag). Quand l'écouvillon est introduit dans l'étui en plastique, on écrase l'ampoule génératrice d'hydrogène et de CO_2 .

- **Portagerm (bioMérieux)**

C'est un milieu contenu soit dans un tube (pour écouvillon), soit dans un flacon fermé hermétiquement sous vide (pour prélèvements liquides). Le milieu est une gélose tamponnée contenant des substances réductrices. Un indicateur d'oxydoréduction (résazurine) permet de visualiser la présence ou l'absence d'oxygène.

- **TGV anaérobie (Biorad)**

C'est un ensemble écouvillon-coton hydrophile + milieu de transport semi-solide. Il s'agit d'un milieu de transport liquide sous vide partiel et avec mélange gazeux (CO₂, H₂, N₂) pour micro-organismes exigeants.

2.7.1.2.3. Les différences entre les milieux de transport

Brook a montré récemment que le système Portagerm était supérieur aux autres systèmes de transport pendant les 24 premières heures : dans 15 prélèvements contenant 47 anaérobies lors de l'isolement immédiat, 45 (96 %) sont retrouvés après 24 heures sur Portagerm, et seulement 26 (55 %) sur tube contenant une atmosphère CO₂ + hydrogène. Les bactéries les plus sensibles sont *Fusobacterium* et *Prevotella* (**Brook, 1987**).

2.7.2. Analyse des prélèvements

2.7.2.1. Méthode classique de culture :

Les bactéries anaérobies sont responsables d'une grande variété d'infections localisées ou généralisées. Dans plus de 80% des cas il s'agit d'une infection mixte, associant bactéries aérobies ou aéro-anaérobies et anaérobies strictes.

Les prélèvements sont déclarés significatifs : les bactéries seront cultivées, puis identifiées par les tests biochimiques et le test de sensibilité aux antibiotiques (**Bouchard et al., 2015**).

Les phases de laboratoire amenant à l'identification des bactéries sont les suivantes (**Bouchard et al., 2015**) :

-La dispersion de l'échantillon : elle doit conserver la vitalité des bactéries présentes dans l'échantillon

-La dilution : le prélèvement d'un patient peut présenter 10^7 à 10^9 bactéries/ml. La dilution permet de réaliser la culture primaire avec une densité moins importante de pathogènes et donc analysable facilement

-La mise en culture : les dilutions étant réalisées, 100 μ l sont ensemencés sur un milieu de culture gélosé. La mise en culture est réalisée sur des géloses non spécifiques et spécifiques pour une espèce bactérienne donnée.

-L'incubation : l'incubation des préparations est réalisée pendant 5 jours à 37°C dans des jarres d'anaérobiose ou des enceintes anaérobies (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) contrôlées par des bandelettes de bleu de méthylène virant au blanc en l'absence d'oxygène.

2.7.2.1. 1. Mise en culture

2.7.2.1. 1. 1. Milieux de culture

L'isolement nécessite des milieux gélosés, contenant de nombreux facteurs de croissance et rendus sélectifs grâce à l'addition d'antibiotiques. Il est important de toujours utiliser des milieux désoxygénés (régénérés), fraîchement préparés et conservés en anaérobiose avant leur utilisation.

Différents milieux ont été proposés, ils peuvent être limités :

- Milieu gélosé pour les bacilles à Gram négatif (exemple Schaedler au sang avec vancomycine (7,5 mg/l) et néomycine (75 mg/l)). Ce milieu permet l'isolement des **Bacteroides du groupe fragilis**, des **Prevotella**, des **Fusobacterium**.
- Gélose Columbia au sang et au phényléthyl- alcool (4,2 g/100 ml) spécifique des bactéries à Gram positif et des **Porphyromonas**.

2.7.2.1. 1. 2. Les conditions d'incubation

Il existe actuellement des sachets permettant de faire l'anaérobiose en moins d'une demi-heure sans catalyseur.

L'incubation est réalisée dans des jarres ou des sacs en plastique fermés hermétiquement. Les chambres anaérobies sont très utiles, mais pas indispensables pour l'isolement des anaérobies, elles nécessitent une surveillance constante.

L'alternative peut être réalisée par un système permettant de faire le vide dans une jarre et d'injecter un mélange gazeux (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂). Il est nécessaire de bien vérifier l'anaérobiose réalisée à l'aide d'un indicateur d'oxydo-réduction (bande de papier buvard imprégné de bleu de méthylène ou de résazurine).

2.7.2.1. 2. L'identification

Les bactéries forment des colonies (colony forming unit (CFU)) peuvent se différencier par leur aspect et par leur réaction spécifique à des substrats (tests enzymatiques ou biochimiques). Elles se caractérisent tout d'abord par (**Bouchard et al., 2015**) :

- La morphologie : forme, surface, consistance, couleur.
- La transmission de la lumière, cette différenciation peut se faire à l'œil nu, à la loupe binoculaire, sous lumière ultraviolette ou sous microscope à immersion pour voir la mobilité de certaines espèces.
- Par la caractérisation avec des colorations (par exemple coloration de Gram).
- Par la fermentation des sucres, la production d'indole et d'une gélatinase.
- Par leurs réactions aux tests enzymatiques.
- Par leurs caractères antigéniques : cela permet par la recherche d'antigènes bactériens spécifiques grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques, de mettre en évidence certains pathogènes par des méthodes d'immunofluorescence.

Cette orientation présomptive permet la détermination du genre bactérien de la grande majorité des anaérobies (ce qui est souvent suffisant). Dont, les bactéries les plus fréquemment identifiées par ces méthodes sont : *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ureolyticus*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium nucleatum*, *F.necrophorum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces meyeri*.

Chaque pathogène aura des caractéristiques qui permettront de les distinguer les uns des autres. Il est clair qu'à l'heure de la biologie moléculaire, l'identification sous binoculaire de la morphologie bactérienne semble un peu médiévale (**Bouchard et al., 2015**).

- le test de sensibilité des isolats aux antibiotiques est utilisé comme test de confirmation des genres isolés en se basant sur la sensibilité naturelle des souches aux différents antibiotiques.

- La sensibilité aux antibiotiques

C'est une technique classiquement utilisée en bactériologie médicale afin de déterminer la sensibilité bactérienne à différentes molécules antibiotiques (**Sixou et al., 1993**) (**Lakhssassi et al., 2005**). Cette méthode permet également de contrôler immédiatement la présence d'un mutant ou d'une résistance inductible, d'apprécier l'intérêt d'une association de deux antibiotiques, de même, le test de sensibilité aux antibiotiques constitue un critère ultime d'identification des bactéries anaérobies.

Les résultats de cet examen appliqués aux bactéries anaérobies et capnophiles de la cavité buccale apportent des informations importantes au clinicien afin qu'il puisse choisir l'antibiotique ou l'association de molécules antibiotiques la plus appropriée. Les bactéries anaérobies provoquent un nombre important d'infections qui nécessitent une thérapeutique spécifique.

Les tests de sensibilité aux antibiotiques ou le DDS-test (méthode de Kirby-Bauer modifiée pour les bactéries anaérobies) sont classiquement des tests par diffusion en milieu gélosé. Un tel test consiste à placer des disques stériles en papier contenant une concentration déterminée d'un antibiotique. Ces disques préchargés sont disposés sur la surface de la gélose préalablement ensemencée par l'inoculum bactérien à étudier. Après 24 à 48 heures d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition en millimètres est mesuré. La résistance correspond à une culture des souches ayant un diamètre d'inhibition inférieur à 10mm par rapport au disque. La résistance intermédiaire correspond aux diamètres intermédiaires d'inhibition sur la gélose, c'est-à-dire diamètre entre 10 et 15mm autour du disque antibiotique sans culture. La sensibilité des bactéries à un antibiotique est donc mesurée par une culture à une distance supérieure à 15mm depuis le disque d'antibiotique. L'intérêt thérapeutique de ce test est de pouvoir choisir un antibiotique mieux ciblé et adapté aux souches présentes (**Bouchard et al., 2015**).

Un autre test peut être réalisé aussi sur un milieu gélosé préalablement ensemencé : l'E test. Ce test permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des pathogènes aux antibiotiques. **(Bouchard et al., 2015)** La CMI représente la concentration minimale pour laquelle un antibiotique inhibe la croissance d'une bactérie. Une bandelette d'antibiotique est placée sur le milieu ensemencé. Cette bandelette contient un antibiotique à des concentrations croissantes. Après incubation, une ellipse d'inhibition des bactéries va se former autour de cette bandelette (zone claire). Le début de cette ellipse indiquera la CMI de la souche étudiée pour l'antibiotique utilisé **(Bouchard et al., 2015)**.

2.7.2. 2. Les sondes nucléiques

La microflore orale comprend 619 taxons appartenant à plusieurs embranchements, à savoir Actinobactéries, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacteries, Proteobacteries, spirochètes, Tenericutes **(Dewhirst et al., 2010)**.

Des études antérieures ont démontré que plusieurs espèces bactériennes vivant dans la cavité buccale ne peuvent pas être isolées par les techniques classiques de culture. Cela soulève la possibilité intéressante que les espèces non encore cultivées peuvent effectivement jouer un rôle, bénéfique ou pathogène dans la cavité buccale. Jusqu'à présent, leur rôle peut être déduit sur la base des données fournies par les méthodes de microbiologie moléculaire **(Siqueira et Rôças, 2013)**.

L'utilisation des sondes nucléiques représente un progrès incontestable dans le diagnostic moléculaire en parodontie clinique.

Tous les organismes vivants nucléés contiennent dans leur génome certaines séquences d'acides nucléiques spécifiques qui permettent de les distinguer les uns des autres. La caractérisation génétique est basée sur la recherche de séquences spécifiques de base de l'ARN ribosomal 16S ou de l'ADN. La succession obtenue après séquençage est analysée par bio-informatique à partir de banques de données qui recensent la quasi-totalité des séquences des acides nucléiques des bactéries connues **(Joachim et Charon, 2010)**.

Une sonde nucléique est un fragment d'acide nucléique monocaténaire (nucléotide ou oligonucléotide) qui peut s'apparier à des portions d'ADN complémentaires.

Les deux brins doivent pouvoir entrer en contact l'un avec l'autre et avoir suffisamment d'homologie pour qu'une molécule bicaténaire stable soit formée. Cette liaison entre molécules complémentaires porte le nom de réaction d'hybridation qui résulte donc de l'appariement de la sonde à une séquence nucléotidique complémentaire présente dans l'échantillon. Pour constituer une sonde, la séquence nucléotidique doit être couplée à une molécule signal (*i.e.* marqueur radioactif ou chromogène comme la Biotine (Avidine) qui permet de mettre en évidence la réaction d'hybridation **(Joachim et Charon, 2010)**).

Un des avantages majeurs de l'utilisation des sondes nucléiques est qu'elles permettent la détection de bactéries difficiles à cultiver ou à identifier. D'autre part, les bactéries de l'échantillon n'ont donc pas besoin d'être vivantes. Cette technique permet également de détecter des bactéries cibles en petit nombre (1 000, voire moins). La quantité d'acide nucléique peut être minime grâce aux techniques de réplication (Amplification en Chaîne par Polymérisation) **(Joachim et Charon, 2010)**.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la méthode la plus efficace pour amplifier les gènes et l'ARN qui en est transcrit. Cette technique a pour but de mettre en évidence des séquences d'ADN spécifiques à certaines bactéries. Comme chaque bactérie ne possède qu'un seul exemplaire d'ADN. Les séquences cibles doivent donc être fortement multipliées par la PCR.

Bien que la PCR soit une technique très sensible, capable de détecter même une seule copie d'une séquence recherchée **(Greenstein, 1988)**, ses limitations sont nombreuses. Des difficultés peuvent survenir lors de l'étude de petites quantités d'ADN, car les ingrédients nécessaires à la réaction (amorces, nucléotides, polymérase Taq) peuvent être épuisés avant que suffisamment de séquences cibles ne soient produites. La spécificité de la réaction dépend de plusieurs facteurs : la taille des amorces (en nucléotides), les caractéristiques du thermo cycle, la concentration en sels tampons, etc. Une limite majeure de la PCR est la susceptibilité du processus à la contamination, en particulier quand il s'agit de détecter des séquences rares d'ADN **(Neumaier et Braun, 1998)**. Ce qui rend nécessaire la mise en place de la technique de PCR en temps réel (RT-PCR) permettant d'établir des courbes d'augmentation des produits de la PCR et d'effectuer le calcul précis de la quantité d'ADN initial **(Crockett et Wittwer, 2001)**.

Plusieurs études antérieures ont été faites dans le but de la caractérisation moléculaire de la microflore constitutive de la plaque dentaire en cas de santé buccale ou de pathologies bucco-dentaires, le séquençage de l'ARN 16S des bactéries buccales a permis l'identification des genres suivants : *Selenomonas* , *Veillonella* , *Fusobacterium* , *Leptotrichia* , *Streptococcus* , *Kingella* , *Lactobacillus*, *Actinomyces* , *Enterococcus* , *Atopobium* , *Olsenella*, *Prevotella* , *Propionibacterium* , *porphyromonas*, ... (**Preza et al., 2008 ; Jiang et al., 2010 ; Ling et al., 2010 ; Candids et Leslie, 2012**).

2.7.2.3. Le test BANA

Le test BANA (acronyme de Benzoyl - DL - arginine - 2 - Naphthylamide) est un test de diagnostic microbiologique basé sur l'observation que *P. gingivalis*, *T. forthysia* et *T. denticola* produisent des protéases (« Trypsine-Like ») capables de lyser le substrat BANA (**Chan et al., 2010**).

Un échantillon de plaque dentaire est appliqué sur une bandelette, puis placé dans un incubateur pendant cinq minutes. En fonction de la quantité de protéases présentes, la bandelette imprégnée de réactif vire au bleu. Si au moins l'une des bactéries est présente, le bleu sera plus ou moins intense. Cependant, si le test est positif, il n'est pas possible de savoir quelle est (ou quelles sont) la (ou les) bactérie(s) présente(s) dans l'échantillon (**Joachim et Charon, 2010**).

Ce test rapide, simple et utilisable au fauteuil pourrait être couplé à l'utilisation du microscope à contraste de phase permettant ainsi de diminuer le risque de faux négatif (**Joachim et Charon, 2010**).

2.7.2.4. Les tests salivaires

Dans la procédure de détermination du risque carieux, le praticien utilise un prélèvement de plaque qu'il incube pendant 48 heures (**Blique, 1997**). Il s'agit dans ce cas de savoir si l'échantillon contient un nombre important de *Streptococcus mutans* et de **lactobacilles**. Si le test révèle des quantités importantes de ces deux micro-organismes, le risque carieux est important, mais peut indiquer en même temps un risque parodontal faible (et inversement). En effet, il existe un antagonisme entre les bactéries parodontopathogènes (complexe rouge) et les bactéries responsables des lésions carieuses (**Joachim et Charon, 2010**)(Voir Figure 6).



Figure 6. Le test Vivadent™ : test de risque carieux

(Il permet de savoir quelle est la quantité de streptocoques et de lactobacilles présents dans l'échantillon prélevé ; si ces bactéries sont nombreuses, le risque carieux est majeur, mais le risque parodontal est faible car ces deux bactéries sont antagonistes des bactéries paropathogènes).

2.8. Les méthodes d'étude de la formation de biofilm

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

Bien que la standardisation des méthodes d'étude des biofilms soit aujourd'hui nécessaire. Plusieurs stratégies *in vitro* permettent de modéliser les biofilms. La grande majorité des études sur les biofilms sont réalisées en monoculture. C'est-à-dire que l'on étudie des biofilms formés d'une seule espèce de microorganisme. La monoculture sur un support comme de l'hydroxyapatite ou sur un film salivaire permet d'identifier des facteurs d'adhésion, de caractériser l'organisation spatiale du biofilm, de valider l'expression de différentes pectéines dans des conditions données. Les résultats de ces essais sont comparés à des cultures planctoniques. L'inconvénient est que la technique de monoculture ne reflète pas la vie des micro-organismes dans les biofilms hétérogènes. Aussi, aujourd'hui, des techniques utilisent plusieurs espèces bactériennes, voir de micro-organismes (c'est-à-dire bactéries, levures). Ces techniques dite « polycultures » ou « plurimicrobiennes » sont plus complexes à mettre en œuvre mais sont plus proche de la réalité biologique (**Bouchard et al., 2015**).

Les méthodes utilisées sont soit des méthodes statiques (culture en plaques de microtitrages et analyse après coloration au crystal violet) Soit des méthodes dynamiques comme des chambres en flux. Cette méthode présente l'avantage de disposer les bactéries de différentes

espèces de façon séquentielle. Comme cela se passe dans la plaque dentaire. Les biofilms formés sont continuellement approvisionnés en nutriments. Les biofilms formés sont soit observés par différentes techniques de microscopies, soit collectés pour des analyses de biologie moléculaire, ou autre (**Bouchard et al., 2015**).

2.8.1. Méthodes des microplaques de titration :

Cette technique consiste à faire adhérer la suspension cellulaire au fond et sur les parois d'une plaque « 96 puits ». Cette technique est qualifiée de technique «haut-débit» car elle permet une lecture rapide et automatisée des résultats. Elle est notamment utilisée pour réaliser des criblages, par exemple pour évaluer la sensibilité de biofilms à une palette d'antibactériens ou d'antifongiques selon le biofilm considéré (**Ramage et al., 2001**).

La coloration par le cristal violet est souvent utilisée pour la quantification du biofilm pour cette méthode de microplaque de titration, car c'est une méthode simple et non couteuse. Elle est principalement basée sur la rétention d'une quantité du cristal violet proportionnel à la biomasse adhéree. La méthode du cristal violet est une méthode semi-quantitative, puisque le cristal violet est retenu par toute entité adhéree sur le support quel que soit sa nature.

2.8.2. Méthode de Rouge Congo :

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

2.9. Les avantages de la formation de biofilm :

La formation de biofilm est une réponse à des signaux environnementaux qui va se traduire chez les bactéries du biofilm, dites sessiles, par un certain nombre de modifications génotypiques. Celles-ci induisent des bouleversements phénotypiques et métaboliques chez les bactéries sessiles comparativement à leurs homologues en suspension (dits planctoniques)

(Costerton et al., 1999; Davey et O'Toole, 2000). Un des exemples très illustratif de ces modifications concerne la résistance aux antibiotiques. Les bactéries d'un biofilm peuvent en effet être jusqu'à 1000 fois plus résistantes à certains antibiotiques que ces mêmes cellules en culture planctonique (Mah et O'Toole, 2001). Le biofilm bactérien paraît alors comme une structure complexe et dynamique, aussi bien au niveau de son organisation qu'au niveau de sa capacité à s'adapter rapidement aux changements de l'environnement (Costerton et al., 1999; Stanley et Lazizzera, 2004). Les bactéries trouvent généralement un intérêt à vivre et à croître sous forme de biofilms (Brown et al., 1998). Plusieurs études ont appuyé l'idée que les différences entre cellules planctonique et celles présente dans un biofilm venaient essentiellement de la disponibilité des nutriments pour les cellules dans les deux cas (Davies, 2000). Flemming, en 1993, a regroupé ce qu'il considère comme des avantages d'un mode de croissance sous forme de biofilm: Symbiose; utilisation de substrats moins facilement biodégradables par des organismes spécialisés par exemple dégradation de la cellulose ou, nitrification; création de niches écologiques par exemple des zones anaérobies dans les environnements aérobies, des compartiments riches en nutriments dans les systèmes oligotrophes.

1. Matériel :

1.1. Matériels de prélèvements de la plaque supra- gingivale :

Un plateau d'examen classique comprenant :

- miroir, sondes, précelles.
- Ecouillons stériles (Citolabo, France)
- Rouleaux de coton salivaires.

1.2. Les milieux de culture

- Bouillon BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid, Basingstoke, Angleterre)
- Gélose Columbia (Oxoid, Angleterre).
- Gélose Mac Conckey (Oxoid, Basingstoke, Angleterre)
- Gélose Chapman (Oxoid, Basingstoke, Angleterre)

1.3. Matériels de culture anoxique

- Jarre anaérobies (BD GasPackTM EZ container, USA)
- Sachets générateurs d'anaérobiose, Genbox anaer (Biomérieux, France)

1.4. Matériels d'identification biochimique :

- API20A (Biomérieux, France)
- API 20 Strep (Biomérieux, France)
- API 20E (Biomérieux, France)
- API Staph (Biomérieux, France)
- **Réactifs :** BCP, EHR, NIN, ZYM A (Réf. 70 494), ZYM B (Réf. 70 493), Xylène, VP 1 + VP 2 (Réf. 70 422), NIT 1 + NIT 2 (Réf. 70 442), TDA (Réf. 70 402), JAMES (Réf. 70 542), Zn (Réf. 70 380)

1.5. Disques d'antibiotiques :

- Amoxicilline (25 μ g) (Himedia, L'Inde)
- Amoxicilline associée à l'acide clavulanique (30 μ g) (Himedia, L'Inde)
- Kanamycine (5 μ g) (Himedia, L'Inde)
- Vancomycine (1mg) (Himedia, L'Inde)
- Colistine (10 μ g) (Himedia, L'Inde)
- Métronidazole (16 μ g) (Himedia, L'Inde)

1.6. Matériel d'étude du biofilm bucco-dentaire

- Microplaques de titration (96 puits)
- Vortex
- Lecteur de microplaques (bioTek, Allemagne)

2. Méthodes

2.1. Période et lieu d'étude

De juin 2013 à juin 2014, les patients ont été recrutés selon des critères d'inclusion bien précis au niveau de la clinique dentaire à la faculté de médecine dentaire (université de Tlemcen).

Les prélèvements ont été analysés au niveau du laboratoire de Chirurgie Expérimentale à la faculté de médecine (université de Tlemcen), pour raison de promiscuité.

2.2. Type d'étude

Cette étude compare deux populations, l'une portant des caries dentaires (n=50), l'autre indemne de dents cariées (n=50).

Dans chaque population, nous avons mis en place une enquête par des fiches de questionnaires comportant des informations sur le statut sociodémographique, statut économique, habitudes alimentaires et les pratiques d'hygiène buccodentaire.

De plus, une étude phénotypique et qualitative des souches bactériennes incriminées dans la formation du biofilm dentaire supragingival de chacune des deux populations a été faite. Ces isolats bactériens ont été testés pour évaluer leur aptitude de formation du biofilm.

2.3. Récolte des données et Ethique :

Cette étude est conforme aux principes énoncés dans la déclaration d'**Helsinki** de l'Association Médicale Mondiale (2013) portant sur les êtres humains. Le protocole d'étude a été approuvé par le comité éthique de l'hôpital de Tlemcen. Les participants ont été informés des objectifs de l'étude et ont donné leur consentement écrit avant de procéder aux prélèvements.

2.4. Objectifs de l'étude :

- **Objectif principal**

Cette étude a pour objectif principal l'estimation des variations de pourcentages et/ou des espèces bactériennes en cas d'une atteinte de carie dentaire.

- **Objectif secondaire**

-L'évaluation de l'impact des paramètres socio-démographiques, de statut économique, des habitudes alimentaires et des pratiques de l'hygiène bucco-dentaire sur la carie dentaire.

- L'étude de la biodiversité bactérienne du biofilm dentaire supra-gingival chez des individus ayant des dents cariées et d'autres qui sont indemnes de caries dentaires.

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

2.5. Population d'étude

Cette étude a ciblé des personnes se présentant au service d'Odontologie Conservatrice (OC) à la clinique dentaire (département de chirurgie dentaire –Tlemcen) pour des soins ou des contrôles. L'examen clinique de chacun de ces sujets a été effectué par un médecin dentiste qui applique les recommandations de l'organisation mondiale de santé (**OMS 1987 ; OMS 1997**).

Cet examen a eu lieu au fauteuil dentaire muni d'un SCIALYTIQUE à bonne LUMIERE à l'aide de sondes exploratrices, de miroirs à bouche et de précelles.

Tout examen visuel ayant pour but de rechercher des lésions carieuses, doit être précédé d'un nettoyage et d'un séchage des surfaces dentaires. Cette inspection clinique visuelle doit ainsi mettre en évidence des changements d'opacité, de coloration ou encore de translucidité (**Lasfargues et Colon, 2009**). Il convient de noter que la détection des caries occlusales est compliquée du fait de la morphologie des surfaces, de l'anatomie des puits et fissures, de la présence de plaque. Il en va de même pour la visualisation des caries proximales postérieures, notamment lorsque celles-ci se situent sous la crête marginale dans les premiers stades de la

lésion. L'examen visuel est subjectif et opérateur dépendant car il prend en compte l'acuité visuelle du praticien et son expérience.

Les sujets concernés sont ceux qui ont répondu aux critères d'inclusion et d'exclusion que nous avons établi pour atteindre les objectifs de cette étude. Chacun d'entre eux a rempli un questionnaire médico-dentaire avant d'effectuer le prélèvement.

2.5.1. Les critères d'inclusion et d'exclusion :

La première population (témoin): il s'agit de sujets âgés de 20-35 ans, dont le CAO=0 (indemnes de caries dentaires) et ils ne présentent aucune atteinte parodontale et/ou pathologie au niveau de l'état général.

La deuxième population : il s'agit de sujets ayant les mêmes critères que la première population avec un $4 < \text{CAO} \leq 8$ (présentant des dents cariées)

2.5.1.2. Les critères d'exclusion :

- L'antibiothérapie dans les derniers 3 mois
- Présence d'implants prosthétiques fixes ou mobiles
- Avoir moins de 24 dents permanentes
- Patients avec mauvaise hygiène (ne se brossent pas les dents)
- Présence de nombreuses malpositions dentaires
- Application de fluor dans les 48 heures qui précèdent le prélèvement
- Refus ou incapacité de consentir par écrit à l'étude.
- sujets ayant déjà contribué à cette étude.

2.5.2. Le questionnaire médico-dentaire :

Deux fiches de questionnaire ont été conçues dans un souci de clarté et de compréhension, en concertation avec le médecin dentiste et notre directrice de thèse : un questionnaire pour les sujets indemnes de caries dentaires et un autre pour les sujets

présentant des lésions carieuses, ces deux questionnaires se diffèrent par la rubrique de l'indice CAO qui ne concerne que la deuxième population.

Les fiches de questionnaire se composent de plusieurs parties (**Voir annexe N° 1**) :

- Une première concernant des informations sur la date de prélèvement, l'état civil, le statut socio-démographique et économique du patient interrogé.
- Une seconde relative à l'hygiène bucco-dentaire (fréquence de brossage par jour, le matériel utilisé,...)
- Une troisième s'intéressant aux habitudes alimentaires des sujets.
- Une quatrième visant à calculer l'indice CAO pour les sujets ayant des dents cariées.

A la fin de la fiche de questionnaire, chaque sujet doit confirmer SON accord de participation par sa SIGNATURE personnelle.

2.6. Analyse statistique des données des fiches du questionnaire :

Le test du Chi- carré (χ^2) permet de comparer soit une répartition observée à une répartition théorique, soit plusieurs répartitions observées issues d'un seul échantillon.

Pour notre étude, ce test cherche à tester si deux variables qualitatives (nominales ou ordinales) sont significativement associées. En réalité, c'est l'indépendance des variables qualitatives, présentées dans un tableau croisé. On cherche à vérifier si l'association des deux variables est suffisamment forte (Hypothèse H_1) pour que l'hypothèse de leur indépendance (Hypothèse nulle H_0) puisse être rejetée.

On rejettera l'hypothèse nulle d'indépendance (H_0) entre les variables si le χ^2 calculé est supérieur à la valeur de référence du χ^2 se trouvant dans la table de khi-deux pour n degrés de liberté (en lignes dans la table) et pour un α (niveau de risque de se tromper en rejetant l'hypothèse nulle donné en colonnes, fixé généralement à 5). Les logiciels statistiques, dont SPSS, donnent une signification ou **p-value**, s'interprétant comme le niveau risque de se tromper en rejetant H_0 . Ainsi, si elle est inférieure à 5 %, on rejette l'hypothèse d'indépendance entre les deux variables, qui sont alors significativement associées.

Pour que la lecture soit rapide, on peut faire appel à des représentations graphiques tels que les histogrammes. L'intérêt est de "visualiser les effectifs de toutes les modalités d'une variable" (**Rude et Retel, 2000**).

Le Chi- carré est donc le test statistique qui répond mieux aux objectifs de notre analyse. C'est pourquoi, nous l'avons choisi pour notre approche statistique. Cette mesure a été réalisée à l'aide du logiciel SPSS, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) qui nous a permis d'avoir des résultats aussi significatifs que fiables.

- SPSS (« *Statistical Package for the Social Sciences* ») est un logiciel utilisé pour l'analyse statistique. La première version de SPSS a été mise en vente en 1968 et fait partie des programmes les plus largement utilisés pour l'analyse statistique en sciences sociales. Il est utilisé par des chercheurs appartenant à diverses obédiences scientifiques (économie, science de la santé, éducation nationale, etc.). En plus de l'analyse statistique, la gestion des données (sélection de cas, reformatage de fichier, création de données dérivées) et la documentation des données sont deux autres caractéristiques de ce logiciel.

La nature des données propres au Chi- carré : Le chi carré est un test statistique non paramétrique qui convient à des fréquences, donc à des proportions, à des pourcentages et à des probabilités. Un phénomène quelconque peut être mesuré selon sa fréquence d'occurrence, sa durée, son intensité ou en fonction d'autres caractéristiques (**Long, 2007**).

- Le test de Chi-deux (Chi- carré) est donc utilisé pour tester l'hypothèse nulle pour les deux analyses statistiques faites :

2.6.1. Analyse statistique des paramètres socio-démographiques et économiques:

Dans cette partie, l'hypothèse nulle d'indépendance **H0** : énonce l'absence de relation entre la carie dentaire et les paramètres décrits dans le questionnaire (**âge, sexe, statut socio-économique, niveau culturel**), et l'hypothèse **H1** : énonce la présence de relation entre la carie dentaire et les paramètres du questionnaire.

L'hypothèse H_0 est **rejetée** si p est inférieur à 0.05 ($p < 0.05$) (**Comer et al., 1994**).

2.6.2. Analyse statistique des paramètres cliniques :

Les deux hypothèses **H0'** et **H1'** sont définis comme suivant :

H0' : l'absence de relation entre la carie dentaire et les paramètres cliniques décrits dans les fiches de questionnaire (**consommation des sucres, fréquence de brossage des dents, douleur des dents, mauvaise haleine, grignotage, Nettoyage inter dentaire**) .

H1' : la présence de relation entre la carie dentaire et les paramètres cliniques.

L'hypothèse H_0 est **rejetée** si p est inférieur à 0.05 ($p < 0.05$) (**Cornier et al., 1994**)

Le calcul des fréquences :

Les fréquences des paramètres de questionnaire ont été calculées selon la formule suivante :

$$\text{Fréquence des paramètres du questionnaire} = \frac{\text{Nombre de sujets qui répondent au paramètre (sociodémographique, économique ou clinique)}}{\text{Nombre total des patients d'une population}}$$

2.7. Prélèvement :

Les prélèvements de la plaque supra-gingivale concernent 50 sujets présentant des dents cariées et 50 sujets indemnes de caries dentaires, ces prélèvements ont été soigneusement effectués dans des conditions d'asepsie, par Dr Ben-yelles (dentiste en Odontologie Conservatrice et Endodontie – université de Tlemcen).

les prélèvements ont été effectués le matin, 12h après le dernier brossage des dents, et 2h après le dernier repas (**Sansone et al., 1993**).

2.7.1. Site et méthode de prélèvement :

Avant de procéder aux prélèvements, des rouleaux de coton stériles sont placés dans les zones des orifices salivaires. Puis, le prélèvement a été fait à l'aide de deux écouvillons stériles pour chaque sujet (un écouvillon pour la coloration de Gram du

prélèvement et l'autre pour la caractérisation bactérienne du biofilm dentaire supra-gingival). Ces derniers ont été frottés sur les surfaces dentaires et inter-dentaires (proximales) de la face vestibulaire des dents maxillaires et mandibulaires (incisives centrales et latérales, canines, prémolaires et les premières et secondes molaires).

L'objectif de l'isolement de la plaque supra-gingivale est de prélever une plaque sans apport exogène organique ou minéral.

Nous avons donné pour chaque patient un chiffre qui figure sur la fiche de questionnaire et sur l'écouvillon propre à lui.

2.7.2. Acheminement des prélèvements :

Les prélèvements accompagnés des fiches de questionnaires sont transportés immédiatement au laboratoire de Chirurgie Expérimentale qui se trouve dans le même bloc de la clinique dentaire. Cela, nous a donné l'opportunité de ne pas utiliser des milieux de transport appropriés (**PORTAGERMS INDISPONIBLES SUR LE MARCHE**).

2.8. Analyse des prélèvements :

Au laboratoire, l'un des deux écouvillons de prélèvement est immédiatement déposé dans un tube Eppendorf contenant 1ml de BHIB (Oxoid®, England) pré-réduit pour préparer les dilutions et l'autre est consacré à un examen microscopique direct.

2.8.1. Examen microscopique des prélèvements :

2.8.1.1. Etat frais :

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

2.8.1.2. Coloration de Gram :

L'examen au microscope du prélèvement après coloration de Gram permet de repérer la prédominance d'un type bactérien (cocci ou bacilles), et de classer les bactéries en deux groupes (Gram positif, Gram négatif) sur base de la perméabilité de leur paroi à l'alcool.

2.8.2. Préparation des dilutions :

La dilution va permettre de réaliser la culture primaire avec une densité moins importante et donc analysable.

- chaque tube Eppendorf contenant la suspension bactérienne préalablement préparée est ensuite homogénéisé pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex.
- à partir de cette suspension mère, faire préparer des dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-4} (**Kenneth, 1973**) dans des tubes Eppendorf contenant 1ml du bouillon BHIB (Oxoid®, England) préréduit.

2.8.3. Ensemencement et incubation :

Le prélèvement est ensemencé pur et dilué à 10^{-2} et 10^{-4} . En faisant transférer 100µl de chaque suspension dans chacune des 4 boîtes de Pétri contenant les milieux sélectifs et non sélectifs pour l'isolement des différents genres bactériens :

- Deux boîtes contenant la gélose Columbia avec 5% de sang (une boîte pour l'isolement des bactéries anaérobies, et l'autre boîte pour l'isolement des bactéries aérobies).
- Une boîte contenant la gélose Chapman pour l'isolement des Staphylocoques.
- Une boîte contenant la gélose MacConkey pour l'isolement des bacilles aérobies à Gram négatif.

Les boîtes ont été incubées à 37 °C sous différents atmosphère (aérobies pendant 24 heures et anaérobies pendant 5-7 jours) selon ses exigences.

2.8.4. Culture bactérienne :

La culture bactérienne est une technique de laboratoire de développement contrôlé des bactéries, pour faciliter l'étude des souches bactériennes.

2.8.4.1. Culture des bactéries aérobies :

Incuber les boîtes de gélose au sang, les boîtes de gélose MacConckey et les boîtes de gélose Chapman en aérobiose à 37°C pendant 24 heures

2.8.4.2. Culture des bactéries anaérobies :

Incuber les boîtes de gélose au sang en anaérobiose à 37°C pendant 5 jours en utilisant une jarre et des sachets générateurs d'anaérobiose (GENbox anaer).

Nous avons réalisé l'anaérobiose en utilisant une jarre (Gaz pack, USA) fermée hermétiquement contenant des sachets générateurs d'anaérobiose GENbox anaer (Biomérieux, France). Ces derniers permettent d'obtenir en une heure au moins une concentration d'oxygène résiduelle de moins de 1% et une concentration en CO₂ d'environ 20%.

Les sachets générateurs GENbox anaer contiennent des composants chimiques (charbon activé, ascorbate de sodium et autres composants organiques et inorganiques). Les compositions gazeuses obtenues dans la jarre (oxygène et dioxyde de carbone) sont ajustées par les quantités des composés chimiques absorbant l'oxygène et libérant le dioxyde de carbone contenus dans chaque sachet.

2.8.5. Repiquage :

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

- prélever chaque colonie d'aspect distinct à l'aide de l'anse de platine stérile (ou pipette pasteur stérile).
- ensemencer les milieux de cultures appropriés par les colonies prélevées.

- incuber les boîtes ensemencées en aérobiose ou en anaérobiose selon les conditions d'incubation des boîtes de prélèvement.

2.8.6. Deuxième repiquage (subculture)

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

2.8.7. Identification phénotypique des isolats :

L'identification bactérienne est effectuée conformément aux critères du **Bergey's manual: (Holt et al., 1994)**, l'aspect microscopique et macroscopique des colonies, les tests biochimiques d'orientation, les galeries biochimiques miniaturisées API et le test de sensibilité des souches aux antibiotiques.

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

2.8.7.1. Etude microscopique

L'examen microscopique des frottis après coloration de Gram oriente le diagnostic.

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

2.8.7.2. Etude macroscopique

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

- Odeur fétide caractéristique des anaérobies
- Aspect morphologique des colonies
- Présence de pigmentations
- Présence ou absence de l'hémolyse

2.8.7.3. Identification biochimique :

Toutes les souches ont été identifiées grâce aux méthodes bactériologiques classiques (production de catalase, l'oxydase), et par les caractères biochimiques à l'aide des galeries API20A, API 20 Strep, API 20 E et API Staph (Biomérieux, France).

- Pour les colonies isolées à partir des boîtes incubées en anaérobiose :
 - Effectuer le test de catalase pour les cocci Gram positif.
 - Les cocci Gram positif sont identifiés par les galeries API20 Strep et les bacilles et coccobacilles sont identifiés par les galeries API 20A.

- Pour les colonies isolées à partir des boîtes incubées en aérobiose :
 - Effectuer le test de catalase pour les staphylocoques isolés à partir du milieu Chapman, ces derniers ont été identifiés par les API Staph.

 - Effectue le test de catalase pour les bactéries isolées à partir des boîtes de gélose au sang incubées en aérobiose pour identifier les différents genres bactériens à l'aide des API 20 E, APIStaph et API 20 Strep.
 - Effectuer le test d'oxydase pour les bactéries isolées à partir du milieu MacConckey, ces dernières ont été identifiées par les galeries API 20 E.

2.8.7.3.1. Test de catalase :

L'enzyme catalase sert à neutraliser les effets bactéricides de peroxyde d'hydrogène (Wheeler, 2008), par la décomposition de ce dernier en eau et en oxygène ($2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{catalase} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Cette réaction se manifeste par la formation rapide de bulles (Clarke and Cowan, 1952 ; MacFaddin, 2000).

Le test de catalase est principalement utilisé pour distinguer les *Staphylococcus spp.* et *Micrococcus spp.* qui sont catalase positive des *Streptococcus spp.* et *Enterococcus spp.*, qui sont catalase négative.

2.8.7.3.2. Test d'oxydase :

Le test de l'oxydase est utilisé pour détecter la présence de cytochrome C oxydase, capable de réduire l'oxygène et des accepteurs d'électrons artificiels. Il est important pour distinguer *Neisseria* et *Moraxella sp.* qui sont des oxydase positif de *Acinetobacter* (oxydase négatif), ainsi que les bactéries entériques (sont toutes oxydase négatif) des pseudomonaceae (oxydase positif) (Prescott et al., 2010).

2.8.7.3.3. Galleries miniaturisées API 20 :

L'identification des bactéries nécessite l'utilisation des galeries miniaturisées prêtes à l'emploi (Galleries commercialisées: API 20 A, et API 20 Srep, API 20 E et API Staph (Biomérieux, France)).

Les galeries API comportent 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans un API Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture (voir Annexe) et l'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification.

2.8.7.4. Test de sensibilité des isolats aux antibiotiques :

Le test de sensibilité des isolats aux antibiotiques est un critère ultime d'identification des souches bactériennes anaérobies. Les isolats ont subis donc des tests de confirmation des résultats de la galerie biochimique en vérifiant leur croissance en présence de certains antibiotiques préconisés par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015).

Le test de sensibilité aux antibiotiques a été réalisé en utilisant les antibiotiques préconisé par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015) : amoxicilline (25µg), amoxicilline associée à l'acide clavulanique (30µg), vancomycine (5µg), kanamycine (1mg), colistine (10µg), et métronidazole (16µg).

-Le test Kana-Vanco-Colistine est préconisé pour les bacilles anaérobies à Gram négatif.

-L'antibiogramme des Streptocoques : amoxicilline (25µg), amoxicilline associée à l'acide clavulanique (30µg), kanamycine (1mg), vancomycine (5µg), colistine (10µg).

Les streptocoques présentent une résistance naturelle de bas niveau (BNR) à tous les aminosides (CA-SFM, 2015).

-Le métronidazol est utilisé pour différencier le genre Fusobacterium (sensible) du genre Capnocytophaga (résistant).

2.8.7.4.1.1. Technique :

- A partir de la suspension bactérienne inoculée dans les galeries API, et à l'aide d'un écouvillon stérile : effectuer un ensemencement par épuisement sur une gélose au sang précoulée dans une boîte de pétri.
- Déposer aseptiquement les disques d'antibiotique sur la gélose ensemencée.
- Incuber les boîtes des souches anaérobies ou anaérobies facultatives en anaérobiose à 37°C pendant 48.

2.8.7.4.1.2. Lecture :

La souche bactérienne peut être définie comme sensible (S), intermédiaire (I), ou résistance (R) (CA- SFM, 2005).

2.9. Analyse statistique des fréquences des isolats bactériens :

L'analyse statistique des fréquences des isolats des plaques supra-gingivales des sujets ayant des caries et indemnes de caries dentaires a été effectuée par le test du khi-carré (χ^2) à l'aide du logiciel SPSS, version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Nous avons adopté l'hypothèse nulle H_0 : Il n'y a pas de différence significative dans la composition bactérienne de la plaque supra-gingivale entre les sujets présentant des dents cariées et les sujets indemnes de lésions carieuses. Contre l'hypothèse H_1 : présence de

différence significative dans la composition bactérienne de la plaque supra-gingivale entre les sujets présentant des dents cariées et les sujets indemnes de lésions carieuses.

L'hypothèse H_0 est **rejetée** si p est inférieur à 0.05 ($p < 0.05$) (Corner et al., 1994)

2.9.1. Calcul des fréquences d'isolement des bactéries aérobies, anaérobies, Gram+ et Gram- :

$$\text{Fréquence des bactéries aérobies, anaérobies, Gram+ et Gram-} = \frac{\text{Nombre de bactéries aérobies, anaérobies, Gram+, Gram- isolées}}{\text{Nombre total des bactéries isolées}}$$

2.9.2. Calcul des fréquences d'isolement des espèces bactériennes :

$$\text{Fréquence d'une espèce bactérienne} = \frac{\text{Nombre de bactéries isolées appartenant à cette espèce}}{\text{Nombre total des patients d'une population}}$$

2.9.3. Calcul des fréquences d'isolement des genres bactériens

$$\text{Fréquence d'un genre bactérien} = \frac{\text{Nombre de bactéries isolées appartenant à ce genre}}{\text{Nombre total des bactéries isolées}}$$

2.10. Evaluation de l'aptitude des isolats à former un biofilm :

Deux méthodes ont été utilisées pour l'évaluation de l'aptitude des isolats bactériens à la production du biofilm dentaire.

2.10.1. La méthode de microplaques de titration

Les microplaques utilisées étaient en polystyrène comportant 96 puits sur lesquelles les bactéries vont adhérer et former un biofilm.

La méthode des microplaques de titration au cristal violet, mise au point par **O'Toole et Kolter (1998)** est une technique très utilisée, pour la formation de biofilms (**Niu et Gilbert, 2004 ; Pierce et al., 2008**). C'est une technique colorimétrique basée sur le principe que le cristal violet se lie de manière proportionnelle à la biomasse du biofilm (**Niu et Gilbert, 2004**).

En effet cette technique de coloration permet de visualiser les cellules qui s'attachent à la surface et se colorent en pourpre avec le cristal violet, alors que les surfaces abiotiques ne sont pas colorées (**Pratt et Kolter, 1998**).

On a effectué la technique de microplaque de titration en utilisant deux milieux (BHIB ET BHIB additionné de 2% de saccharose) pour tester l'effet de saccharose sur le pouvoir de formation de biofilm.

2.10.1. 1. Technique :

-A partir des colonies isolées, effectuer des cultures d'une nuit dans les milieux BHIB et BHIB+2% saccharose.

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

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

-Incuber les microplaques en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures ou en aérobiose à 37°C pendant 24 heures (**Al-Ahmad, 2012**)

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

- sécher les plaques à 60°C pendant 10 mn

-remplir les puits par le crystal violet à 0.1% pendant 10 mn (**Al-Ahmad, 2012**)

-laver les microplaques 3 fois par l'eau distillée

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

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

2.10.1. 2. Lecture :

La lecture de densité optique se fait à l'aide d'un lecteur de microplaques (bioTek, Allemagne) à 570 nm (**Voir annexe N° 2**).

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

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

$$DO_{Min} = DO_{moyenne \text{ du témoin}} + (3 \cdot \delta \text{ de DO du témoin}).$$

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

δ : l'écart type.

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

C1 : souches non productrices de biofilm si $DO < DO_{Min}$

C2 : souches modérément productrices de biofilm si $DO_{Min} < DO < DO_{Max}$.

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

2.10.2. La méthode du Rouge Congo :

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

2.10.2. 1. Technique

- Préparer la gélose Rouge Congo en utilisant : le bouillon BHIB 37 g/L, saccharose 50 g/L, agar 10 g/L et l'indicateur rouge congo 8 g/L.
- Ensemencer en stries une colonie à la surface d'une boîte de gélose Rouge Congo (RCA).
- Incuber les boîtes en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures

2.10.2. 2. Lecture

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

Résultats et discussions**1. Résultats de l'analyse statistique des données du questionnaire :**

50 sujets présentant des dents cariées et 50 indemnes de caries dentaires qui habitent la région de Tlemcen, ont répondu aux critères d'inclusion et d'exclusion et sont alors inclus dans cette étude.

L'âge moyen de la population est de 22.72 ans (± 2.06) pour la population indemne de caries et de 24.91 ans (± 3.98) pour la population à dents cariées, avec une amplitude de 20 à 35 ans.

1.1. Les paramètres sociodémographiques et économiques :

Les fréquences de différents paramètres socio-démographiques et du statut économique, ainsi que les résultats (valeur de P) de l'analyse statistique effectuée sur ces fréquences sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Fréquences des paramètres sociodémographiques (%) et économiques chez les adultes sans et avec dents cariées :

	Sans caries (n=50)	Avec caries (n=50)	Valeur (P)
Tranche d'âge			
20-25	82	62	<0.05
26-30	18	32	
31-35	00	6	
Sexe			
Homme	26	32	>0.05
Femme	74	68	
S E			
Bas	00	6	>0.05
Moyen	70	74	
Elevé	30	20	

Niveau d'étude			
Secondaires	4	26	<0.05
Universitaires	96	74	

SE : Statut économique

*P<0.05 différence statistiquement significative pour les fréquences des paramètres entre les sujets sans et avec caries dentaires.

Des différences significatives entre les adultes avec et sans caries ont été observées pour l'âge (**P <0,05**) et le niveau d'étude (**P <0,05**). Cependant, il n'y avait aucune différence significative pour le sexe (**P > 0,05**) et le statut économique (**P > 0,05**).

1.1.1. Répartition selon l'âge et le sexe :

Ce travail a concerné 100 adultes des deux sexes âgés de 20 à 35 ans. Les données fournies par le questionnaire ont révélé qu'il y a 13 hommes (26%) et 37 femmes (74%) dans le groupe des sujets indemnes de caries. 41 (82%) personnes appartiennent à la tranche d'âge 20-25 ans et 9 (18%) sujets sont âgés de 25 à 30 ans. Dans le second groupe, il y a 16 (32%) hommes et 34 (68%) femmes, 31 (62%) d'entre eux sont âgés de 20 à 25 ans, 16 (32%) appartiennent à la tranche d'âge 25-30 ans et les personnes âgées de 30-35 ans représentent 6% (3) de cette population (**Tableau 2**). La tranche d'âge de 20-25 ans est la plus représentée dans cette étude et constitue 82% pour la population indemne de caries et 62% pour la deuxième population. L'explication plausible de la haute prévalence des caries chez la population âgée de 20-25 ans réside dans le fait que les habitudes alimentaires se modifient d'un régime équilibrée aux collations intermédiaires qui modifient constamment l'équilibre basique du milieu buccal et donc engendrent la déminéralisation des dents, on peut incriminer également le manque de brossage des dents à cause de l'allongement des heures de travail et d'étude.

L'analyse statistique montre qu'aucune association significative n'a été notée entre l'atteinte carieuse et la variable sexe, ceci concorde avec plusieurs études à travers le monde (**Hallett et O'Rourk, 2002; Shang et al., 2008 ; Mahejabeen et al., 2006**), alors que d'autres études (**Sufia et al., 2011**) ont confirmé cette association. L'absence de cette association est

peut être dû au fait que notre population est constituée essentiellement des universitaires, qui ont presque les mêmes habitudes alimentaires et les mêmes pratiques d'hygiène bucco-dentaires. De même, la prévalence de la carie dentaire était importante chez les femmes (68%) par rapport aux hommes (32%) pour les deux populations, ces résultats étaient cohérents avec ceux de **Lukacs (2011)**, **Doyal et Naidoo (2010)** et **Ferraro et Vieira (2010)**. Cette prévalence élevée chez les femmes peut être due à une composition et un taux salivaire différents, aux fluctuations hormonales pendant la grossesse, aux habitudes alimentaires, et notamment le rôle social des femmes dans leurs familles (la préparation des repas) (**Ferraro et Vieira, 2010**). D'autres études ont proposé que les effets différentiels des gènes qui influencent la carie dentaire peuvent expliquer les différences observées entre les deux sexes (**Vieira et al., 2010 ; Shaffer et al., 2015**).

1.1.2. Répartition selon le statut économique

Parmi les sujets indemnes de caries dentaires, 15 (30%) sujets appartiennent à une classe sociale élevée et 35 (70%) à une classe sociale moyenne. Tandis que, dans le deuxième groupe, 20% (10) des personnes appartiennent à une classe sociale élevée, 74% (37) à une classe sociale moyenne et 6% (3) à une classe sociale pauvre (**Tableau 2**).

L'analyse statistique a montré l'absence d'association significative entre le statut économique et la prévalence de carie en Algérie (**p > 0,05**). Dans les pays développés, une relation inverse entre le statut économique et la prévalence des caries a été signalée, dans laquelle, la haute prévalence des caries a été trouvée dans les catégories socio-économiques les plus faibles, les zones les moins riches et certaines minorités ethniques (**Reisine et Psoter, 2001 ; Truin et al., 1998**). Dans notre étude, l'absence de cette relation est peut être expliquée par l'accessibilité aux services de soins dentaires par tous les niveaux socio-économiques grâce à la gratuité des services médicaux.

1.1.3. Répartition selon le niveau d'étude :

Sur la totalité des sujets interrogés, les sujets qui ont fait des études universitaires représentent 96% de la population indemne de caries dentaires contre 74% de la population à dents cariées. L'analyse statistique montre que la fréquence des sujets ayant un niveau d'étude secondaire

était statistiquement très significative ($P < 0,05$) par rapport à ceux qui ont un niveau d'étude universitaire (**Tableau 2**). Le faible niveau d'étude est donc associé à un risque accru d'atteinte carieuse, Ceci est en accord avec de précédentes études suggérant que le faible niveau d'étude est statistiquement associé avec la forte prévalence de carie dentaire (**Costa et al., 2012 ; Paulander et al., 2003**), du fait que le haut niveau d'étude implique la meilleure connaissance de la maladie et la prise de mesure adéquates de prévention.

1.2. Les paramètres cliniques :

Les fréquences des différents paramètres cliniques pour les sujets avec et sans caries sont présentées dans le tableau ci-dessous (**Tableau 3**).

Tableau 3. Fréquences des paramètres cliniques (%) chez les adultes sans et avec dents cariées :

Paramètres cliniques	Sans carie NC (n=50)	Avec carie C (n=50)	Valeur de P
Consommation de sucre			
Oui	30	80	< 0.05
Non	70	20	
Fréquence de brossage des dents			
Irrégulier	2	50	
1 fois/ jour	8	28	<0.05
2 fois/ jour	62	22	
Plus que 2 fois par jour	28	0	

Douleur des dents			
Oui	0	46	<0.05
Non	100	54	
Mauvaise haleine			
Oui	6	32	<0.05
Non	94	68	
Grignotage entre les repas			
Oui	54	56	>0.05
Non	46	44	
Nettoyage inter dentaire			
Soie dentaire (S)	24	0	
Cure-dents (C)	6	8	<0.05
Brosse inter dentaire	12	2	
Combinaison (S+C)	20	8	
Rien utilisé	38	82	

*P<0.05 différence statistiquement significative entre les fréquences des paramètres pour les sujets sans et avec caries dentaires.

L'analyse statistique des différentes fréquences des paramètres cliniques fournies par le questionnaire a montré des différences significatives entre les adultes avec et sans caries pour la consommation de sucre (**P <0,05**), la mauvaise haleine (**P <0,05**), la fréquence de brossage des dents (**p<0,05**), les douleurs des dents (**p<0,05**) et le nettoyage inter dentaire (**p<0,05**). Cependant, il n'y avait aucune différence significative pour le grignotage entre les repas (**p>0,05**) (Tableau 3).

1.2.1. Répartition selon la fréquence de consommation des sucres :

La fréquence de consommation de sucres est plus importante chez les adultes ayant des dents cariées (80%) que chez les adultes indemnes de carie (30%) ($P < 0,05$) (Figure 7)

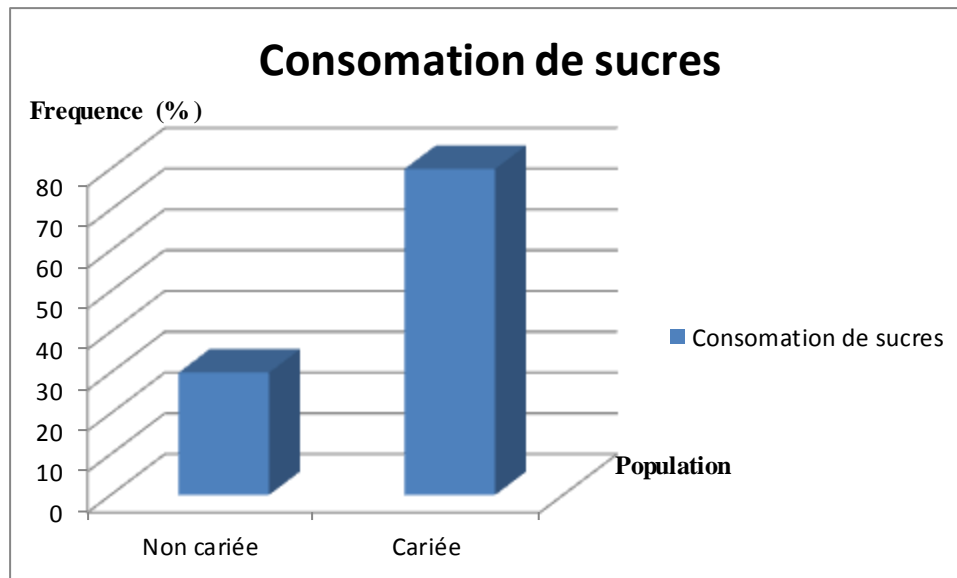


Figure 7. Les fréquences de consommation de sucre pour les deux populations

Le rôle causal du sucre dans la carie dentaire est évident et la relation de cause à effet entre sucre et carie est connue depuis fort longtemps (Dargent-Pare et Levy, 2001 ; Triller, 1990), l'analyse statistique des fréquences de consommation de sucres pour les deux populations incluses dans cette étude a confirmé ce constat ($P < 0,05$) et une augmentation importante de la prévalence de consommation de sucre a été notée pour la population à dents cariées (80%).

L'allongement des heures de travail et d'étude entraîne des modifications des habitudes alimentaires de la société algérienne au profit d'un régime glucidique (des collations sucrées, la consommation de boissons sucrées et le grignotage). Les glucides et tout particulièrement le saccharose confèrent au régime alimentaire son potentiel acidogène (Miller et al., 2000; Zero, 2004). Les prises sucrées répétées en dehors des repas entraînent une chute de pH salivaire créant un environnement favorable à la formation des caries alors que les grandes quantités de sucres consommés au cours des repas n'entraînent pas de carie (Dargent-Pare et

Levy, 2001). Il est ainsi intéressant de conseiller au patient de consommer le sucre en fin de repas et d'éviter les grignotages (Blique, 1998 ; Sanders, 2004).

1.2.2. Répartition selon la fréquence de brossage :

Quatre-vingt-dix-huit pour cent (98%) des sujets indemnes de caries se brossaient quotidiennement les dents. Parmi eux, Soixante-deux pour cent (62%) indiquent se brosser les dents deux fois par jour. Alors que, 50% des sujets à dents cariées se brossaient les dents irrégulièrement ce qui est insuffisant pour assurer une bonne hygiène bucco-dentaire (Figure 8).

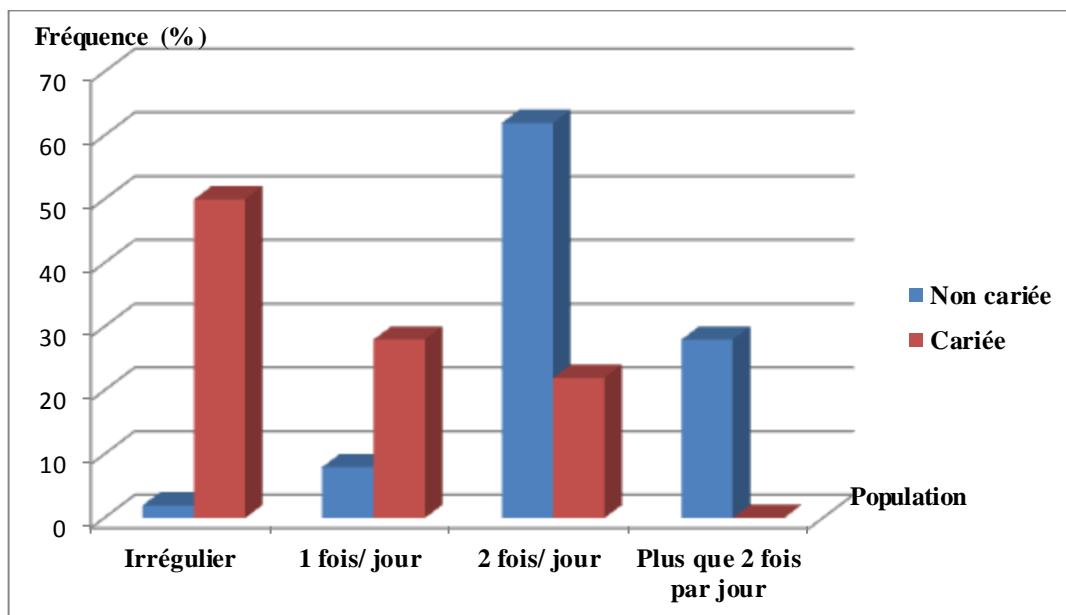


Figure 8. Les fréquences de brossage des dents pour les deux populations

L'analyse statistiques des fréquences de brossage des dents des deux populations révèle une association significative entre la fréquence de brossage des dents et la carie dentaire ($P < 0,05$) (Tableau 3). De ce fait, Il est admis aujourd'hui que pour agir efficacement contre l'accumulation de la plaque, le brossage doit être effectué après les repas. Le brossage du soir est également le plus important dans la mesure où, durant la nuit, la sécrétion salivaire diminue ; or la salive participe entre autres à la protection des dents. L'hygiène bucco-dentaire a pour objectif d'éliminer la totalité de la plaque bactérienne dont la présence est indispensable au développement de la carie (Muller et al., 1997).

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

24% des adultes sans carie dentaire utilisent le fil dentaire et 38% de ce même groupe utilisent la soie dentaire en combinaison avec le cure-dent. Le nettoyage des espaces inter dentaires à l'aide de fil dentaire ou de brossettes est essentiel pour prévenir les caries proximales et diminuer la charge bactérienne localisée entre les dents.

1.2.3. Répartition selon la douleur ressentie des dents :

Dans cette analyse, l'étude de l'association entre la douleur des dents et la prévalence de la carie dentaire concerne les deux populations. Les sujets ayant ressenti une douleur dentaire représente 46% de la population à dents cariées alors qu'aucun sujet n'a déclaré ressentir des douleurs dentaires pour la population contrôle (indemnes de caries) (Figure 9).

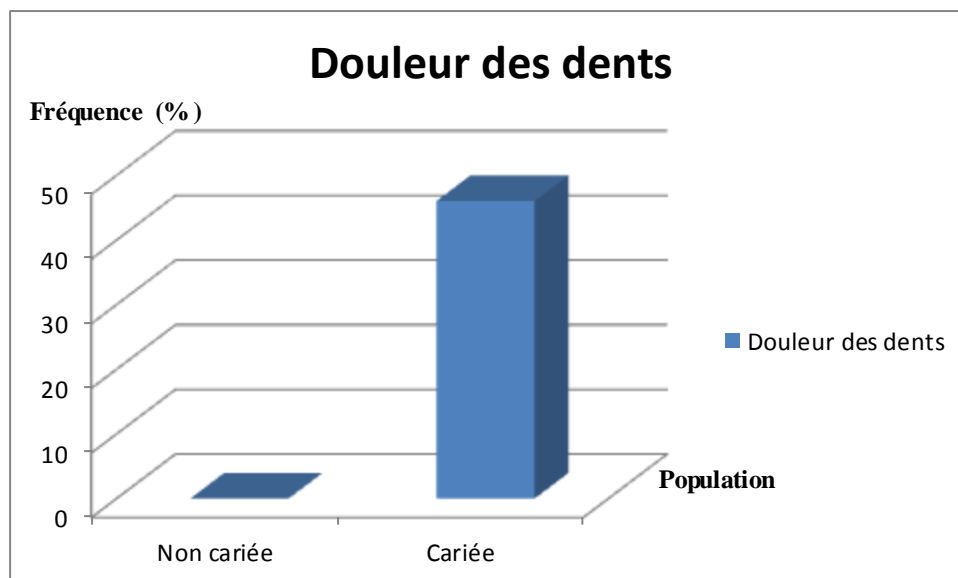


Figure 9. Les fréquences des douleurs ressenties des dents pour les deux populations

L'analyse statistique des données a donné une valeur de (P) inférieur à 0.05, ce qui indique la présence d'une association significative entre l'atteinte carieuse et les douleurs des dents (Tableau 3). Une étude a démontré que la consommation de sucres chez l'adulte est associée à une augmentation de l'indice CAOOF (Heller et al., 2001) suite à l'accélération du processus

carieux et/ou de déminéralisation dentaire menant rapidement à la perception de douleurs dentaires (Bamise et al., 2010).

1.2.4. Répartition selon la mauvaise haleine :

Pour la présente étude, l'analyse statistique des fréquences a indiqué que la mauvaise haleine était significativement plus élevée chez les sujets présentant des dents cariées (32%) que chez des sujets sans caries dentaires (6%) ($P < 0.05$) (Figure 10).

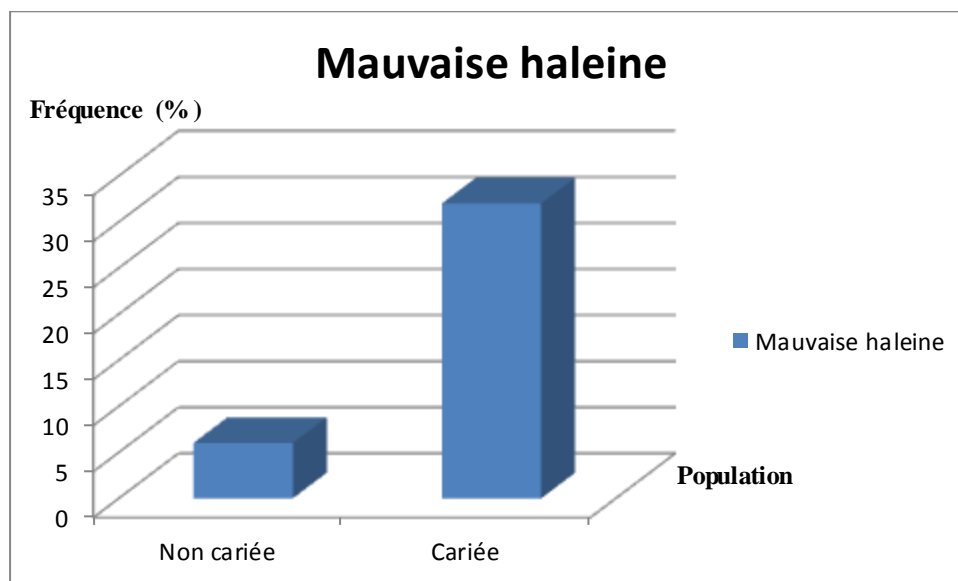


Figure 10. Les fréquences de la mauvaise haleine chez les deux populations

La carie dentaire et les maladies parodontales sont des facteurs potentiels qui contribuent à la mauvaise haleine. Le manque d'hygiène bucco-dentaire, y compris le manque de brossage dentaire, la non utilisation des bains de bouche anti-plaque et la soie dentaire, est un facteur de risque de la mauvaise haleine (Pratibha et al., 2006).

1.2.5. Répartition selon le grignotage entre les repas :

L'analyse statistique effectuée dans cette étude nous a permis de constater qu'il n'y avait pas d'association significative entre le grignotage entre les repas et la carie dentaire ($P = 0,841$) (Figure 11).

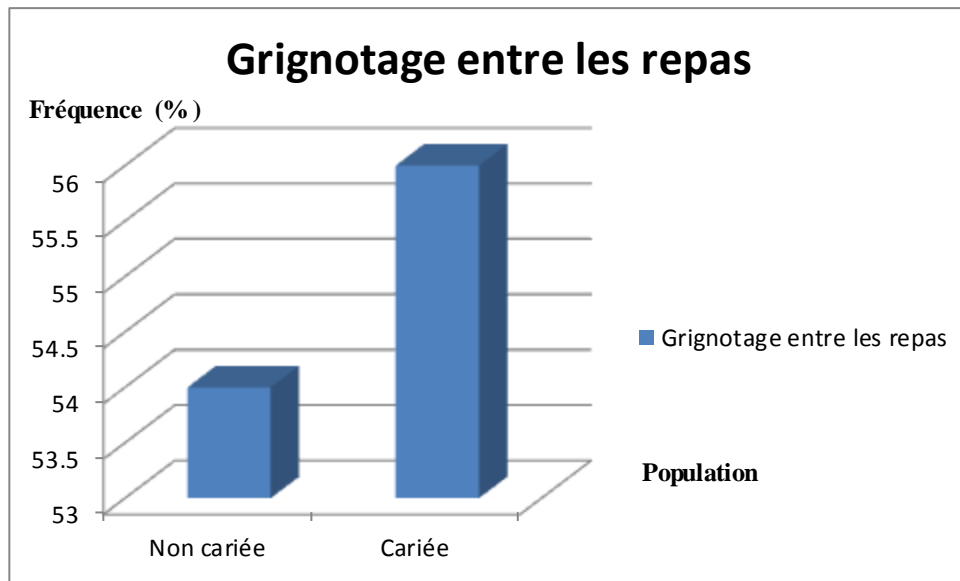


Figure 11. Les fréquences de grignotage entre les repas chez les deux populations

D'après **Mejean (2001)**, quatre repas étaient traditionnellement répartis au cours du nycthémère : le matin (petit déjeuner), à midi (repas principal), en milieu d'après midi (goûter) et le soir (souper). L'éloignement entre les lieux de travail et de domicile et l'allongement des temps de travail et d'étude induit la réduction voir la suppression du petit déjeuner et du goûter. La substitution à ces deux prises de multiples collations induit l'apparition du grignotage. Cette culture a fortement déteint sur la culture algérienne. Sur ce contexte, des auteurs ont suggéré que les prises alimentaires diminuent le pH salivaire pendant 30 à 60 minutes (**Droz et Blique, 1999**). De ce fait, plus les ingestions sont répétées plus la production d'acides est fréquente et prolongée, le pouvoir tampon de la salive est alors débordé et la déminéralisation des dents s'intensifie. Alors, l'absence d'association significative entre le grignotage et la carie dentaire ($P > 0.05$) est liée au temps d'exposition des micro-organismes aux sucres fermentescibles et non pas à la fréquence d'ingestion par jour, ce qui est en corrélation avec les résultats d'autres auteurs (**Bowen et al., 1983**).

2. Résultats de l'analyse des prélèvements :

2.1. Résultats de l'examen microscopique des prélèvements :

L'analyse microscopique de tous les prélèvements des plaques supra-gingivales révèle un polymorphisme de la flore bactérienne pour les deux populations.

2.1.1. L'état frais des prélèvements

L'état frais de tous les prélèvements des plaques supra-gingivales des deux populations nous a permis de constater que la microflore bactérienne de ces derniers est polymorphe avec une absence des bactéries mobiles. Des études antérieures ont considéré que le grand nombre des bactéries anaérobies à Gram négatif mobiles est un signe de lésions parodontales (Noiri et al., 2001), cela justifie probablement l'absence de ces bactéries dans nos prélèvements.

2.1.2. La coloration de Gram

L'observation par la coloration de Gram nous a permis de recenser les mêmes paramètres cités à l'état frais à l'exception de la mobilité. Et dans ce contexte s'ajoute la différenciation entre bactéries Gram positif et négatif. La coloration de Gram des prélèvements dentaires des sujets ayant ou indemnes des lésions carieuses nous a permis de constater que les morphotypes Gram positif sont plus observés que les Gram négatif pour les deux cas, ce qui est en accord avec les résultats d'une étude antérieure (Rozkiewicz, 2006). De même, les cocci étaient prédominants par rapport aux bacilles pour tous les prélèvements analysés (Voir Figure 12 et Figure 13).

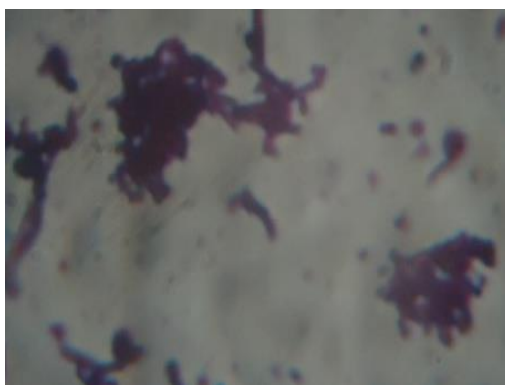


Figure 12. Photo de la coloration de Gram d'un prélèvement supra-gingival chez un sujet indemne de carie dentaire

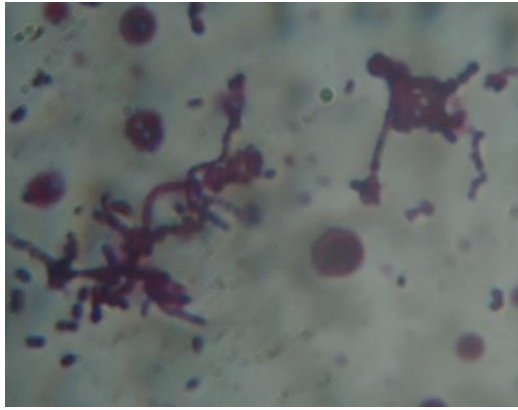


Figure 13. Photo de la coloration de Gram d'un prélèvement supra-gingival chez un sujet présentant des dents cariées

2.2. Résultats de l'identification phénotypique des isolats :

Les bactéries ont été cultivées, repiquées et identifiées grâce aux tests biochimiques et enzymatiques. En outre, le test de croissance des bactéries en présence des antibiotiques est considéré comme un critère ultime d'identification pour les bactéries anaérobies et anaérobies facultatives.

Les résultats des études microscopiques par coloration de Gram, des tests biochimiques (catalase, oxydase et des plaques API) ainsi que la sensibilité des isolats aux antibiotiques sont regroupés par genre bactérien obtenu (**Voir Annexe N° 4**) :

2.2.1. Les bactéries Gram+ isolées et identifiées:

2.2.1.1. Les cocci Gram+ aérobies et aéro-anaérobies facultatifs

Les cocci Gram positif aérobies et aéro-anaérobies facultatifs ont été isolés après mise en culture des prélèvements en aérobiose sur gélose au sang et sur gélose Chapman (pour les staphylocoques) à 37°C pendant 24 heures et en anaérobiose sur gélose au sang à 37 °C pendant 5 à 7 jours.

Résultats et Discussion

Après examen microscopique par coloration de Gram, les bactéries ont subi un test de catalase. Les cocci Gram+ catalase+ ont été identifiés par le biais des mini-galeries API 20 Staph et les cocci Gram+ catalase- ont été identifiés à l'aide des mini-galeries API 20 Strep.

Pour les bactéries à catalase négatif isolées à partir de gélose au sang, l'hémolyse β doit être notée pour une bonne identification par les mini-galeries API 20 Strep.

Les cocci Gram+ catalase- isolés sont : *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus acidomonimus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus intermedius*, *Gemella morbillorum*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Lactococcus lactis ssp lactis*, *Lactococcus lactis ssp cremoris*

Les cocci Gram+ catalase+ isolés sont : *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus sp.*

2.2.1.1.1. Streptococcus :

Ce sont des cocci en chainettes, Gram+, immobiles, catalase-, oxydase-, aéro-anaérobies. facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 Strep et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 4 et Tableau 5**).

Tableau 4. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des streptocoques :

espèce	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	ARB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC	hémolyse β
<i>S.sanguinis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>S.acidomonimus</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>S.constellatus</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+

Résultats et Discussion

<i>S.agalactiae</i>	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>S. uberis</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. oralis</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>S. anginosus</i>	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-

Tableau 5. Résultats de la sensibilité des Streptocoques aux antibiotiques:

souches	AMC	AMX	VA	KAN	COL
	30µg	25µg	5µg	1mg	10µg
<i>S.sanguinis</i>					
<i>S.acidomonimus</i>	S	S	S	R	R
<i>S.constellatus</i>	S	S	S	R	R
<i>S.agalactiae</i>	S	S	R	R	S
<i>S. uberis</i>	S	S	S	R	S
<i>S. mutans</i>	S	S	R	R	S
<i>S. oralis</i>	S	S	S	R	S
<i>S. anginosus</i>	S	S	R	R	R
<i>S. intermedius</i>	S	S	S	R	S

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA : Vancomycine, KAN : Kanamycine, COL: Colistine.

Les tableaux listés ont montré l'isolement de 9 espèces du genre Streptococcus (*S.sanguinis*, *S.acidomonimus*, *S.constellatus*, *S.agalactiae*, *S. uberis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. anginosus*, *S. intermedius*). L'incubation de ces dernières en présence des antibiotiques révèle une résistance à la kanamycine ainsi qu'une sensibilité vis-à-vis l'Amoxicilline et l'Amoxicilline

+Acide Clavulanique, ce qui est conforme aux données rapportées par le Comité de l'ANTIBIOGRAMME de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM, 2015) (Tab.5).

Les streptocoques buccaux ont été organisés en 4 groupes : mutans (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. ratti.*), salivarius (*S. salivarius*, *S. vestibularis*), anginosus (*S. constellatus*, *S. intermedius*, *S. anginosus*) et mitis (*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. mitis*,...) (Guillaume et Marc, 2011). Un certain nombre d'espèces qui appartiennent au genre *Streptococcus* sont considérées comme des colonisateurs précoces de la cavité buccale (Lamont et Jenkinson, 2010). *Streptococcus mitis biovar 1*, *S. oralis*, et *S. salivarius* sont les organismes pionniers de la cavité buccale des nouveau-nés et colonisent les muqueuses (Pearce et al., 1995). *Streptococcus sanguinis* et *S. mutans* s'établissent dans la bouche seulement après l'éruption des dents (Caufield et al. 1993; Smith et al. 1993; Tappuni et Challacombe, 1993; Kononen et al., 2002). Alors que, les espèces *S. mutans* et *S. sobrinus* joueraient un rôle prédominant dans la formation des caries dentaires et ont aussi été associées aux endocardites et autres infections du cœur (Mitchell, 2003; Banas, 2004; Kuramitsu, 2006). *Streptococcus mutans* est rapportée comme étant principalement associé aux caries coronaires, tandis que *S. sobrinus* est plutôt associée aux caries des surfaces lisses (Loesche, 1986). L'association entre *Streptococcus mutans* et la carie dentaire provient de la forte corrélation généralement observée lors d'études épidémiologiques entre la présence de *S. mutans* et celle de caries, et en contre partie, de la faible abondance de bactéries *S. mutans* retrouvées en l'absence de caries (Loesche, 1986).

En fait, un déterminant majeur dans l'apparition des caries semble être le régime alimentaire, particulièrement la consommation de sucrose favorisant la formation de glucanes insolubles dans l'eau par les streptocoques mutans, ce qui assure la colonisation et le maintien des bactéries sur les dents par la formation d'un biofilm (Lingstrom et al., 2000; Zero, 2004; Paes Leme et al., 2006). L'acide produit par la métabolisation des sucres déminéralise l'émail des dents. L'acidogénicité et l'acido-résistance associées à la production de glucanes insolubles constituent les principaux facteurs de virulence des streptocoques mutans.

2.2.1.1.2. Gemella :

Ce sont des cocci en amas, Gram+, catalase-, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 Strep et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 6.** et **Tableau 7**).

Tableau 6. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) des espèces du genre Gemella :

espèce	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC	hémolyse β	
<i>G.morbilorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>G.haemolysans</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

Tableau 7. Résultats de la sensibilité de Gemella aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>G.haemolysans</i>	S	S	S	S	S
<i>G.morbilorum</i>	S	S	S	S	S

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine.

Deux souches du genre Gemella ont été isolées (*G.haemolysans* et *G.morbilorum*), ces dernières présentaient une sensibilité à l'ensemble des antibiotiques testés.

Les espèces du genre Gemella ont été détectées dans les plaques dentaires des sujets indemnes de caries et des sujets à dents cariées. Ces espèces sont des constituants de la flore normale de

la plaque dentaire (Zaura et Mira, 2015 ; Ziouani et al., 2015). De plus, cette bactérie s'est avérée présente dans la plaque dentaire des enfants ayant des dents cariées (Ma et al., 2015).

2.2.1.1.3. Enterococcus :

Ce sont des cocci en amas, Gram+, catalase-, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 Strep et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 8 et Tableau 9).

Tableau 8. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) d'*Enterococcus faecium* :

espèce	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC	hémolyse β	
<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

Tableau 9. Résultats de la sensibilité d'*Enterococcus faecium* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>E. faecium</i>	S	S	S	R	S

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA : Vancomycine, KAN : Kanamycine, COL: Colistine .

L'espèce *Entérocooccus faecium* a été isolée à partir des prélèvements des plaques supra-gingivales des deux populations incluses dans notre étude, cette souche est connue comme étant résistante aux aminosides et de ce fait à la kanamycine (CA-SFM, 2015 ; Archambaud and Clave, 2008), cette résistance naturelle a été confirmée chez nos isolats (Tableau 9).

Résultats et Discussion

Les entérocoques font partie de la flore normale de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils peuvent également coloniser la bouche, les voies respiratoires supérieures, le vagin ou la région périnéale (Murray, 1990 ; Lewis et Zervos, 1990). elles sont connues pour être acidogènes et aciduriques et ne sont pas souvent observées dans la cavité buccale humaine (Tanzer et al., 2001). Le rôle d'*Enterococcus faecium* dans le processus carieux a été démontré suite aux travaux de Candids et Leslie en (2012). En outre, cette bactérie a été isolée à partir des prélèvements des plaques supragingivales et sous-gingivales des adultes Algériens sains de l'ouest Algérien avec des fréquences de 15.4% et 13.85% respectivement (Ziouani et al., 2015).

2.2.1.1.4. Aerococcus :

Ce sont des cocci Gram+, catalase-, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 Strep et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 10 et Tableau 11).

Tableau 10. Résultats des tests biochimiques (API 20 Strep) d'*Aerococcus viridans* :

espèce	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC	hémolyse β	
<i>A. viridans</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+

Tableau 11. Résultats de la sensibilité d'*Aerococcus viridans* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>A.viridans</i>	S	S	S	S	S

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA : Vancomycine, KAN : Kanamycine, COL: Colistine.

L'identification phénotypique des prélèvements issus des plaques supra-gingivales des deux populations incriminées dans cette étude nous a permis d'isoler la souche *Aerococcus viridans*, sensible à tous les antibiotiques testés. Cependant, il n'y a quasiment pas de données citant la présence de cette souche dans la microflore bucco-dentaire sauf dans l'étude réalisée par **Ziouani et al. en 2015** confirmant la présence de cette souche dans les prélèvements des plaques supragingivales et sous-gingivales des adultes Algériens sains. De ce fait, la souche *Aerococcus viridans* s'avère être spécifique à notre échantillon de population adulte de l'ouest Algérien.

2.2.1.1.5. Lactococcus:

Ce sont des cocci Gram+, catalase-, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs

Les résultats des plaques API 20 Strep et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 12 et Tableau 13**).

Tableau 12. Résultats des tests biochimiques (API20 Strep) de *Lactococcus lactis ssp cremoris* :

espèce	VP	HIP	ESC	PYRA	AGAL	BGUR	BGAL	PAL	LAP	ADH	RIB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLYC	hémolyse β
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-

Tableau 13. Résultats de la sensibilité de *Lactococcus lactis ssp.* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>Lactococcus lactis ssp.</i>	S	S	R	R	S

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine.

Les tableaux listés indiquent l'isolement de l'espèce *Lactococcus lactis ssp cremoris* à partir des prélèvements des plaques dentaires des deux populations, ce qui est en corrélation avec les résultats d'une étude antérieure révélant la présence de cette souche dans les plaques dentaires issus des enfants avec ou sans dents cariées (**Tanner et al., 2011**). De plus, le test de la sensibilité aux antibiotiques de la présente souche (**Tableau 13**) montre sa résistance à la Vancomycine et la Kanamycine avec sa sensibilité à la pénicilline (Amoxicilline) conformément aux résultats de l'antibiogramme du Lactococcus établi dans une autre étude (**Mofredj et al., 2006**).

2.2.1.1.6. Staphylococcus :

Ce sont des cocci Gram+ en grappes de raisin, catalase+, oxydase-, immobile, aéro-anaérobies facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 Staph figurent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 14**).

Tableau 14. Résultats des tests biochimiques (Api 20 Staph) des Staphylococcus :

Espèce	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>S. hominis</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-

L'identification phénotypique des colonies isolées à partir du milieu Chapman révèle la présence de deux souches appartenant au genre *Staphylococcus* (*S. aureus* et *S.hominis*) dans les plaques supragingivales des sujets présentant ou indemnes de lésions carieuses, Ces données corroborent avec celles rapportées dans des travaux antérieurs (**Ohara-Nemoto, 2008 ; Ooshima, 1992 ; Munson et al., 2004 ; Rozkiewicz et al., 2006**).

2.2.1.1.7. Micrococcus :

Ce sont des cocci en paires, Gram+, catalase+, oxydase+, immobile, aérobies.

Les résultats des plaques API 20 Staph figurent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 15**).

Tableau 15. Résultats des tests biochimiques (Api 20 Staph) de *Micrococcus sp.* :

espèce	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE	GLU	FRU	
<i>Micrococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

La souche *Micrococcus sp.* a été isolée à partir des prélèvements issus des deux populations, conformément à ce qui est rapporté dans une étude antécédente sur l'isolement de cette souche à partir des prélèvements des plaques supragingivales des enfants avec ou sans dents cariées (**Rozkiewicz et al., 2006**).

2.2.1.2. Les bacilles Gram+ anaérobies :

Ces bactéries ont été isolées après mise en culture des prélèvements en anaérobiose sur gélose au sang à 37°C pendant 5 à 7 jours.

Après examen microscopique par coloration de Gram les bactéries ont été identifiées par le biais des mini-galeries API 20A.

Résultats et Discussion

Les bacilles Gram+ anaérobies isolés sont : *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, *Propionibacterium propionicum*, *Eubacterium limosum*.

2.2.1.2.1. Actinomyces:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 16 et Tableau 17**).

Tableau 16. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) des Actinomyces :

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>A. naeslundii</i>	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>A. meyeri</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. israelii</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>A. viscosus</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tableau 17. Résultats de la sensibilité des Actinomyces aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>A. naeslundii</i>	S	S	S	S	R	R
<i>A. meyeri</i>	R	S	S	R	R	R
<i>A. israelii</i>	S	S	S	S	S	R
<i>A. viscosus</i>	S	S	S	S	S	R

Résultats et Discussion

AMX : Amoxicilline, **AMC** : Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA** : Vancomycine, **KAN** : Kanamycine, **COL**: Colistine, **MTZ** : Métronidazole.

L'identification phénotypique des prélèvements issus des deux populations étudiées montre la présence de quatre souches du genre Actinomyces (*A. naeslundii*, *A. meyeri*, *A. israelii* et *A. viscosus*), résistantes au métronidazole, cette résistance naturelle au métronidazole concerne toutes les espèces du genre Actinomyces (CA-SFM, 2015).

Nos résultats sont en accord avec ceux publiés par **Takahashi en 2005**, qui montre la prédominance des Actinomyces en présence et en absence de lésions carieuses. Ces bactéries adhèrent à la surface des dents par fixation des adhésines (situées sur les surfaces des cellules bactériennes) sur les récepteurs contenus principalement dans le revêtement salivaire de la surface dentaire (Kolenbrander, 1993) et sont connues comme colonisateurs précoces de la plaque dentaire (Lu et Levin, 2002) contribuant par ses activités métaboliques à la création des conditions d'acidité et d'anaérobiose (Takahashi, 2008).

2.2.1.2.2. Lactobacillus :

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 18 et Tableau 19).

Tableau 18. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de *Lactobacillus acidophilus* :

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

Tableau 19. Résultats de la sensibilité de *Lactobacillus acidophilus* aux antibiotiques.

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	S	S	S	S	R	S

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine, **MTZ:** Métronidazole.

Dans la présente étude, Les souches de *Lactobacillus acidophilus* isolées présentaient une résistance à la Colistine et une sensibilité à la Vancomycine, conformément aux résultats de l'antibiogramme des lactobacilles, et dont, seules les *Lactobacillus* hétérofermentaires (*Lactobacillus fermentum*) sont résistantes aux glycopeptides (Vancomycine) (CA-SFM, 2015).

La présence d'un nombre important des Lactobacilles dans les plaques supra-gingivales des deux populations incluses dans cette étude est conforme aux données signalées par **Candids et Leslie en 2012**. Les lactobacilles métabolisent rapidement les sucres alimentaires, puis, les acides produits par ces derniers créent un environnement propice pour leur croissance et causent à la suite la décalcification des dents (Marsh, 2006). En outre, des travaux antérieurs ont démontré l'association entre l'augmentation des proportions de bactéries acidogènes et aciduriques comme les lactobacilles et la carie dentaire (Munson et al., 2004; Caufield et al. 2007).

2.2.1.2.3. Bifidobacterium:

Ce sont des bacilles courts ramifiés en deux branches, Gram+, catalase-, oxydase-, immobile, anaérobies.

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 20 et Tableau 21).

Tableau 20. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de *Bifidobacterium spp.*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Bifidobacterium spp.</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+

Tableau 21. Résultats de la sensibilité de *Bifidobacterium spp.* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>Bifidobacterium spp.</i>	S	S	S	S	R	S

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA : Vancomycine, KAN : Kanamycine, COL: Colistine, MTZ : Métronidazole.

Les souches de *Bifidobacterium spp.* isolées à partir des prélèvements des deux populations présentent une sensibilité à la Vancomycine et une résistance à la Colistine, ces mécanismes de croissance en présence de ces deux antibiotiques sont conformes à ce qui a été rapporté par le comité de l'antibiotique de la société française de microbiologie (CA-SFM, 2015).

Le genre *Bifidobacterium* est considéré comme un constituant de la microflore normale des dents (Tanner et al., 2011 ; Rozkiewicz et al., 2006) ce qui explique son isolement à partir des plaques des sujets indemnes de caries. De plus, des études antérieures ont démontré le caractère acidogène des bifidobactéries qui leur confère un rôle primordial dans le processus carieux (Beighton et al. , 2008 ; Modesto et al., 2006 ; Van Houte et al., 2006)

2. 2.1.2.4. Propionibacterium:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 22 et Tableau 23).

Tableau 22. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) de *Propionibacterium propionicum*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Propionibacterium propionicum</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

Tableau 23. Résultats de la sensibilité de *Propionibacterium propionicum* aux antibiotiques:

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>Propionibacterium propionicum</i>	S	S	S	S	S	R

AMX : Amoxicilline, AMC : Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA : Vancomycine, KAN : Kanamycine, COL: Colistine, MTZ : Métronidazole.

Pour la présente étude, les souches appartenant au genre *Propionibacterium* présentaient une résistance au Métronidazole, Conformément aux données de la littérature (CA-SFM, 2015).

Les souches du genre *Propionibacterium* ont été isolées à partir des prélèvements dentaires des sujets avec ou sans lésions carieuses, ces résultats corroborent avec ceux mentionnés dans d'autres études (Preza et al., 2008 ; Tanner et al., 2011 ; Munson et al., 2004).

2.2.1.2.5. Eubacterium:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 24 et Tableau 25).

Tableau 24. Résultats des tests biochimiques (Api 20 A) d'*Eubacterium limosum*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Eubacterium limosum</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+

Tableau 25. Résultats de la sensibilité d'*Eubacterium limosum* aux antibiotiques:

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>Eubacterium limosum</i>	S	R	S	S	R

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine.

Les résultats du test de sensibilité aux antibiotiques des souches *Eubacterium limosum* isolées en faible quantité seulement à partir des prélèvements de plaques supra-gingivales des sujets à dents cariées montrent la résistance de ces dernières à la colistine conformément à ce qui a été rapporté par le comité de l'antibiotique de la société française de microbiologie (**CA-SFM, 2015**). Cette souche a été aussi présente dans les prélèvements des dents cariées ou saines effectué dans d'autres études (**Rozkiewicz et al., 2006 ; Preza et al., 2008 ; Tanner et al., 2011**)

2.2.2. Les bactéries Gram négatif isolées et identifiées:

2.2.2.1. Les bacilles Gram négatif aérobies

Les bacilles Gram négatif aérobies ont été isolés à partir des boîtes de gélose au sang incubées en aérobiose à 37°C pendant 24 heures et de gélose MacConkey incubées en aérobiose à 37°C pendant 24 heures.

Les bacilles isolés à partir de gélose au sang et MacConkey incubés en aérobiose sont identifiés par les mini-galeries API20E.

D'autres bactéries isolées à partir de la gélose au sang incubées en aérobiose sont identifiées par les mini-galeries API20NE.

Les bacilles aéro-anaérobies identifiés par API 20E et API20NE sont : *Aeromonas hydrophila*, *Klebseilla pneumoniae* et *Moraxella spp.*

2.2.2.1.1. Aeromonas:

Ce sont des bacilles Gram-, catalase+, mobile, aérobies.

Les résultats des plaques API 20 E figurent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 26**).

Tableau 26. Résultats des tests biochimiques (Api 20 E) d'*Aeromonas hydrophila* :

espèce	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

L'incubation en aérobiose des prélèvements des deux populations étudiées nous a permis d'isoler la souche *Aeromonas hydrophila*.

2.2.2.1.2. Klebseilla:

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

Les résultats des plaques API 20 E figurent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 27**).

Tableau 27. Résultats des tests biochimiques (Api 20 E) de *Klebseilla pneumoniae*:

espèce	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
<i>Klebseilla</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-

Résultats et Discussion

<i>pneumoniae</i>																							
-------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Le tableau listé (**Tableau 27**) résume le profil biochimique d'une bactérie (*Klebsiella pneumoniae*) isolée à partir des cultures aérobies des prélèvements dentaires issus des sujets portant ou non des dents cariées, ces résultats sont conformes à ce qui a été rapporté dans une étude antérieure effectuée sur des enfants indemnes ou présentant des lésions carieuses (**Tanner et al., 2011**).

2.2.2.1.3. Identification de Moraxella:

Les bactéries du genre *Moraxella* sont des bacilles en paires et en grappes, à Gram-, catalase+, anaérobies facultatifs.

Les résultats des plaques API 20 NE figurent dans le tableau ci-dessous (**Tableau 28**).

Tableau 28. Résultats des tests biochimiques (API 20 NE) de *Moraxella sp.*:

espèce	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU _a	ARA _a	MNE _a	MAN _a	NAG _a	MAL _a	GNT _a	CAP _a	ADI _a	MLT _a	CT _a	PAC _a	OX	
<i>Moraxella sp.</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

La souche *Moraxella sp.* a été isolée à partir des plaques supragingivales des sujets indemnes de caries et des sujets présentant des dents cariées. Les enquêtes microbiennes ont montré que la bactérie *Moraxella* fait partie de la flore buccale résidente (**Al-Assadi et al., 1982**).

2.2.2.2. Les bacilles Gram négatif anaérobies

Les bacilles Gram négatif anaérobies ont été isolés à partir des boîtes de gélose au sang incubées en anaérobiose à 37°C pendant 5-7 jours.

Ces bacilles issus des boîtes d'anaérobiose sont identifiés par les mini-galeries API 20A.

Résultats et Discussion

Les bacilles anaérobies identifiés par API 20A sont: *Prevotella sp.*, *Fusobacterium mortiformum*, *Capnocytophaga sp.*, *Bacteroides sp.*, *Porphyromonas asaccharolytica*.

2.2.2.2.1. Prevotella

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 29** et **Tableau 30**).

Tableau 29. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Prevotella sp.*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Prevotella sp.</i>	+	+	+	-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+-	+	+/-	+/-	-	-	-

Tableau 30. Résultats de la sensibilité de *Prevotella sp.* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>Prevotella sp.</i>	S	S	R	R	<u>S</u>

AMX: Amoxicilline, AMC: Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA: Vancomycine, KAN: Kanamycine, COL: Colistine.

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

Le genre *Prevotella* se trouve dans les plaques dentaires supra et sous-gingivales, la salive, la muqueuse buccale et dans la zone de l'amygdale de la cavité buccale, elles sont fréquemment

observées chez les individus sains et ne sont pas souvent associées à des maladies. Cette bactérie est l'une des colonisateurs précoces de la bouche des enfants, par agrégation avec d'autres espèces bactériennes (Haraldsson, 2005), et son isolement à partir des prélèvements dentaires des deux populations étudiées est en corrélation avec les résultats cités par d'autres auteurs (Zongxin et al., 2010 ; Tanner et al., 2011).

2.2.2.2. Fusobacterium:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 31 et Tableau 32).

Tableau 31. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Fusobacterium mortiforum*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Fusobacterium mortiforum</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tableau 32. Résultats de la sensibilité de *Fusobacterium mortiforum* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>Fusobacterium mortiforum</i>	S	S	R	S	S	S

AMX: Amoxicilline, AMC: Amoxicilline +Acide Clavulanique, VA: Vancomycine, KAN: Kanamycine, COL: Colistine, MTZ: Métronidazole.

La sensibilité de *Fusobacterium* aux antibiotiques révèle des niveaux de résistances élevés à la Vancomycine. Ces résultats se corroborent avec ceux rapportés dans la littérature (Dubreuil, 2006 ; CA-SFM, 2015).

Les souches du genre *Fusobacterium* sont également présentes dans la plaque dentaire des deux groupes, ce qui concorde avec les données signalées par **Candids et Leslie en (2012)**, **Preza et al. en (2008)** et **Tanner et al. en (2011)**. Les Fusobactéries sont le plus souvent vus en grand nombre dans la plaque supra et sous-gingivale de la cavité buccale saine et malade. Ils facilitent également l'accumulation et l'adhérence d'autres bactéries orales dans le biofilm (**Lamont et Jenkinson, 2010**).

2.2.2.2.3. Capnocytophaga:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 33 et Tableau 34**).

Tableau 33. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Capnocytophaga sp.*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Capnocytophaga sp.</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+

Tableau 34. Résultats de la sensibilité de *Capnocytophaga sp.* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg	MTZ 16µg
<i>Capnocytophaga sp.</i>	S	S	S	R	S	R

AMX : Amoxicilline, **AMC** : Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA** : Vancomycine, **KAN** : Kanamycine, **COL**: Colistine, **MTZ** : Métronidazole.

L'espèce *Capnocytophaga sp.* a été isolée à partir des plaques supra-gingivales des deux population étudiées, le test de sensibilité aux antibiotique nous a permis de confirmer qu'il s'agit du genre *Capnocytophaga* suite à sa résistance à la métronidazole conformément aux résultats de l'antibiogramme cités dans des études antécédentes (**Dubreuil, 2006**). En outre,

la présence du genre *Capnocytophaga* dans les plaques supra-gingivales des deux populations inclues dans cette étude est conforme aux résultats rapportés dans des travaux précédents (**Zongxin et al., 2010 ; Tanner et al., 2011**).

2.2.2.2.4. Bacteroides:

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

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 35 et Tableau 36**).

Tableau 35. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Bacteroides sp.*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Bacteroides sp.</i>	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-

Tableau 36. Résultats de la sensibilité de *Bacteroides sp.* aux antibiotiques :

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>Bacteroides sp.</i>	S	S	S	R	S

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine.

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

Les souches du genre *Bacteroides* font partie de la microflore buccale résidente, elles ont la capacité de se lier avec d'autres bactéries de la cavité buccale (Chhour et al., 2005). De plus, Elles peuvent également participer au basculement de l'écologie microbienne vers un état sain ou malade.

2.2.2.2.5. Porphyromonas:

Ce sont des petits bacilles, Gram-, oxydase-, immobile, anaérobies.

Les résultats des plaques API 20 A et ceux de la sensibilité aux antibiotiques figurent dans les tableaux ci-dessous (Tableau 37 et Tableau 38).

Tableau 37. Résultats des tests biochimiques (Api 20A) de *Porphyromonas asaccharolytica*:

Espèce	Ind	Ure	Glu	Man	Lac	Sac	Mal	Sal	Xyl	Ara	Gel	Esc	Gly	Cel	Mne	Mlz	Raf	Sor	Rha	Tre
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 38. Résultats de la sensibilité de *Porphyromonas asaccharolytica* aux antibiotiques:

souches	AMC 30µg	AMX 25µg	VA 5µg	KAN 1mg	COL 10µg
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	S	S	S	R	R

AMX: Amoxicilline, **AMC:** Amoxicilline +Acide Clavulanique, **VA:** Vancomycine, **KAN:** Kanamycine, **COL:** Colistine.

Dans cette étude, le genre *Porphyromonas* était aussi présent dans les plaques supra-gingivales des deux populations, les résultats de la sensibilité aux antibiotiques confirment la résistance de *Porphyromonas* à la Colistine (CA-SFM, 2015).

Des études récentes ont révélé une prévalence élevée de *Porphyromonas sp.* et d'autres bactéries anaérobies appartenant au phylum du Bacteroides (*Prevotella sp.*, *Capnocytophaga*, et *Bacteroides sp.*) dans la salive de sujets sains et ils étaient moins fréquents dans la plaque dentaire des mêmes sujets (Keijser et al., 2008), ces souches colonisent la plaque dentaire en interagissant avec d'autres bactéries, tels que le groupe des streptocoques oraux (Daep et al., 2008) et elle ont été liées à diverses maladies orales telles que les maladies parodontales et la carie dentaire (Nadkarni et al. 2004).

3. Nombre des isolats bactériens présents dans les plaques supra-gingivales des deux populations :

Plusieurs morphotypes ont été isolés à partir des plaques supra-gingivales des deux populations, le tableau suivant montre le nombre de chaque espèce bactérienne isolée à partir des plaques supra -gingivales des participants ayant des dents cariées et ceux qui sont indemnes de carie (voir Tableau 39).

Tableau 39. Nombres des espèces bactériennes isolées à partir des plaques supra -gingivales des sujets présentent des dents cariées (C) et des sujets indemnes de carie dentaire (NC) :

Espèces bactériennes	plaque Supragingivale	
	NC (N)	C (N')
I. Bactérie aérobie		
Cocci Gram-positif		
<i>Streptococcus</i>		
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	2
<i>Streptococcus acidomonimus</i>	5	6
<i>Streptococcus constellatus</i>	4	7

Résultats et Discussion

<i>Streptococcus agalactiae</i>	5	5
<i>Streptococcus uberis</i>	2	3
<i>Streptococcus mutans</i>	3	10
<i>Streptococcus oralis</i>	2	3
<i>Streptococcus anginosus</i>	4	6
<i>Streptococcus intermedius</i>	1	3
<i>Gemella</i>		
<i>Gemella morbillorum</i>	2	0
<i>Gemella haemolysans</i>	4	3
<i>Enterococcus faecium</i>	8	19
<i>Micrococcus sp.</i>	0	1
<i>Aerococcus viridans</i>	3	11
<i>Staphylococcus</i>		
<i>Staphylococcus Aureus</i>	4	6
<i>Staphylococcus hominis</i>	4	5
<i>Lactococcus</i>		
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	4	5
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	5	4
Cocci Gram-négatif		

<i>Moraxella spp.</i>	7	8
Bacille Gram-négatif		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	7
II. Bactérie anaérobie		
Bacille Gram-positif		
<i>Actinomyces</i>		
<i>Actinomyces naeslundii</i>	12	15
<i>Actinomyces meyeri</i>	5	14
<i>Actinomyces israelii</i>	2	3
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	1
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	3	11
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1	3
<i>Propionibacterium propionicum</i>	4	6
<i>Eubacterium limosum</i>	0	4

Bacille Gram-négatif		
<i>Prevotella sp.</i>	4	9
<i>Fusobacterium mortiforum</i>	2	4
<i>Capnocytophaga sp.</i>	3	5
<i>Bacteroides sp.</i>	1	3
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	2	2
Total des souches isolées	117	199

Au total 117 souches ont été récoltées au sein des plaques supragingivales des sujets indemnes de caries. Elles ont été répertoriées en 18 genres. 199 souches ont été récoltées et soumises à identification dans les plaques supragingivales des sujets à dents cariées, elles ont été classées en 20 genres différents. De ce fait, presque les mêmes genres bactériens étaient présents dans les plaques supragingivales des deux populations à l'exception des genres *Micrococcus* et *Eubacterium* faiblement retrouvés seulement dans les prélèvements dentaires des sujets ayant des dents cariées (**Tableau 39**). Des études antérieures ont révélé la présence du genre *Micrococcus* dans les lésions carieuses (**Zaremba et al., 2006**). Ainsi que, la prédominance des espèces du genre *Eubacterium* dans les lésions carieuses avancées (**Nadkarni et al., 2004 ; Lima et al., 2011**).

Une étude antérieure de la microflore des plaques supragingivales et sous-gingivales d'un échantillon des adultes "sains" indemnes de caries de l'ouest Algérien (**Ziouani et al., 2015**) a révélé l'isolement de certaines espèces retrouvées également dans notre étude du point de vue qualitatif dans nos deux échantillons (carié et non carié) : *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus acidomonimus*, *Streptococcus constellatus* *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus*

anginosus, *Streptococcus intermedius*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecium*, *Micrococcus sp.*, *Aerococcus viridians*, *Lactococcus lactis*, *Klebsiella pneumonia*, *Aeromonas hydrophila*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *Propionibacterium propionicum*, *Prevotella sp.*, *Fusobacterium mortiferum*, *Capnocytophaga sp.*, *Bacteroides sp.* et *Porphyromonas assacharolytica*.

Le rôle d'une flore bactérienne très diversifiée est de prévenir la progression des pathologies bucco-dentaires de plusieurs façons: les bactéries peuvent empêcher l'adhérence des pathogènes sur des surfaces spécifiques en occupant les niches préférées par ce pathogène, elles peuvent aussi entraver les capacités d'un agent pathogène à se multiplier, comme elles peuvent dégrader les facteurs de virulence d'un agent pathogène (**Socransky et Haffajee, 1992**).

4. Résultats de l'analyse statistique des fréquences des isolats

La présente étude est pionnière en Algérie visant à caractériser la microflore associée à la plaque supra-gingivale des sujets ayant des caries dentaires et d'autres indemnes de caries par le biais des méthodes de culture anoxique et aérobie.

4.1. Fréquences d'isolement des bactéries aérobies et anaérobies :

Les plaques dentaires supra-gingivales des sujets sans carie révèlent 117 souches: 76 (66.67%) aérobie et 41 (33.33%) anaérobies appartenant à 18 genres (**Figure 14.a**).

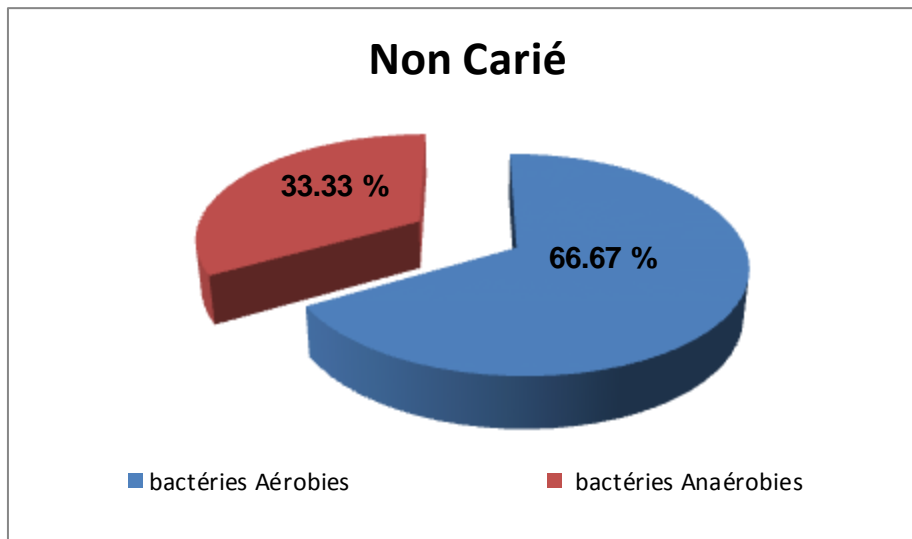


Figure 14. a. Pourcentages de bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supragingivales des sujets indemnes de caries dentaires.

Les plaques supra-gingivales des sujets présentant des dents cariées révèlent un total de 199 souches appartenant à 20 genres : 119 (59.80%) souches aérobie et 80 (40.20%) anaérobie (**Figure 14.b**).

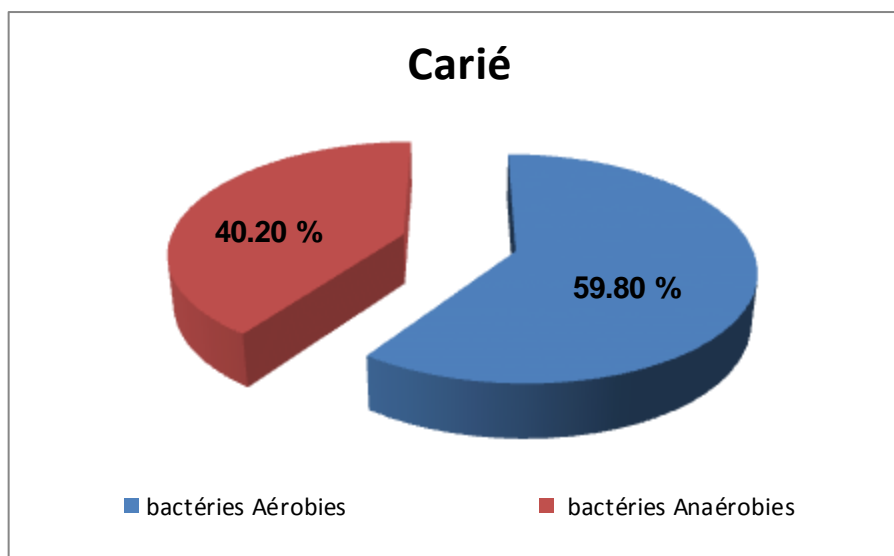


Fig.14.b. Pourcentages de bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supragingivales des sujets ayant des dents cariées

Les résultats de l'étude statistique des fréquences des bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supragingivales des sujets sans et avec lésions carieuses sont présentés dans le **Tableau 40**.

Tableau 40. Fréquences des bactéries aérobies et anaérobies (%) dans les plaques supragingivales des sujets sans et avec caries dentaires

Groupes	bactéries Aérobie		bactéries Anaérobies		P
	N	%	N	%	
NC	76	66.67	41	33.33	*
C	119	59.80	80	40.20	*

NC : population indemne de carie, C : population ayant des dents cariées, N : nombre de souches

* **P<0.05** différence statistiquement significative entre les bactéries aérobies et anaérobies pour les deux groupes.

L'étude statistique a montré qu'il ya une différence significative entre les fréquences de bactéries aérobies et anaérobies dans les plaques supra-gingivales des personnes ayant des dents cariées et ceux qui sont indemnes de lésions carieuses. La prédominance observée, dans notre étude, des bactéries aérobies dans les plaques supragingivales des deux groupes est en corrélation avec ce qui a été rapporté dans d'autres études (**Maripandi et al., 2011**) (**Tableau 40**).

4.2. Fréquences d'isolement des bactéries Gram positif et Gram négatif :

Les plaques dentaires supra-gingivales des sujets sans carie révèlent 88 bactéries à Gram positif et 29 bactéries à Gram négatif (**Figure 15.a.**).

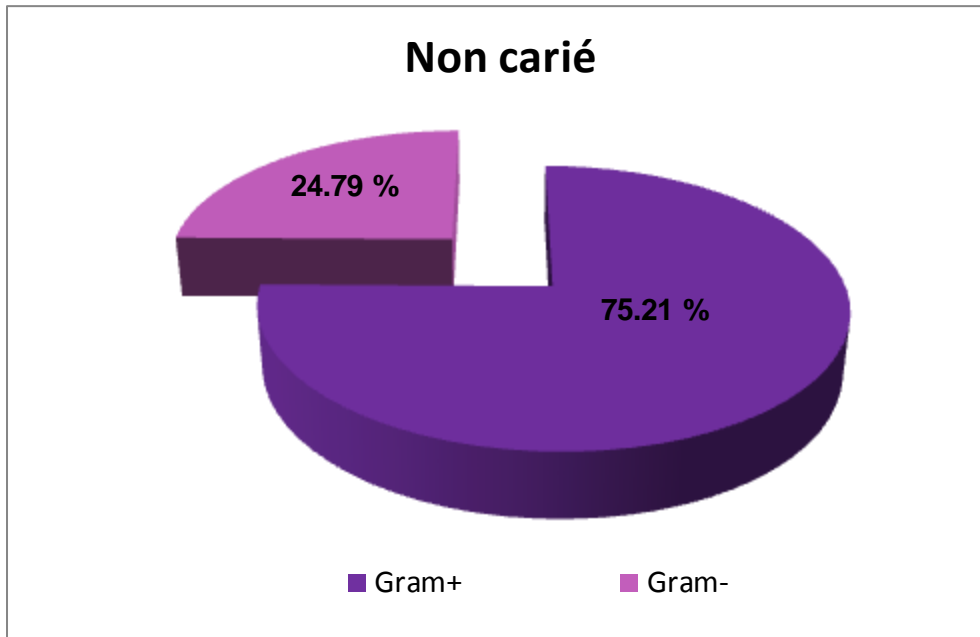


Figure 15.a. Pourcentages des bactéries Gram+ et Gram- dans les plaques supragingivales des sujets indemnes de caries dentaires.

Les plaques supra-gingivales des sujets présentant des dents cariées révèlent 156 bactéries à Gram positif et 43 bactéries à Gram négatif (**Figure 15.b.**).

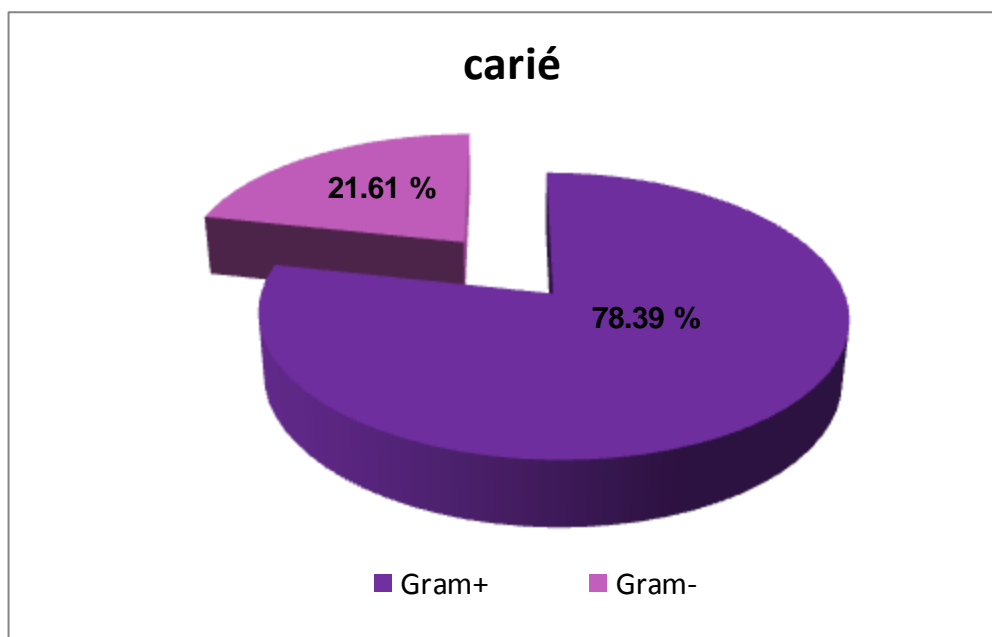


Figure 15.b. Pourcentages des bactéries Gram+ et Gram- dans les plaques supragingivales des sujets présentant des lésions carieuses

Les résultats de l'étude statistique des fréquences des bactéries Gram+ et Gram- dans les plaques supragingivales des sujets sans et avec lésions carieuses sont présentés dans le **Tableau 41**.

Tableau 41. Fréquences des bactéries Gram+ et Gram- (%) dans les plaques supragingivales des sujets sans et avec caries dentaires

Groupes	bactérie Gram+		bactérie Gram-		P
	N	%	N	%	
NC	88	75.21	29	24.79	*
C	156	78.39	43	21.61	*

NC : population indemne de carie, C : population ayant des dents cariées, N : nombre de souches

* P<0.05 différence statistiquement significative entre les bactéries Gram+ et Gram- pour les deux groupes.

Il y a plus d'isolement de bactéries à Gram positif que de bactéries Gram négatif pour les deux groupes ($p < 0,05$) (**Tableau 41**) Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Ayaz et al.** en (2012).

4.3. Fréquences d'isolement des espèces bactériennes :

Pour identifier les espèces bactériennes spécifiquement associées aux processus carieux, nous avons comparé les microbiomes des prélèvements des dents cariées à ceux des dents saines. Pour réaliser cette comparaison, nous avons comparé individuellement les fréquences de chaque espèce isolée à partir des prélèvements des dents cariées et des dents saines en faisant recours à l'analyse statistique de khi-deux réalisée par le logiciel SPSS. Les fréquences des espèces isolées ainsi que les valeurs de P calculées par le logiciel SPSS sont présentées dans le **Tableau 42**.

Tableau 42. Les fréquences (%) des espèces bactériennes isolées à partir des plaques supragingivales des individus présentant des dents cariées (C) et d'autres indemnes de carie dentaire (NC)

Espèces bactériennes	plaque Supragingivale		P
	NC (n=50)	C (n=50)	
I. Bacterie aerobie			
Cocci Gram-positif			
<i>Streptococcus</i>			
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	4	>0.05
<i>Streptococcus acidominimus</i>	10	12	>0.05
<i>Streptococcus constellatus</i>	8	14	>0.05
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	10	>0.05
<i>Streptococcus uberis</i>	4	6	>0.05
<i>Streptococcus mutans</i>	6	20	<0,05
<i>Streptococcus oralis</i>	4	6	>0.05
<i>Streptococcus anginosus</i>	8	12	>0.05
<i>Streptococcus intermedius</i>	2	6	>0.05
<i>Gemella</i>			
<i>Gemella morbillorum</i>	4	0	>0.05
<i>Gemella haemolysans</i>	8	6	>0.05
<i>Enterococcus faecium</i>	16	38	<0,05

Résultats et Discussion

<i>Micrococcus sp.</i>	0	2	>0.05
<i>Aerococcus viridans</i>	6	22	<0,05
<i>Staphylococcus</i>			
<i>Staphylococcus Aureus</i>	8	12	>0.05
<i>Staphylococcus hominis</i>	8	10	>0.05
<i>Lactococcus</i>			
<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	8	10	>0.05
<i>Lactococcus lactis ssp cremoris</i>	10	8	>0.05
Cocci Gram-négatif			
<i>Moraxella spp.</i>	14	16	>0.05
Bacille Gram-négatif			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12	10	>0.05
<i>Aeromonas hydrophila</i>	8	14	>0.05
II. Bactérie anaérobie			
Bacille Gram-positif			

Résultats et Discussion

<i>Actinomyces</i>			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	24	30	>0.05
<i>Actinomyces meyeri</i>	10	28	<0,05
<i>Actinomyces israelii</i>	4	6	>0.05
<i>Actinomyces viscosus</i>	0	2	>0.05
<i>Lactobacillus</i>			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6	22	<0,05
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2	6	>0.05
<i>Propionibacterium propionicum</i>	8	12	>0.05
<i>Eubacterium limosum</i>	0	8	<0,05
Bacille Gram-négatif			
<i>Prevotella sp.</i>	8	18	>0.05
<i>Fusobacterium mortiforum</i>	4	8	>0.05
<i>Capnocytophaga sp.</i>	6	10	>0.05
<i>Bacteroides sp.</i>	2	6	>0.05
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	4	4	>0.05

*P<0.05 différence statistiquement significative entre les fréquences d'isolement des espèces des plaques supra-gingivales pour les sujets sans et avec caries dentaires.

Résultats et Discussion

Il n'y avait pas de différences significatives entre le taux d'isolement de diverses espèces bactériennes dans les deux groupes, sauf pour *Enterococcus faecium* (16% vs 38%) (P <0,05), *Actinomyces meyeri* (10% vs 28%) (P <0,05), *Aerococcus viridans* (6% vs 22%) (P <0,05), *Lactobacillus acidophilus* (6% vs 22%) (P <0,05), *Streptococcus mutans* (6% vs 20%) (p <0,05) Et *Eubacterium limosum* (0% vs 8%) (P <0,05), qui ont été significatives dans l'échantillon des sujets présentant des dents cariées (**Voir Tableau 42**)

Sur ce contexte, la présente étude permet de démontrer que *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Actinomyces meyeri*, *Lactobacillus acidophilus* et *Eubacterium limosum* sont associés aux lésions carieuses.

Pour le groupe des participants ayant des dents cariées, les souches d'*Enterococcus faecium* sont alors les plus dominantes (38%), suivie par les souches d'*Actinomyces meyeri* (28%), *Aerococcus viridans* et *Lactobacillus acidophilus* représentent la même fréquence de 22% suivies par *Streptococcus mutans* à 20%, alors que, la souche *Eubacterium limosum* a été isolée à une faible concentration (8%) (**Voir Tableau 42**).

Les espèces de streptocoques buccaux résident dans la cavité buccale humaine représentent à peu près 20 % du total des bactéries buccales ce qui se rapproche de nos résultats (22.06%). De même, les résultats d'une étude antérieure indiquent l'isolement des streptocoques à partir des plaques dentaires des adultes ayant des lésions carieuses avec une fréquence (19%) proche de la fréquence des streptocoques isolés à partir des plaques supragingivales des sujets à dents cariées de notre étude (23.07%). Certains streptocoques sont considérés comme des colonisateurs précoces de la cavité buccale (**Lamont et Jenkinson, 2010**). Ils peuvent également contribuer au maintien de l'état de bonne santé dentaire (**Aas et al., 2008**) par le développement des propriétés spécifiques pour coloniser les différents sites buccaux soumis à de constants changements de conditions, pour combattre les compétiteurs et pour résister aux agressions externes (système immunitaire de l'hôte, chocs physico-chimiques, frictions mécaniques) (**Guillaume et Marc, 2011**). De même, les streptocoques commensaux peuvent devenir des pathogènes opportunistes initiateurs d'un état pathologique (**Simon, 2007**) suite aux déséquilibres dans la flore indigène (**Guillaume et Marc, 2011**). De plus, deux espèces sont clairement surexprimés : *Streptococcus mutans* (20 %) et *Streptococcus constellatus* (14%), suite à des travaux antérieurs, le membre le plus couramment associé et fortement impliqué à la carie dentaire est *Streptococcus mutans* (**Tortora et al., 2007**).

Cependant, d'autres cocci à Gram positif ont été également isolés (*Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis ssp cremoris*, *Micrococcus sp.*, *Aerococcus viridans*, *Gemella haemolysans*, et *Gemella morbillorum*) de la plaque supra-gingivale des deux populations, avec une prédominance d'*E. faecium* qui a été isolée en proportions importantes dans les plaques supra-gingivales des sujets indemnes de caries (16%) et des sujets portant des lésions carieuses (38%) ($P < 0,05$) (**Voir Tableau 42**). Dans ce groupe des cocci à Gram positif, nous avons remarqué l'isolement de l'espèce *Micrococcus sp.* avec une fréquence très faible seulement à partir des prélèvements des dents cariées (1/50, 2%), la présence de cette espèce dans la plaque dentaire a été confirmée par les données rapportées par d'autres études indiquant son isolement à partir des plaques supragingivales des adultes (1/19, 5.26%) et à partir des prélèvements des lésions carieuses des sujets âgés de 55-72 ans (2/26, 7.7%) (**Zaremba et al., 2006**).

Des travaux antérieurs ont rapportés que les bacilles à Gram positif représentent 35 à 42% de la flore cultivable dans la plaque dentaire (**Theilade et al., 1973**). Ce groupe représente 23.07% de la flore cultivable des plaques supragingivales des sujets indemnes de caries de cette étude. Alors que, le genre *Actinomyces* est le genre le plus retrouvé (70.03 % des bacilles à Gram positif) conformément au constat d'une étude antérieure sur la grande prévalence de ce genre dans le groupe des bacilles à Gram positif isolés à partir des plaques dentaires (**Theilade et al., 1973**).

Le genre *Prevotella* a été isolé à partir des prélèvements issus des deux populations avec une fréquence importante dans les lésions carieuses (18%). En raison de sa présence à l'état sain et malade, les bactéries appartenant à ce genre peuvent être considérées comme opportunistes de la cavité buccale. En outre, une étude précédente (**Chhour et al. 2005**) a démontré la présence des membres de ce groupe dans les lésions carieuses avancées. Une étude réalisée par **Faryavi-Gholami et al. en 1999** a révélé des fréquences d'isolement du genre *Prevotella* significativement plus élevées chez les enfants qui ont une mauvaise haleine (19%) par rapport à ceux qui n'ont pas ce problème. Cela, peut expliquer les résultats de l'étude statistique des données du questionnaire sur l'existence d'une association significative entre la mauvaise haleine des sujets interrogés et la carie dentaire.

L'espèce *Fusobacterium mortiforum* a été isolée à partir des plaques dentaires des deux groupes avec des proportions proches (4% vs 8%). Cela est en raison du rôle de

Fusobacterium dans l'accumulation et l'adhésion des autres bactéries orales dans le biofilm **(Lamont et Jenkinson, 2010)**.

Les souches appartenant aux genres Fusobacterium, Porphyromonas et Bacteroides ont également été isolées à partir des plaques supra-gingivales des deux groupes. Elles sont capables de co-agréguer avec d'autres bactéries de la cavité buccale **(Lamont et Jenkinson 2010 ; Daep et al., 2008)**.

Les bactéries du genre *Staphylococcus* ont été moins fréquentes dans notre étude, néanmoins, certains auteurs ont indiqué que ces bactéries sont fréquemment isolées de la flore buccale et elles jouent un rôle majeur dans le processus infectieux des pathologies buccales **(Robertson et Smith, 2009)**. Une étude antérieure menée sur un échantillon des sujets adultes (35-44 ans) a indiqué l'isolement de l'espèce *S.aureus* à partir des prélèvements des lésions carieuses avec une fréquence de 3.8% **(Zaremba et al., 2006)**. En outre, une deuxième étude réalisée par **Schupbach et al.** en **(1996)** a rapporté les fréquences d'isolement de cette souche dans des lésions carieuses primaires et avancées (4.4% et 15.5% respectivement). Pour la présente étude, cette souche a été isolée à partir des plaques supragingivales des sujets à dents cariées avec une fréquence de 8%.

Les bacilles entériques (*Klebsiella pneumonia*) ont été présents dans nos prélèvements, il a été indiqué que la prévalence des bacilles entériques dans la cavité buccale est en rapport avec la santé buccale **(Sedgley et Samaranayake, 1994)**, en effet, une haute prévalence de ces bactéries a été enregistrée chez nos patients indemnes de caries dentaires **(12%)**.

4.4. Fréquences des isolats bactériens associés à la lésion carieuse

4.4.1. *Enterococcus faecium* :

La souche *Enterococcus faecium* était présente dans les échantillons de plaques supra-gingivales des deux populations avec une différence de fréquence hautement significative en cas d'une atteinte carieuse (38%) par rapport à la plaque saine (16%) ($P < 0,05$) (**Figure 16**). Elles sont connues pour être acidogènes et aciduriques et elles ne sont pas souvent observées dans la cavité buccale humaine (**Tanzer et al., 2001**) que dans les travaux de **Candids patrice** en **2012**, qui était le premier rapport connu pour son isolement à partir des lésions carieuses. Une autre étude réalisée sur un échantillon des adultes sains (indemnes de caries dentaires) de l'ouest Algérien a révélé l'isolement de la souche *Enterococcus faecium* à partir des plaques supra-gingivales et sou-gingivales avec des pourcentages (15.4% et 13.85% simultanément) très proches de la fréquence d'isolement de cette souche à partir des plaques dentaires des gens indemnes de caries de notre étude (16%).

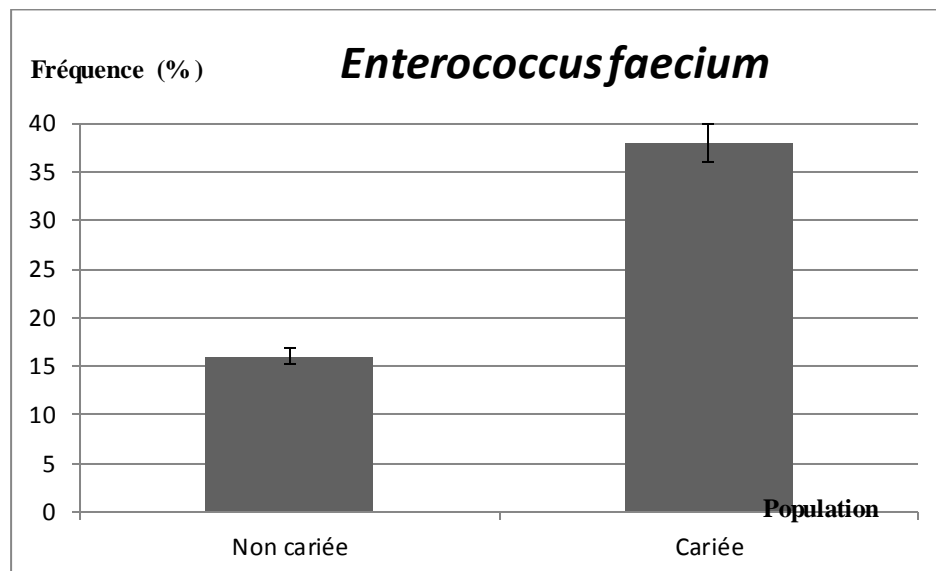


Figure 16. Fréquences d'isolement d'*Enterococcus faecium* chez les deux populations.

4.4.2. Actinomyces meyeri :

Certaines études épidémiologiques ont révélé l'association des Actinomyces avec les caries radiculaires (**Johnson et al., 1990**). Cependant, des études de **Brailsford et al.** en (**1998 et 1999**) ont démontré l'absence d'association entre *Actinomyces naeslundii* et les lésions carieuses actives contrairement aux souches *A. israelii* et *A. gerencseriae* fortement associées au processus carieux. En outre, **Shen et al. (2002)** ont également isolé trois espèces d'Actinomyces, dont *A. israelii*, *A. meyeri* et *A. odontolyticus*, à partir des lésions carieuses, parmi lesquelles *A. israelii* était l'espèce la plus prédominante. Dans la présente étude, les proportions d'*Actinomyces meyeri* (28%) étaient significativement plus élevées dans les prélèvements des dents cariées (**Figure 17**).

Les études sur la coagrégation entre *Streptococcus spp.* et *Actinomyces spp.* ont révélé que l'adhésion inter-bactérienne entre ces deux souches favorise le développement du biofilm dentaire (**Yang, 2014**). Plus important, ces colonisateurs précoces fournissent des sites de liaison spécifiques soit directes, soit par l'intermédiaire des glycoprotéines salivaires liant les organismes pionniers pour assurer une colonisation bactérienne tardive et promouvoir le développement du biofilm (**Huang et al., 2011**).

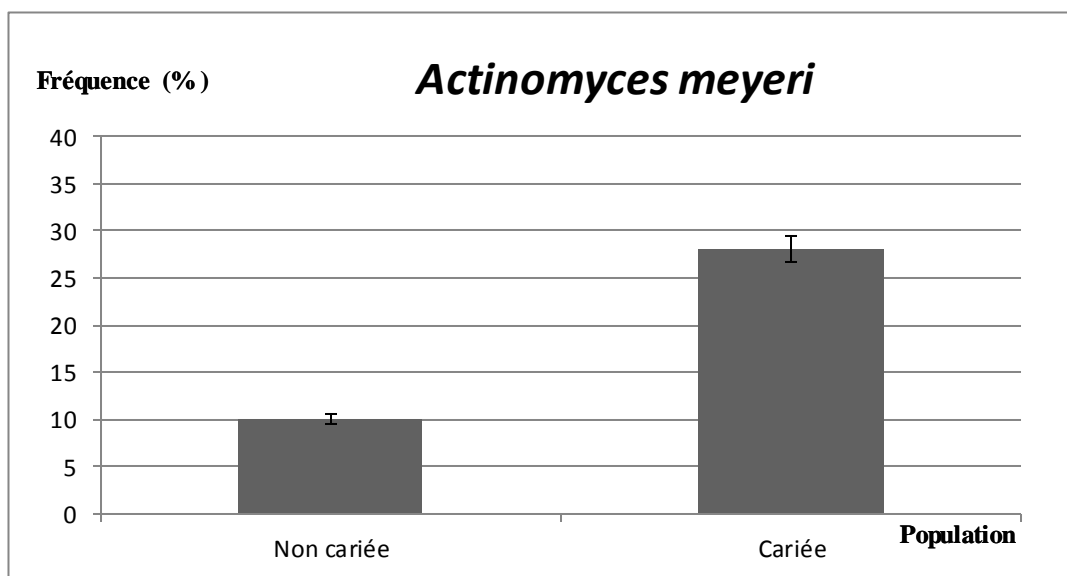


Figure 17. Fréquences d'isolement d'*Actinomyces meyeri* chez les deux populations

4.4.3. *Aerococcus viridans* :

Les souches *Aerococcus viridans* ont été isolées à partir des échantillons issus des deux populations avec une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) (**Figure 18**). Cette bactérie est présente uniquement en très petit nombre, dans les voies respiratoires supérieures des personnes normales (**Williams et al., 1953**).

Des études antérieures ont constaté que la majorité de ce α -groupe (aerococci) forment l'acide dans un bouillon de glucose (pH final de 5,0-5,6) (**Williams et al., 1953**). Mais aucune relation entre *Aerococcus viridans* et la plaque dentaire n'a été rapportée.

Il semble être intéressant de noter que la souche *Aerococcus viridans* a été isolée seulement à partir de nos prélèvements et des prélèvements des plaques supra et sous gingivales d'une autre étude réalisée en Algérie (**Ziouani et al., 2015**), le pourcentage d'isolement d'*Aerococcus viridans* dans les plaques supragingivales des sujets indemnes de caries (6%) se rapproche des pourcentages d'isolement de cette souche dans les plaques supra et sous gingivales (7.7%, 6.2%) de l'étude réalisée par **Ziouani et al. en (2015)**. En effet, son isolement s'avère être spécifique à l'échantillon de la population adulte de l'ouest Algérien, ce qui est intéressant et soulève des questions.

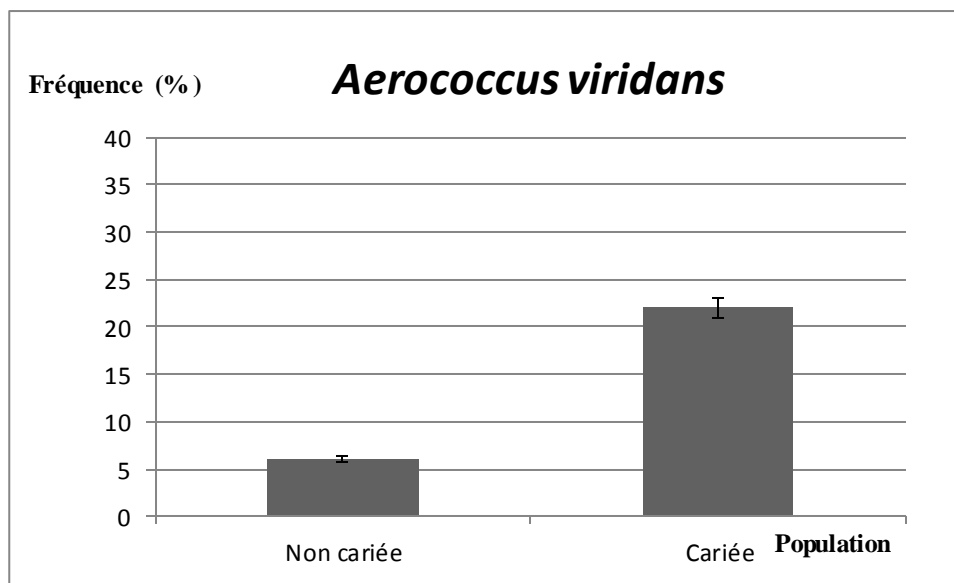


Figure 18. Fréquences d'isolement d'*Aerococcus viridans* chez les deux populations.

4.4.4. *Lactobacillus acidophilus* :

Lactobacillus acidophilus a été isolée avec une fréquence hautement significative (22%) chez les personnes ayant des caries (**Figure 19**). cette bactérie est capable de créer un environnement propice à sa croissance et à la fois cause une décalcification des dents (**Marsh, 2006**). Des études antérieures ont démontré l'association des proportions accrues des bactéries acidogènes et aciduriques comme *Lactobacillus* avec la carie dentaire (**Munson et al 2004**;
Caufield et al., 2007).

Dans cette étude, les lactobacilles et les streptocoques mutans étaient plus fréquents dans la plaque supra-gingivale des sujets avec caries dentaires (20%, 22%, respectivement). Un grand nombre de ces bactéries dans la plaque engendre la production d'acide à des taux élevés (**de Soet et al., 2000**) suite à la fermentation des sucres alimentaires.

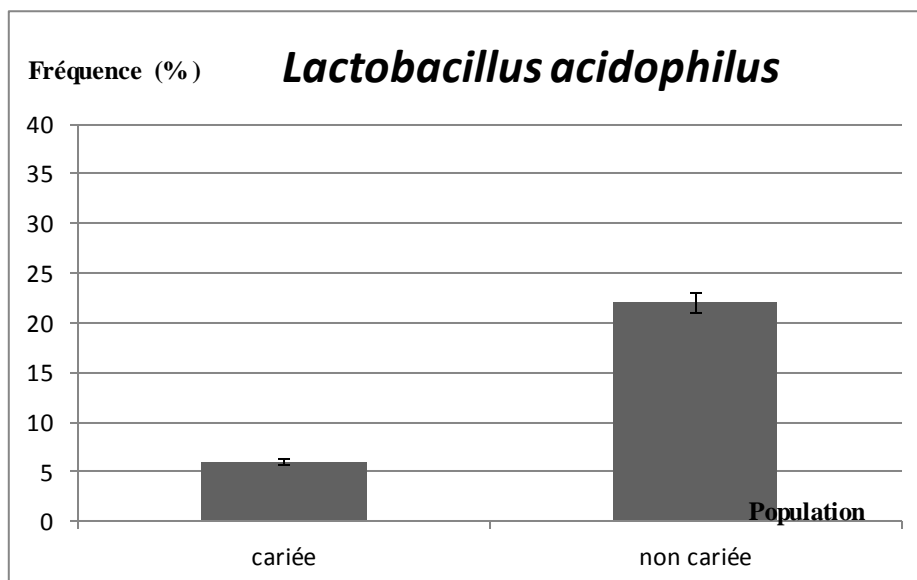


Figure 19. Fréquences d'isolement de *Lactobacillus acidophilus* chez les deux populations.

4.4.5. Streptococcus mutans:

La fréquence d'isolement de *Streptococcus mutans* était **SIGNIFICATIVEMENT** plus élevée pour les plaques supra-gingivales des sujets ayant des lésions carieuses (10/50; 20%) que pour les plaques supra-gingivales des sujets indemnes de caries (3/50; 6%) ($p < 0,05$) (**Figure 20**). Un constat similaire a été observé dans une étude précédente ce qui implique que le membre le plus couramment associé à la carie dentaire est *Streptococcus mutans* (**Tortora et al., 2007**).

Les espèces prédominantes isolées par **Shen et al. (2002)** à partir de 30 lésions de caries radiculaires étaient *Lactobacillus spp.* (90%), *Streptococcus spp.* (100%) et *Actinomyces spp.* (63%). De plus, des études de la microflore des lésions carieuses ont indiqué que la flore cultivable prédominante est composée des streptocoques, Lactobacilli, Actinomyces et les staphylocoques (**Van Houte et al., 1994 ; Schupbach et al., 1995**). Dans notre étude, les streptocoques, lactobacilles et les actinomyces étaient parmi les espèces les plus prédominantes dans le biofilm des dents cariées avec des fréquences de 23.07%, 17% et 22% respectivement.

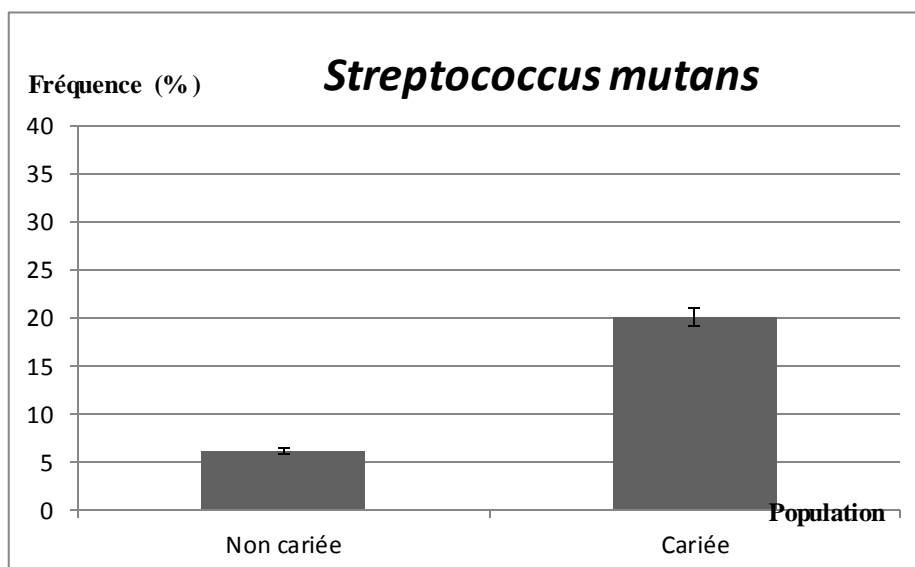


Figure 20. Fréquences d'isolement de *streptococcus mutans* chez les deux populations

4.4.6. *Eubacterium limosum*:

Les streptocoques mutans n'ont pas toujours été détectés comme des membres majeurs dans les lésions carieuses. Des conditions de culture strictement anaérobies ont permis l'isolement de Propionibacterium, **Eubacterium**, Lactobacillus, Bifidobacterium et Actinomyces à partir des prélèvements des dents cariées (Hoshino, 1985). En plus, La portion pulpaire de la carie dentaire contient plutôt des bactéries à Gram + anaérobies telles que : Eubacterium, Propionibacterium, Bifidobacterium avec Actinomyces et Lactobacillus. De ce fait, la superficie de la carie dentaire promouvoit le développement de bactéries anaérobies facultatives responsables de la progression de la lésion carieuse alors que la partie profonde de la carie est responsable de la sélection de bactéries anaérobies strictes (comme Propionibacterium, Bifidobacterium, Eubacterium) (Love and Jenkinson, 2002).

La souche *Eubacterium limosum* a été isolée avec une fréquence significative (8%) chez les personnes ayant des caries dentaires (Figure 21). Des études antérieures ont révélé l'isolement des espèces du genre Eubacterium à partir des lésions carieuses avancées (Lima et al., 2011). De même, l'étude réalisée par Aas et al. en (2008) a révélé l'isolement des espèces du genre Eubacterium à partir des prélèvements des dents permanentes des enfants indemnes ou avec dents cariées avec des fréquences de 23% et 7% ($p < 0,05$) respectivement.

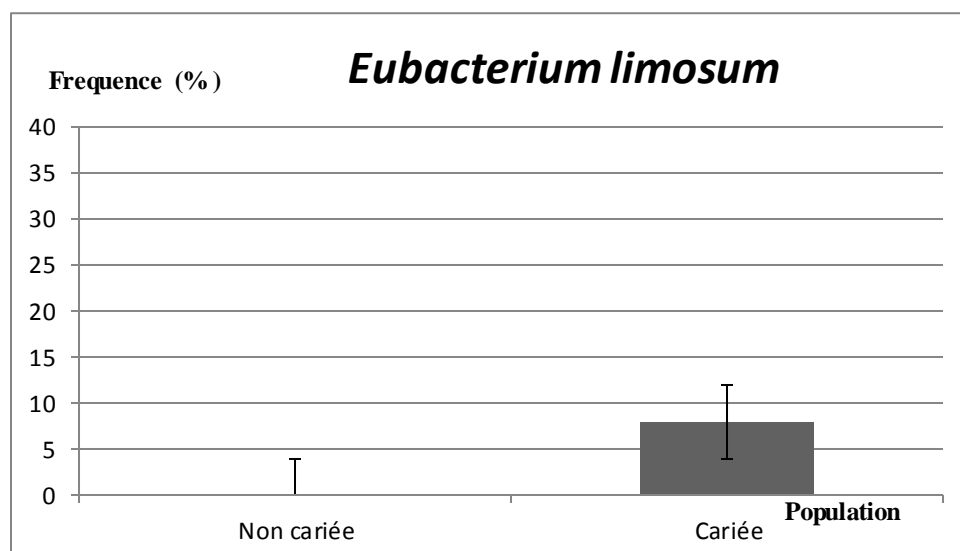


Figure 21. Fréquences d'isolement d'*Eubacterium limosum* chez les deux populations.

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

Les souches isolées ont été testées pour mettre en évidence leur capacité à former un biofilm par deux techniques : méthode de Rouge Congo (RCA) et méthode des micro-plaques de titration.

5.1. Méthode de microplaques de titration à 96 puits :

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

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

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

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

$$DO_{\text{Min}} = 0.098 + (3 \times 0.015)$$

$$DO_{\text{Min}} = \mathbf{0.144}$$

$$DO_{\text{Max}} = 3 \times 0.144$$

$$DO_{\text{Max}} = \mathbf{0.432}$$

Les valeurs inférieures à 0.144 représentent les souches non productrices de biofilm, les valeurs comprises entre 0.144-0.432 ont été associées avec les souches modérément productrices de biofilm, et les valeurs DO supérieures à 0.432 correspondent aux souches fortement productrices de biofilm

5.1.2. Les valeurs seuils pour l'essai de bouillon BHIB additionné de 2% saccharose :

$$DO'_{\text{Min}} = 0.10 + (3 \times 0.013)$$

$$DO'_{\text{Min}} = \mathbf{0.14}$$

$$DO'_{\text{Max}} = 3 \times 0.144$$

$$DO'_{\text{Max}} = \mathbf{0.433}$$

Les valeurs inférieures à 0.14 représentent les souches non productrices de biofilm, les valeurs comprises entre 0.144-0.433 ont été associées avec les souches modérément productrices de biofilm, et les valeurs DO supérieures à 0.433 correspondent aux souches fortement productrices de biofilm.

5.1.3. L'étude de formation de biofilm en utilisant le bouillon BHIB seul :

Les valeurs moyennes de densités optiques (DO) obtenues par un lecteur d'absorbance pour les microplaques, ont été converties en histogramme. La valeur moyenne des puits de contrôle (sans biofilm) est égale à 0.14. D'après l'analyse de l'histogramme et par comparaison des différentes valeurs de DO pour chacune des souches étudiées, il s'est avéré que 5 parmi les 17 souches sont modérément formatrices de biofilm présentant une $0.14 < DO < 0.43$

Discussion générale:

La majorité des études utilisant les techniques d'hybridation ADN-ADN ont mis l'accent sur l'étude de l'écologie bactérienne de la plaque dentaire en cas de maladie parodontale (**Ximénez-Fyvie et al., 2000; Socransky et al., 2004; Haffajee et al., 2008; Dahlén et al., 2010; López et al., 2011**). En Algérie, il y a peu de données microbiologiques sur la microflore bactérienne de la cavité buccale : Une étude a déterminé la microflore bactérienne associée aux parodontites chroniques et agressives (**Yacoubi et al., 2010**) ; et une deuxième étude a caractérisé la microflore bactérienne constitutive du biofilm de la plaque supragingivale et sous-gingivale chez des adultes sains « indemnes de caries dentaires » (**Ziouani et al., 2015**). Cette carence est liée à la nécessité de moyens spécifiques pour la mise en culture des bactéries anaérobies constitutives de la plaque dentaire.

Les méthodes de cultures bactériennes notamment les cultures anoxiques ont été utilisées comme méthodes de référence pour la détection des bactéries anaérobies de la flore buccale, en particulier, les bactéries parodonto-pathogènes et un grand nombre de bactéries de la flore buccale afin d'étudier les mécanismes de la colonisation bactérienne, ou de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques (**Jervoe -Tempête et al., 2005 ; Verner et al., 2006 ; Tomazinho et Avila-Campos, 2007; Atieh, 2008; Kistler et al., 2013**).

La carie dentaire est qualifiée comme un problème majeur de santé publique en raison de sa prévalence (5 milliards de personnes présentent des caries dans le monde) (**Petersen, 2003**). Au niveau international, la majorité des études sur la prévalence de la carie dentaire concernent les enfants et les adolescents scolarisés. En Algérie, l'enquête épidémiologique menée dans le cadre du programme pilote d'éducation sanitaire buccodentaire mis en place par le Ministère de la Santé et de la Population avec la collaboration de l'O.M.S révèle que pour 6000 élèves (repartis sur 08 localités de différentes régions du pays: El-Kala, Annaba, Khemisti, El-Khroub, El-Oued, El-Biar, Staoueli, Oran, Ghriss) dans la tranche d'âge "6-8 ans" la prévalence carieuse est de 67% (**Programme National de la Santé Bucco-dentaire en milieu scolaire, 2001**).

La présente étude est pionnière en Algérie ayant pour but principal la comparaison de la composition bactérienne de la plaque supragingivale entre des adultes présentant des dents

Discussion générale

cariées et d'autres indemnes de caries dentaires pour mettre en évidence les souches bactériennes associées au développement des lésions carieuses. Puis, les souches isolées ont été testées pour évaluer leur pouvoir de formation de biofilm. L'impact des paramètres socio démographiques, économiques et cliniques sur la prévalence de la carie dentaire a été aussi évalué.

L'étude expérimentale fait l'objet d'une caractérisation phénotypique de la microflore bactérienne des plaques supra-gingivales de 50 patients présentant des lésions carieuses et 50 patients indemnes de caries.

La caractérisation phénotypique de la microflore bactérienne constitutive des plaques supra-gingivales des sujets indemnes de caries et des sujets présentant des caries révèle la présence de 18 et 20 genres bactériens respectivement. La microflore bactérienne de ces deux populations a été dominée par des bactéries aéro-anaérobies facultatives et aérobies (66.67% pour la population indemnes de caries et 59.80% présentant des caries) (**tableau 40**). En effet, la consommation d'oxygène par ces bactéries aérobies et ou aéro-anaérobies facultatives et la réduction de la capacité de l'oxygène à diffuser à travers le biofilm contribuent au développement d'une flore anaérobie dans les couches profondes de ce dernier (**Gracieux et al., 2006**).

La culture bactérienne en aérobiose et en anaérobiose sur gélose au sang des prélèvements des plaques supra-gingivales a permis l'isolement des bactéries aérobies et anaérobies (**Tableau 39**). Une étude récente réalisée sur la microflore des plaques supra et sous gingivales des adultes sains de l'ouest Algérien (**Ziouani et al., 2015**) a montré une forte ressemblance avec la composition bactérienne des prélèvements de plaques de notre étude.

L'analyse statistique des fréquences d'isolement des espèces bactériennes par le test khi-deux (χ^2 , $p < 0.05$) a été effectuée dans le but d'évaluer la présence ou l'absence de différence significative dans la composition bactérienne de la plaque supra-gingivale entre les sujets à dents cariées et les sujets indemnes de lésions carieuses, d'autre terme la présence ou l'absence d'association entre les isolats bactériens et le processus carieux.

L'étude statistique des fréquences d'isolement des souches bactériennes de notre étude a révélé la présence d'association significative entre la carie dentaire et les souches suivantes : *Enterococcus faecium* (P <0,05), *Actinomyces meyeri* (P <0,05), *Aerococcus viridans* (P

Discussion générale

<0,05), *Lactobacillus acidophilus* (P <0,05), *Streptococcus mutans* (p <0,05) et *Eubacterium limosum* (P <0,05) (Tableau 42).

Pour le groupe des participants ayant des dents cariées, les souches d'*Enterococcus faecium* sont les plus dominantes (38%), suivie par les souches d'*Actinomyces* (20%). *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus acidophilus* représentent respectivement 20% et 22% (Tableau 42).

La carie dentaire est induite par la plaque cariogène comprenant de nombreuses espèces, y compris *S. mutans*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* et *Bifidobacterium spp* (Filoche et al., 2010). De ce fait, Les streptocoques sont parmi les premiers colonisateurs de la plaque dentaire (Nyvad et Kilian, 1987; ten Cate, 2006). Les études sur la coagrégation entre *Streptococcus spp.* et *Actinomyces spp.* ont révélé que l'adhésion inter-bactérienne entre ces deux souches favorise le développement du biofilm dentaire (Yang, 2014). De plus, Les lactobacilles et les streptocoques (principalement *streptococcus mutans*) sont parmi les principales bactéries cariogènes (van Houte, 1994; Kleinberg, 2002; Jakubovics, 2010; Marsh et al., 2011). des études antérieures ont constaté que les patients ayant des niveaux salivaires élevés de bactéries potentiellement cariogènes telles que *Streptococcus mutans* et les lactobacilles, ont été désignés comme étant des patients à «risque élevé» d'avoir des futures caries dentaires, et ils ont été sélectionnés pour un suivi clinique et thérapeutique supplémentaire (Gibbons, 1989 ; Shi et al., 1998; Walsh et Tsang, 2008).

La souche *Enterococcus faecium* n'a pas été connue comme colonisateur de la microflore buccale humaine (Tanzer et al., 2001) qu'après les résultats rapportés par les études récentes de Candids patrice en (2012) et de Ziouani et al. en (2015) qui indiquent l'isolement d'*Enterococcus faecium* à partir des dents cariées des sujets adultes et des plaques supra et sou gingivales des adultes algériens sains « indemnes de caries » respectivement. De ce fait, notre étude a confirmé la présence de cette souche dans la cavité buccale, et surtout sa spécificité à la population de l'ouest Algérien.

En outre, la souche *Aerococcus viridans* a été isolée pour la première fois à partir des prélèvements des plaques dentaires des adultes sains « indemnes de caries » de l'ouest Algérien (Ziouani et al., 2015), notre étude confirme sa présence dans la microflore des plaques dentaires saines et révèle la présence d'association significative entre *Aerococcus viridans* et la carie dentaire. En effet, son isolement s'avère être spécifique à l'échantillon de

Discussion générale

la population adulte de l'ouest Algérien et son rôle dans le développement des lésions carieuses devra être pris en compte vu que notre étude est considérée comme le premier rapport entre cette souche et la carie dentaire.

L'essai de formation de biofilm par la méthode de microplaque de titration en présence et en absence de saccharose a montré que les espèces *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Gemella haemolysans*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces naeslundii* *Actinomyces meyeri*, *Enterococcus faecium*, *Prevotella melaninogenica* et *Lactobacillus acidophilus* sont formatrices de biofilm d'où des valeurs de DO comprises entre 0.14-0.43. Des études antérieures ont constaté que les lactobacilles, *Prevotella buccae*, *Actinomyces spp.* et *Streptococcus mutans* sont formatrices de biofilm (Al Ahmad et al., 2014) ce qui leur confère un rôle important dans le processus de développement des lésions carieuses.

Cette étude nous a permis aussi de déduire le rôle du saccharose dans l'amélioration de pouvoir de formation du biofilm des souches bactériennes suite à l'augmentation de nombre des souches productrice du biofilm après son ajout au BHIB. Ce sucre est considéré comme étant le sucre alimentaire le plus cariogène car il est plus fermentescible, et il sert aussi de substrat pour la synthèse des polysaccharides extracellulaires (EPS) et intracellulaires (IPS) dans le biofilm de la plaque dentaire (Bowen, 2002).

Les sujets indemnes de caries dentaires et ceux qui ont des dents cariées ont remplis des questionnaires médico-dentaire composés de deux parties : une partie des paramètres sociodémographiques (âge, sexe, niveau d'éducation) et économique et une deuxième partie des paramètres cliniques (la consommation de sucre, la mauvaise haleine, la fréquence de brossage des dents, les douleurs des dents, le nettoyage inter dentaire, le grignotage entre les repas).

L'étude statistique des paramètres sociodémographiques et économiques démontre la présence d'association significative entre la carie dentaire et l'âge ($P < 0,05$) et le niveau culturel ($P < 0,05$). Du fait que le haut niveau d'étude implique la meilleure connaissance de la maladie et la prise de mesure adéquates de prévention. (Tableau 2). Cependant, l'absence d'association significative entre le statut économique et la prévalence des caries en Algérie ($p > 0,05$) est peut être expliquée par l'accessibilité aux services de soins dentaires par tous les niveaux socio-économiques grâce à la gratuité des services médicaux.

En outre, L'étude statistique des paramètres cliniques révèle la présence d'association significative ($P < 0,05$) entre la carie dentaire et la consommation de sucre, la mauvaise haleine, la fréquence de brossage des dents, les douleurs des dents et le nettoyage inter dentaire.

Plusieurs études à travers le monde ont montré l'association entre la carie dentaire et la consommation des sucres. Selon **Frank (1994)** et **Dargent Pare et Levy (2001)**, un aliment est cariogène lorsqu'il participe directement ou indirectement au risque de caries. Les bactéries prédominantes dans le processus de formation de plaque supra-gingivale sont les streptocoques non-mutans et les Actinomyces (**Takahashi et Yamada, 1999**). Ces bactéries sont saccharolytiques et dégradent les hydrates de carbone dérivés des aliments à travers la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas pour former les acides lactiques, formiques, acétiques, succiniques et d'autres acides organiques, et consomment l'oxygène par la NADH oxydase de façon concomitante. Ces activités créent un milieu acide et anaérobie (**Kolenbrander, 1993**). Ces conditions d'acidité et d'anaérobiose peuvent ensuite faciliter la colonisation de la plaque supra-gingivale par d'autres bactéries qui supportent ces conditions (**Takahashi et Yamada, 1999**). Ces bactéries tolérantes à l'acide sont les seules qui peuvent survivre et effectuer la glycolyse dans ces environnements acides. Certaines des espèces bactériennes les plus courantes sont *Streptococcus spp.* et *Lactobacillus spp.* (**Marquis , 1995**) isolées avec des fréquences hautement significatives dans les plaques dentaires de nos sujets portant des dents cariées (23.07% et 22% respectivement) (**Tableau 42**). Les streptocoques mutans sont considérés comme des promoteurs qui augmentent la cariogénicité des sites par le biais de changements microbiens ainsi que l'adaptation à l'acide (**Takahashi et Yamada, 1999**). Dans notre étude, la souche *S.mutans* a été isolée avec une fréquence hautement significative à partir des plaques supra-gingivales des sujets ayant des lésions carieuses (10/50; 20%) par rapport des sujets indemnes de caries (3/50; 6%) ($p < 0,05$) (**Figure 20**). A ce pH acide, ce biofilm bactérien est capable de déminéraliser l'émail des dents, avec un grand degré d'acidité entraînant des taux plus rapides de déminéralisation.

De plus, le développement des lésions carieuses est lié au brossage des dents avec un dentifrice fluoré considéré comme l'un des principales habitudes d'hygiène bucco-dentaire réduisant la quantité des bactéries dans la cavité buccale (**Gati et Vieira, 2011**).

D'autre part, La mauvaise haleine est significativement associée à la carie dentaire ($P < 0,05$) sachant que la mauvaise hygiène bucco-dentaire, la sécheresse de la bouche, les saignements de la gencive et la carie dentaire ont tendance à influencer la prévalence de l'halitose (Setia et al., 2014). Des recherches antérieures ont montré que parmi les bactéries Gram-négatives, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium sp.*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, sont les principales productrices de composés soufrés volatils (Grover et al., 2015). qui sont impliqués dans la survenue de l'halitose (Tolentino et al., 2011). Cela peut expliquer la fréquence élevée de *Prevotella* dans la plaque supra-gingivale de nos adultes à dents cariées (18%) (Tableau 42).

Cette étude partage un but d'enrichir les données statistiques sur la pathologie de carie dentaire en Algérie, en mettant en évidence la biodiversité bactérienne des plaques supragingivales chez des adultes ayant des caries et d'autres indemnes de caries dentaires (population contrôle). Cela sert de moyens efficace pour établir des plans thérapeutiques pour la population touchée de caries et pour améliorer les stratégies de prévention pour la population à risque carieux. Dans certains pays, des tests salivaires sont utilisés par le dentiste traitant pour contrôler l'efficacité du traitement préventif mis en place chez des patients comme les malades atteints de cancers des voies aéro-digestives qui sont considérés comme patients à fort risque carieux, L'objectif du chirurgien dentiste est donc d'essayer de convaincre ces patients de l'importance d'une hygiène bucco-dentaire stricte et d'un suivi régulier. Ces tests permettent donc d'apprécier la capacité tampon salivaire et de mesurer la quantité de streptocoques mutans et de lactobacilles présents dans la salive. Dans ce contexte, il sera intéressant d'établir un lien entre la présence des souches déclarées comme cariogènes (*Enterococcus faecium*, *Actinomyces meyeri*, *Aerococcus viridans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* et *Eubacterium limosum*) dans notre étude et la survenue des lésions carieuses chez les sujets à fort risque carieux.

Conclusion

Les méthodes de culture représentent un outil important pour la caractérisation des bactéries de la plaque supra-gingivale et des autres sites de la cavité buccale. Notre étude est pionnière en Algérie qui élucide la diversité bactérienne de la plaque supra-gingivale chez des adultes Algériens ayant des dents cariées et d'autres indemnes de carie dentaire.

Cette étude a pour but d'évaluer l'impact des paramètres du questionnaire (les paramètres socio démographiques, économiques et culturels, les habitudes alimentaires et les pratiques d'hygiène) sur la prévalence de la carie dentaire par le biais du test khi deux (χ^2 , $p < 0.05$), d'estimer des variations de pourcentages et/ou des espèces bactériennes en cas d'une atteinte de carie dentaire en utilisant le test khi deux (χ^2 , $p < 0.05$), ainsi que d'évaluer l'aptitude des isolats bactériens à la formation du biofilm bucco-dentaire.

Les données du questionnaire ont révélé que la prévalence de la carie dentaire est importante chez les femmes (68%) par rapport aux hommes (32%). L'étude statistique des données du questionnaire par le test khi deux (χ^2 , $p < 0.05$) montre que la fréquence de consommation des sucres est significativement importante chez les sujets ayant des dents cariées (80%)($P < 0,05$), et que le bon état de santé bucco-dentaire est significativement associé à un bon niveau d'étude ($P < 0,05$) et à des bonnes pratiques d'hygiènes bucco-dentaire ($P < 0,05$) ainsi que l'association significative entre la mauvaise haleine et la carie dentaire ($P < 0,05$). Cependant, il n'y avait aucune association significative entre le niveau socio-économique et le grignotage entre les repas avec la présence des lésions carieuses ($p > 0,05$).

L'analyse phénotypique des prélèvements issus des plaques supra-gingivales des deux populations montre une grande biodiversité bactérienne de ces derniers avec la prédominance des bactéries Gram-positif par rapport aux bactéries Gram négatif et des morphotypes aérobies par rapport aux morphotypes anaérobies pour les deux groupes inclus dans la présente étude.

Conclusion

L'analyse statistique des fréquences d'isolements des espèces bactériennes entre les sujets indemnes de caries (contrôle) et les sujets présentant des lésions carieuses par le test khi deux (χ^2 , $p < 0.05$) nous a permis de révéler l'association significative ($P < 0.05$) entre le processus carieux et les isolats bactériens suivants : *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Actinomyces meyeri*, *Lactobacillus acidophilus* et *Eubacterium limosum*. *Aerococcus viridans* a été isolée pour la première fois à partir des prélèvements de dents cariées. En outre, une étude antérieure réalisée en Algérie a montré la présence de cette espèce dans la microflore des plaques supra et sous-gingivales des adultes sains « indemnes de caries dentaires » (Ziouani et al., 2015). Les présents résultats confirment l'hypothèse de la plaque écologique, en ce que la carie est le résultat d'un déséquilibre dans la microflore totale due au stress écologique, ce qui entraîne un avantage de certains « agents oraux pathogènes ».

Cette étude a évalué également l'aptitude des isolats bactériens à la formation de biofilm, ce pouvoir de formation de biofilm a été déterminé par la technique de plaques de micro-titration (PMT) en présence et en absence de 2% de saccharose et par la technique de Rouge Congo. L'ajout de saccharose était dans le but d'élucider l'effet de ce dernier dans le processus de formation de biofilm.

Pour la méthode de microplaque de titration, les résultats ont indiqué que 43.5 % des souches sont productrices de biofilm pour l'essai de BHIB seul contre 60.9% des souches productrices de biofilm pour l'essai de BHIB+2% saccharose. En outre, La méthode qualitative sur gélose Rouge Congo a indiqué que 60.9% des souches sont productrices de biofilm.

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

On peut conclure que cette étude confirme des observations antérieures sur l'association de certaines espèces bactériennes avec la formation de lésions carieuses, de plus elle enrichi les données en impliquant d'autres espèces comme *Aerococcus viridans* qui semble être

Conclusion

spécifique à notre population Algérienne et qui pourra alors servir de cible pour élucider son rôle dans le processus carieux.

Les principales perspectives de recherches qui apparaissent à l'issue de cette thèse concernent :

- La caractérisation moléculaire des isolats bactériens de cette étude notamment impliqués dans le processus carieux.
- La détection moléculaire des gènes qui confèrent aux bactéries leur pouvoir de formation de biofilm.
- L'étude de la relation entre la microflore buccale et les pathologies bucco-dentaires et d'autres maladies comme les maladies cardiovasculaires, l'obésité, certains types de cancer, et les infections pulmonaires.
- La prise en compte des résultats de la présente étude dans les stratégies de prévention de la carie dentaire.
- Les recherches futures devraient se concentrer sur la structure ainsi que le comportement des communautés bactériennes de la plaque dentaire.
- La prévention de la carie dentaire par des tests de dépistages rapides de patients à risques et creuser la piste de l'espèce *Aerococcus viridans* qui semble très intéressante pour les patients algériens en particulier
- Encourager des études similaires plus spécifiques (microflore salivaire).

Références bibliographiques :

Aas J.A. , Griffen A.L. , Dardis S.R. , Lee A.M. , Olsen I. , Dewhirst F.E. , Leys E.J. et Paster B.J., 2008. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol*, 46:1407–1417

Al-Ahmad A., Ameen H., Pelz K., Karygianni L., Wittmer A., Anderson A.C., Spitzmuller B. et Hellwig E., 2014. Antibiotic Resistance and Capacity for Biofilm Formation of Different Bacteria Isolated from Endodontic Infections Associated with Root-filled Teeth. *J Endod.*, 40: 223–230.

Association Médicale Mondiale (AMM), 2013. Déclaration d’Helsinki de l’AMM – Principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains. Site Internet : <http://www.wma.net/fr/30publications/10politiques/b3/>

Axelsson P., 2000. Prediction of caries risk and risk profiles in Diagnosis and risk prediction of dental caries, Quintessence Books vol. 2

Ayaz A., Jianjun L., Yousuf M., Li T., Shizhu Z. et Yi X., 2012. Microbial profiling of dental caries and periodontitis patients using denaturing gradient gel electrophoresis. *African Journal of Microbiology Research.*, 6(10) : 2559-256.

Bamise C.T., Kolawole K.A., Oloyede E.O. et Esan T.A., 2010. Tooth sensitivity experience among residential university students. *Int J Dent Hyg.*, 8(2):95-100.

Banas J.A., 2004. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front. Biosci.*, 9(1–3): 1267-1277.

Bass W.M., 2005. Human osteology - A laboratory and field manual. Missouri Archaeological Society, 5th edition.

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

Beauthier J.P., 2007. Traité de médecine légale. Bruxelles, Editions De Boeck Université.

Becker M.R., Paster B.J., Leys E.J., Moeschberger M.L., Kenyon S.G., Galvin J.L., Boches S.K., Dewhirst F.E. et Griffen A.L., 2002. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J.Clin.Microbiol.*, 40(3):1001-1009.

Références bibliographiques

- Beighton D., Gilbert S.C., Clark D., Mantzourani M, al-Haboubi M., Ali F., Ransome E., Hodson N., Fenlon M., Zoitopoulos L. et Gallagher J., 2008.** Isolation and identification of bifidobacteriaceae from human saliva. *Appl Environ Microbiol.*, 74: 6457–6460.
- Birked. D., 1989** , Nutrition, alimentation et carie dentaire, la dentisterie préventive, Edition Masson, 215-246p.
- Birkhed D., Edwardsson S., Kalfas S. et Svensater G., 1984.** Cariogenicity of sorbitol. *Swed Dent J.*, 8: 147-54.
- Blique M., 1997.** Mise en oeuvre des tests salivaires au cabinet dentaire. Évaluation de la concentration de Lactobacilles dans la salive. *Inform Dent.* , 39 : 3307 – 3310.
- Blique M., 1998.** Nettoyage prophylactique professionnel des surfaces dentaires – aspects pratiques. 1re partie. *Inf Dent.*, 80:1335-40.
- Bonifait L., Chandad F., Grenier D., 2009.** Probiotics for oral health: Myth or reality? *J. Can. Dent. Assoc.*, 75: 585–590.
- Bouchard P., 2015.** Odontologie Parodontologie Dentisterie implantaire. Vol.1. medecine parodontale, Lavoisier paris.
- Bowden G.H., 1990.** Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res* 69:1205–1210.
- Bowden G.H.W. et Li Y.H., 1997.** Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.*, 11: 81-89.
- Bowen W.H., 2002.** Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium?. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 13:126–131.
- Bowen W.H., Amsbaugh S.M., Monell-Torrens S. et Brunelle J., 1983.** Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. *Caries Research*, 17:466–71.
- Brailsford S.R. ; Tregaskis R.B. ; Leftwich H.S. et Beighton D., 1999.** The predominant Actinomyces spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. *J Dent Res.*, 78: 1525-34.
- Brailsford SR. ; Lynch E. et Beighton D., 1998.** The isolation of Actinomyces naeslundii from sound root surfaces and root carious lesions. *Caries Res.*, 32: 100-6.

Références bibliographiques

- Brook I., 1987.** Microbiology of abscesses of the head and neck in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 96:429–33.
- Brown D., Beveridge T., Keevil C., et Sherriff B., 1998.** Evaluation of microscopic techniques to observe iron precipitation in a natural microbial biolm. *FEMS Microbiology Ecology*, 26: 297.310.
- Burne R.A. et Marquis R.E., 2000.** Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiology Letters* 2000, 193:1–6.
- Burne R.A., Zeng L., Ahn S.J., Palmer S.R., Liu Y., Lefebure T., et al., 2012.** Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Advances in Dental Research* 2012, 24:77–80.
- Candids Patrice A.R. et Leslie Michelle M.D., 2012.** Bacterial Diversity in the Saliva and Plaque of Caries-free and Caries-active Filipino Adults. *Philippine Journal of Science*, 141 (2): 217-227.
- Carlos J.P. , Cohen B. , Krasse B. , Marthaler T. , Rybakov A.I. et al., 1972.** Étiologie et Prévention de la Carie Dentaire. Rapport d'un groupe de scientifiques de l'OMS. Série de rapports techniques. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, 494:5-14.
- Carlsson P. , Olsson B. et Bratthall D., 1985.** The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch. Oral Biol.*, 30(3) : 265-8
- CA-SFM, 2015.** comite de l'antibiogramme de la societe francaise de microbiologie. recommandations 2015 (édition de janvier 2015).
- Caufield P.W., Cutter G.R. et Dasanayake A.P., 1993.** Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J. Dent. Res.* , 72(1): 37-45.
- Caufield P.W., Li Y., Dasanayake A. et Saxena D., 2007.** Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res.*,41:2–8.
- Cavézian R., Pasquet G., Bel G. et Baller G., 2006.** Imagerie dento-maxillaire, approche radioclinique. Elsevier Masson, Paris, 3e édition.

Références bibliographiques

- Chan H.C., Wu C.T., Welch K.B. et Loesche W.J., 2010.** Periodontal disease activity measured by the Benzoyl-DL-Arginine-Naphthylamide test is associated with preterm births. *J periodontol.*, 81 (7) : 982 – 991.
- Chaves M., Cutress T.W., Enwonwu C.O., Frazier P.J., Rubakov A. I. , Tomasowa R.A. et al., 1984.** Méthodes et programmes de prévention des affections bucco-dentaires. Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS. Série de rapports techniques. Organisation Mondiale de la Santé, Genève, p. 713:5-50.
- Chhour K.L., Nadkarni M.A., Byun R., Martin F.E., Jacques N.A. et Hunter N., 2005.** Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol.*, 43:843–849.
- Clarke H. et Cowan S. T., 1952.** Biochemical methods for bacteriology. *Journal of General Microbiology*, 6:187–197
- Clergeau S. , Bloch A. , Boy M. et al., 1999.** Carioprofylaxie, Analyse critique des spécialités de l'olafluor. Edité par la laboratoire GABA, 212p.
- Corner R.C. et Corner T.R., 1994.** Chi-Square Analysis. *Science Teacher*, 61(4) : 44-47.
- Costa S. M., Martins C. C., Bonfim M. L., Zina L. G., Paiva S. M., Pordeus I. A. et Abreu M. H., 2012.** A systematic review of socioeconomic indicators and dental caries in adults. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9(10):3540-74.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., 1999.** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284: 1318-1322.
- Courson F. , Landru M. et Gerval J., 1998.** La carie dentaire, Edition Hertmann, Editeurs des sciences et des arts, 121p.
- Crockett A.O. et Wittwer C.T., 2001.** Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time pcr: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. **Anal Biochem.**, 1,290(1):89-97.
- Daep C.A., Lamont R.J. et Demuth D.R., 2010.** Interaction of Porphyromonas gingivalis with Oral Streptococci Requires a Motif that Resembles the Eukaryotic Nuclear Receptor Box Protein-Protein Interaction Domain. *Infection and Immunity*, 76(7): 3273-3280.

Références bibliographiques

Dargent-pare C. et Levy G., 2001. odontologie in basdevant a., laville m. et lerebours e. traite de nutrition clinique de l'adulte medecine-sciences, flammariion, 723 : 609-12

Davey M.E. et O'toole G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev., 64:847-67.

Davies D. G., 2000. Physiological events in biolm formation. DansSGM Symposium , 59 : 37.52.

De Soet, J.J., Nyvad, B., et Kilian, M., 2000. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res., 34(6) : 486–490.

Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J. , Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A. et Wade W.G., 2010. The human oral microbiome. J Bacteriol., 192: 5002-17.

Diaz P.I., 2012. Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. Front Oral Biol., 15: 17-40.

Doyal L. et Naidoo S., 2010. Why dentists should take a greater interest in sex and gender. Br Dent J ., 209(7):335–337.

Droz D. et Blique M., 1999. Controle du risque alimentaire et prophylaxie dentaire individuelle ou omnipratique 1 ère partie : connaître les facteurs de risque essentiels pour mieux les identifier. Poser le problème de l'alimentation cariogène Information Dentaire, 20: 1405-11

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

Duffau F. et Baehni P. C., 2007. L'écologie de la bouche. TITANE Vol. 4 - N°2

Dumas B., Gueremy P., Lhenaff R. et Raffy J., 1980. Terrasses quaternaires soulevées sur la façade calabraise du détroit de Messine (Italie). C. R. Acad. Sc. Paris, t. 290, série D, p. 739-742.

Evans R.G. , Barer M.L. et Marmor T.R., 1996. Etre ou ne pas être en bonne santé, John Libbey, Eurotext, Paris.

Faryavi-Gholami F., Minah G.E. et Turng B.F., 1999. Oral malodor in children and volatile sulfur compound-producing bacteria in saliva: preliminary microbiological investigation. Pediatr Dent., 21:320-324..

Références bibliographiques

- Fejerskov O. et Kidd E.A.M., 2003.** Dental Caries : the disease and its clinical management, Copenhagen :Blackwell Munksgaard
- Fejerskov O., 2004.** Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res., 38: 182-91.
- Ferraro M. et Vieira A.R., 2010.** Explaining gender differences in caries: a multifactorial approach to a multifactorial disease. International Journal of Dentistry, 649643 : 1-5.
- Filoche S, Wong L, Sissons CH, 2010.** Oral biofilms : emerging concepts in microbial ecology. J Dent Res, 89 : 8-18.
- Fitzgerald R.J. et Keyes P.H., 1960.** Demonstration of the étiologic role of streptococci in experimental caries in hamster. J Am Dent Assoc., 61 : 9-19.
- Flemming H.C., 1993.** Biolms and environmental protection. WaterScience and Technology, 27(7-8) : 1.10.
- Ford B.J., 1986.** The Leeuwenhoekiana of Clifford Dobell (1886-1949). Notes Rec R Soc Lond,41(1):95-105.
- Foster J.S. et Kolenbrander P.E., 2004.** Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. Appl. Environ. Microbiol.,70:4340–4348.
- Freeman D.J., Falkiner F.R., Keane C.T., 1989.** New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol., 42:872–874.
- Frias-Lopez J. et Duran-Pinedo A., 2012.** Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. J. Bacteriol., 194:2082–2095.
- Fronty P., Sapanet M., Georget C. et Collet G., 2005.** L'identification estimative - Première partie, L'avis de recherche, l'Odontogramme numérique. Les cahiers d'Odontologie MédicoLégale, Editions Atlantique.
- Garcia-godoy F. et Hicks M.J., 2011.** Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. J Am Dent Assoc., 139 : 25S-34S.

Références bibliographiques

- Gillespie S.H. et Hawkey P.M., 2006.** Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Seond Edition. DOI: 10.1002/9780470017968.ch12
- Greenstein G., 1992.** Periodontal response to mechanical non-surgical therapy: A review. *Journal of Periodontology*, 63: 118-130.
- Guillaume G. N. et Marc C. L., 2011.** Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Rev. can. microbiol.*, 57 : 1–20.
- Gustafsson B.E., Quensel C.E., Lanke L.S., Lundqvist C., Grahn H., Bonow B.E. et al., 1954.** The Vipeholm dental caries study, the effect of different levels of carbohydrate intake on caries activity in 436 individuals observed for five years. *Acta Odontol Scand.*, 11(3-4):232-264.
- Hallett K.B. et O'Rourke P.K. , 2003.** Social and behavioural determinants of early childhood caries. *Aust Dent J.*, 48:27-33.
- Hallett K.B. et O'Rourke P.K., 2002.** Early childhood caries and infant feeding practice. *Community Dent Health* .,19:237-242.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W. et Stoodley P., 2004.** Bacterial biofilms: from the natural world to infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 (2): 95–108.
- Haraldsson G., 2005.** Oral commensal *Prevotella* species and *Fusobacterium nucleatum*: Identification and potential pathogenic role. (Academic Dissertation) University of Helsinki, Finland.
- Hayes C., 2001.** The effect of non-cariogenic sweeteners on the prevention of dental caries: a review of the evidence. *J Dent Educ.*, 65 : 1106-9.
- Hescot P. , Triller M. , Roland E. , Gueguen R. ,Desfontaine J. ,Vreven J. et al., 2000.** Objectif Prévention. Le point sur le fluor. Union pour la santé bucco-dentaire hors série, 1-56. 1-1-2000. IRCOM / Groupe OBEA.
- Hess J.C., 1970.** Endodontie : Notions fondamentales, pathologie : Edition Maloine S.A., 413 p. 83

Références bibliographiques

- Hicks J., Garcia-Godoy F. et Flaitz C., 2003.** Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent.*, 28(1):47-52.
- Hill M.J., 1978.** The role of colon anaerobes in the metabolism of bile and steroids, and its relation to colon cancer. *Cancer*, 36:2387.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994).** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Hoshino E., 1985.** Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res.*, 64: 1195–1198
- Hojo k., Nagaoka S., Ohshima T. et Maeda N., 2009.** bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res.* , 88 : 982-990.
- Huang R., Li M. et Gregory R. L., 2011.** Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2, 435–444.
- Jenkinson H. F. et Lamont R. J., 2005.** Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13:589-595.
- Jiang W., Bo H., YongChun G., et al., 2010.** Stress distribution in molars restored with inlays or onlays with or without endodontic treatment: a three-dimensional finite element analysis. *J Prosthet Dent.*, 103:6–12.
- Joachim F. et Charon J., 2010.** Quelle est la place de la microbiologie en parodontie clinique ?. *clinic focus. le fil dentaire* .N°58.
- Johnson J.L. ; Moore L.V. ; Kaneko B. et Moore W.E., 1990.** *Actinomyces georgiae* sp. nov., *Actinomyces gerencseriae* sp. nov., designation of two genospecies of *Actinomyces naeslundii*, and inclusion of *A. naeslundii* serotypes II and III and *Actinomyces viscosus* serotype II in *A. naeslundii* genospecies 2. *Int J Syst Bacteriol.*, 40: 273-86.
- Joubert – noirrit L., 1996.** Alimentation et sante dentaire ufsbd, *Le Chirurgien-Dentiste De France*, 813: 45-7
- Julien M., 2006.** Comment nourrir nos enfants. *JODQ.*, p: 20-4.

Références bibliographiques

- Kanasi E., Johansson I., Lu S.C., Kressin N.R., Nunn M.E., Kent R. Jr. et al., 2010.** Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res.*, 89:378-383.
- Kang M.S., Oh J.S., Lee H.C., Lim H.S., Lee S.W., Yang K.H., Choi N.K., Kim S.M., 2011.** Inhibitory effect of *Lactobacillus reuterion* periodontopathic and cariogenic bacteria. *J. Microbiol.*, 49: 193–199.
- Keijser B.J., Zaura E., Huse S.M., van der Vossen J.M., Schuren F.H., Montijn R.C., ten Cate J.M., Crielaard W., 2008.** Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res.*, 87(11):1016-20.
- Klein H. et Palmer C., 1940.** Studies on dental caries. A procedure for recording and statistical processing examination. *Dent. Res.*, 19 : 243-249
- Kleinberg I., 2002.** A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: An alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 13: 108-125.
- Kohler B., Pettersson B. M. et Bratthall D., 1981.** *Streptococcus mutans* in plaque and saliva and the development of caries. *Scand J Dent Res.*, 89: 19–25.
- Kolenbrander P.E., 1993.** Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque. *J Appl Bacteriol.*, 74:79–86.
- Kolenbrander P.E., Andersen R.N., Blehert D.S., Eglund P.G., Foster J.S., Palmer R.J. Jr., 2002.** Communication among oral bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66:486–505
- Kolenbrander P.E., Palmer R.J. Jr., Rickard A.H., Jakubovics N.S., Chalmers N.I., Diaz P.I., 2006.** Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol.*, 42: 47–79.
- Könönen E., Jousimies-Somer H., Bryk A., Kilp T. et Kilian M., 2002.** Establishment of streptococci in the upper respiratory tract : longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. *J. Med. Microbiol.*, 51(9): 723-730.
- Kuramitsu H.K. 2006.** The virulence of *Streptococcus mutans*. Dans Gram positif pathogens. *Sous la direction de* Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J., Portnoy D.A. et Rood J.I., American Society for Microbiology Press, Wash., USA. p. 240–246.

Références bibliographiques

- Lakhssassi N., El hajoui N., Lodter J.P., Pineill J.L. et Sixou M., 2005.** Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis : an interindividual variability study. *Oral microbiol immunol.*, 20 : 244-252.
- Lamont R.J. et Jenkinson H.F., 2010.** Caries as an infectious disease. In *Oral Microbiology at a Glance*. Singapore: Wiley-Blackwell, p. 6-7.
- Lasfargues J.J. et Colon P., 2009.** *Odontologie conservatrice et restauratrice. Une approche médicale globale. Tome 1. Éd. CdP. Paris. (XXIII-480 p.)*.
- Lautrou A., 1998.** *Anatomie dentaire. Paris, Milan, Barcelone, Editions Masson, 2ⁿ édition.*
- Li C. et Yu-mei W., 2011.** The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int J Oral Sci.*, 3: 66-73.
- Li J., Helmerhorst E.J., Leone C.W., Troxler R.F., Yaskell T., Haffajee A.D., Socransky S.S., Oppenheim F.G., 2004.** Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.*, 97: 1311-1318.
- Lima K.C., Coelho L.T., Pinheiro I.V.A., Rocas I.N. et Siqueira J.F., 2011.** Jr: Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.*, 45:21–30.
- Lindhe J., 1986.** *Manuel de parodontologie clinique. CdP Editions.*
- Ling Z, Kong J, Jia P, Wei C, Wang y, Pan Z, Huang W, Li L, Chen H. et Xiang C., 2010.** Analysis of Oral Microbiota in Children with D by PCR-DGGE and Barcoded Pyrosequencing. *Microb Ecol.*, 60:677–690.
- Lingstro`m P., van Houte J., et Kashket S., 2000.** Food starches and dental caries. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* , 11(3) : 366–380.
- Listgarten M.A., Mayo H.E. et Tremblay R., 1975.** Development of dental plaque on epoxy resin crowns in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 1975,46(1):10-26.
- Listgarten M.A., 1976.** Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol.* 47(1):1-18.

Références bibliographiques

- Løe H., Theilade E. et Jensen S.B., 1965.** Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 36(3):177-187.
- Loesch W.J. , Gusberti F. , Mettraux T. et Higgins T., 1983.** Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infect Immun.*, 42(2):659-67.
- Loesche W.J., 1986.** Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, 50(4): 352-380 .
- Long D., 2007.** Le khi carré. Centre de recherche et de développement en éducation (CRDE), Université de Moncton, 506 : 858-4886.
- Love R.M. et Jenkinson H.F., 2002.** "Invasion of dentinal tubules by oral bacteria." *Crit Rev Oral Biol Med.*, 13(2): 171-83.
- Lu Y. et Levin G.V., 2002.** Removal and prevention of dental plaque with D-tagatose *international Journal of Cosmetic Science.*, 24(4) : 225–234.
- Lukacs J., 2011.** Sex differences in dental caries experience: clinical evidence, complex etiology. *Clin Oral Investig.*, 15(5):649–656.
- Ma F. Xu F. et Luo X., 2015.** Children's and adults' judgments of facial trustworthiness: the relationship to facial attractiveness. *Percept. Mot. Skills.*, 121 :179–198.
- MacFaddin J. F., 2000.** Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
- Mah T.C. et O'took G.A., 2001.** Mecanism of biofilm resistance to antimicrobial agent. *Trends Microbiol.* 2001, 3 : 34-39.
- Mahejabeen R., Sudha P., Kulkarni S.S. et Anegundi R., 2006.** Dental caries prevalence among preschool children of Hubli: Dharwad city. *J Indian Soc Pedod Prev Dent .*, 24:19-22.
- Maripandi A., Arun Kumar T. et Al Salamah Ali A., 2011.** Prevalence of dental caries bacterial pathogens and evaluation of inhibitory concentration effect on different tooth pastes against *Streptococcus* spp. *African Journal of Microbiology Research*, 5(14): 1778-1783.
- Marquis R. E., 1995.** "Oxygen metabolism, oxidative stress adn acid-base physiology of dental plaque biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15: 198-207.

Références bibliographiques

- Marsh P. D., 2005.** Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol.*, 32 (6):7-15.
- Marsh P.D., 1999.** Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43:599–614.
- Marsh P.D., 2003.** Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.*, 149:279–294.
- Marsh P.D., 2004.** Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, 38:204–21.
- Marsh P.D., 2006.** Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.*, 6(1): S14.
- Marthaler T., 1965.** Versuchfehler und Streuungserlegunginn dermedizinischen experimentellen Forschung. *Acta Med Dent Helv*, II:7-9.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D.J., Fatma T. et Rattan A., 2006.** Detection Of Biofilm Formation Among The Clinical Isolates Of Staphylococci: An Evaluation Of Three Different Screening Methods. *Indian J. Med. Microbiol.*, 24(1):25-29.
- Mazmanian S.K. et Kasper D.L., 2006.** The love-hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system. *Nat Rev Immunol.* , 6:849-858.
- Mejean L. , 2001. Evolution des consommations alimentaires In Basdevant A., Laville M. et Lerebours E. 2001.** Traite de nutrition clinique de l'adulte Médecine-Sciences, Flammarion, 723 : 255-64
- Menghini G., Steiner M. et Marthaler T., 1994.** Zahnzustand von ausdem Ausland ZugezogenenScülern, Kanton Zürich 1992 bis 1994.ShweizMonatsschrZahnmed, 105(12):1403-1411.
- Milewska R., 2006.** Bacterial composition in the supragingival plaques of children with and without dental caries. *Adv. Med. Sci.*, 51: 182-186.
- Miller C., Blique M. et Lasfargues J.J., 2000.** Les conseils diététiques en dentisterie préventive. *Réal Clin.* ,11:33-49.
- Miller C., Ten Cate J.M., Lasfargue J.J., 2004.** La reminéralisation des lésions carieuses, le role essentiel des fluorures. *Réalités clin*, Tome 15, n° 03, 249-260.

Références bibliographiques

- Miller W. R., Brown J. M., Simpson T. L., Handmaker N. S., Bien T. H., Luckie L. F., Montgomery H. A., Hester R. K., et Tonigan J. S., 1995.** What works? A methodological analysis of the alcohol treatment outcome literature. In R. K. Hester & W. R. Miller [Eds.] Handbook of alcoholism treatment. approaches: Effective alternatives. 2nd ed., p. 12-44. Boston: Allyn and Bacon.
- Minnig P., 2005.** CARIES : PREVENTION SSP–SGP, *paediatrica*, 12(2).
- Mitchell T.J., 2003.** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1(3): 219-230.
- Modesto M., Biavati B. et Mattarelli P., 2006.** Occurrence of the family Bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res.*, 40:271–276
- Mofredj A., Bahloul H. et Chanut C., 2007.** *Lactococcus lactis*: an opportunistic bacterium. *Med. Mal. Infect.*, 37 (4) : 200-207.
- Monroe D., 2007.** Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.*, 5(11): e307.
- Moreno H., Naranjo J.A. et López-Escobar L., 1979.** Geología y Petrología de la cadena volcánica OsornoPuntiagudo, Andes del Sur, Latitud 41 °1 O'S. In Congreso Geológico Chileno, No. 2, Actas, Vol. 3, p. E 1 09- E131. Arica.
- Mouton C. et Robert J.C., 1994.** Bactériologie bucco-dentaire. Collection Abrégés d'Odontologie et Stomatologie. Paris : Masson, 184.
- Muller M., Lupi L., Medioni E. et Bolla M., 1997.** Epidemiologie de la carie dentaire Encyclopédie Médico-Chirurgicale (Elsevier, Paris), Odontologie, 23-010-A-20, 8 p.
- Munson M. A., Banerjee A., Watson T. F. et Wade W. G., 2004.** Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (7): 3023.
- Nadkarni M. A., Caldon C. E., Chhour K. L., Fisher I. P., Martin F. E., Jacques N. A. et al., 2004.** Carious dentine provides a habitat for a complex array of novel *Prevotella*-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 5238–5244.
- Nagler R. et Hershkovich O., 2005.** Relationship between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile. *Arch oral boil.*, 50:7-16.

Références bibliographiques

- Neumaier M., Braun A., Wagener C., 1998.** Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular Biology Techniques. Clin Chem., 44: 12–26.
- Newbrune E., 1978.** Cariology. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 326.
- Niu C. et Gilbert E.S., 2004.** Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. Appl Environ Microbiol., 70: 6951–6956.
- Noiri Y., Li L. et Ebisu S., 2001.** The localization of periodontal-disease-associated bacteria
- Nyvad B. et Fejerskov O., 1987.** scanning electron microscopy of early microbial colonization of human enamel and root surfaces *in vivo*. J. Dent. Res., 95: 287-296.
- O’Toole G.A., Kolter R., 1998.** Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. Mol Microbiol., 30:295-304.
- Ohara-Nemoto Y., Haraga H., Kimura S. et Nemoto T.K., 2008.** Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol., 57 (1) : 95–99
- Oli A.K., Raju S., Nagaveni S., Kelmani Chandrakanth R., 2012.** Biofilm formation by Multidrug resistant *Enterococcus faecalis* (MDEF) originated from clinical samples. Journal of Microbiology and Biotechnology Research., 2(2).
- Oliveira A.F., Chaves A.M. et Rosenblatt A., 2006.** The influence of enamel defects on the development of early childhood caries in a population with low socioeconomic status: a longitudinal study. Caries Res., 40(4):296-302.
- OMS , 1987.** L’examen clinique de chacun de ces sujets a été effectué par un médecin dentiste qui applique les recommandations de l’organisation mondiale de santé.
- Ooshima T., Yoshida T., Aono W., Takei T., Izumitani A., Sobue S. et al., 1992.** Changes with time in the oral microflora and dental caries induction in hyposalivated rats fed on sucrose diet. Microbiol Immunol., 36 (12) : 1223–123.
- Paes Leme A.F., Koo H., Bellato C.M., Bedi G. et Cury J.A., 2006.** The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight. J. Dent. Res., 85:878–887

Références bibliographiques

- Paster B.J., Boches S.K., Galvin J.L., Ericson R.E., Lau C.N., Levanos V.A., Sahasrabude A. et Dewhirst F.E., 2001.** Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183:3770–3783
- Paulander J., Axelsson P. et Lindhe J., 2003.** Association Between Level Of Education And Oral Health Status In 35-, 50-, 65- And 75-Year-Olds. *J Clin Periodontol.*, 30 : 697–704.
- Petersilka G.J., 2000.** Subgingival air-polishing in the treatment of periodontal biofilm infections. *Periodontol.*, 55(1): 124-42.
- Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley Jr. F.L., Mowat E., Ramage G. et Lopez-Ribot J.L., 2008.** A simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.*, 3: 1494–1500.
- Piette E. et Goldberg M., 2001.** La dent normale et pathologique. Bruxelles, Editions De Boeck Université.
- Pitts N.B., 2001.** Clinical diagnosis of dental caries: a european perspective. *J Dental Educ.*, 65(16) : 972-978.
- Pratibha P.K., Bhat K.M. et Bhat G.S., 2006.** Oral Malodor: A Review of the Literature. Source: *Journal of Dental Hygiene*, 80(3).
- Pratt L.A. et Kolter R., 1998.** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 : 285–293.
- Prescott L.M, Harley J.P. et Klein D., 2010.** Microbiologie. 2ème Edition Française. De Boeck Université.
- Preza D., Olsen I., Aas J.A., Willumsen T., Grinde B. et Paster B.J., 2008.** Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J.Clin.Microbiol.*, 46(6): 2015-2021.
- Ramage G., Vande Walle K., Wickes B.L., Lopez-Ribot J.L., 2001.** Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.*, 45: 2475–2479.

Références bibliographiques

- Reiker J., Van Der Velden U., Barendregt D.S. et Loos B.G., 2000.** Root caries in patients in periodontal follow-up care. Prevalence and risk factors. *Ned Tijdschr Tandheelkd*, 107: 402–405.
- Reisine S.T. et Poster W. 2001.** Socioeconomic Status and Selected Behavioral Determinants as Risk Factors for Dental Caries. *Journal of Dental Education*, 65: 1009- 1016.
- Riethe P. et Rau G., 1989.** Prophylaxie et traitement conservateur des caries dentaires. *Atlas de médecine dentaire Flammarion Médecine-Sciences*.
- Robertson D. et Smith A.J., 2009.** The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.*, 58(2):155-62.
- Rocas I.N., Siqueira J.F. Jr., Santos K.R. et Coelho A.M., 2001.** “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*,91:468–71.
- Rosan B. et Lamont R.J., 2000.** Dental plaque formation. *Microbes and Infection* 2 : 1599-1607.
- Rosenbloom R.G. et Tinanoff N., 1991.** Salivary *Streptococcus mutans* levels in patient before, during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.*,100(1):35-7.
- Rozkiewicz D., Daniluk T., Zaremba M.L., Cylwik-Rokicka D., Luczaj-Cepowicz E., Milewska R., Marczuk-Kolada G. et Stokowska W., 2006.** Bacterial composition in the supragingival plaques of children with and without dental caries. *Adv Med Sci.*, 51(1):182-6.
- Rozkiewicz D., Daniluk T., Zaremba M.L., Cylwik-Rokicka D., Luczaj-Cepowicz E. et Rude N. et Retel O., 2000.** STATISTIQUE EN PSYCHOLOGIE, Paris, Éd. In Press.
- Rudney J.D., 2000.** Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res.* ,14:29-39.
- Salonen L., Allander L., Bratthall D. et Hellden L., 1990.** Mutans streptococci, oral hygiene and caries in an adult Swedish population. *J Dent Res.*, 69:1469-1475.
- Sanders T.A., 2004.** Diet and general health: dietary counselling. *Caries Res.* , 38:3-8

Références bibliographiques

- Sansone C., van Houte J., Joshipura K., Kent R. et Margolis H.C., 1993.** The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. *J Dent Res* ., 72:508-516.
- Sansonetti P.J., 2008.** Host-bacteria homeostasis in the healthy and inflamed gut. *Curr Opin Gastro enterol.*, 24(4): 435-9.
- Sbordone L. et Bortolaia C., 2003.** Oral microbial biofilms and plaque related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* 7:181–188
- Scannapieco F.A., Torres G.I. et Levine M.J., 1993.** Salivary amylase: role in dental plaque and caries formation. *Crit Rev Oral Biol Med.*, 4:301-307.
- Schupbach P. ; Osterwalder V. et Guggenheim B., 1995.** Human root caries: microbiota in plaque covering sound carious arrested carious root surfaces. *Caries Res.*, 29: 382-95.
- Secci G. , 2006.** Manuel d'hygiène bucco-dentaire, Destiné à la formation de prophylaxistes, SDI 2006 / 2007, Ed. n°1
- Sédallian A., Bland S. et Dubreuil L., 1999.** Actualités sur les infections mixtes. *La Lettre de l'Infectiologie - Tome XIV - n° 2 . BACTÉRIOLOGIE.*
- Sedgley C.M. et Samaranayake L.P., 1994.** The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese. *Arch. Oral. Biol.*, 39(6):459-66.
- Seki M., Yamoshita Y., Shibata Y., Torigoe H., Tsuda H. et Maeno M., 2006.** Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology*, 21: 47-52.
- Selwitz R.H., Ismail A.I. et Pitts N.B., 2007.** Dental caries. *Lancet*, 369:51–59.
- Shang X.H, LI D.L., Huang Y., Chen H. et Sun R.P. , 2008.** Prevalence of dental caries among preschool children in Shanghe County of Shandong Province and relevant prevention and treatment strategies *Chin Med J* ., 121(22):2246- 2249.
- Shen S. ; Samaranayake L.P. ; Yip H.K. et Dyson J.E., 2002.** Bacterial and yeast flora of root surface caries in elderly ethnic Chinese. *Oral Dis.*, 8: 207-17

Références bibliographiques

- Schupbach P. ; Osterwalder V. et Guggenheim B., 1996.** Human root caries: microbiota of a limited number of root caries lesions. *Caries Res.*,30: 52-64.
- Simmer J.P., Hu J.C., 2001.** Dental enamel formation and its impact on clinical dentistry. *J Dent Educ.*,65(9):896-905. Review.
- Simon L., 2007.** The role of *Streptococcus mutans* and oral ecology in the formation of dental caries. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*. p.2
- Siqueira J. F. Jr. et Rocas I. N., 2008.** Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.*, 34: 1291–1301.
- Siqueira J.F. Jr et Rocas I.N., 2013.** **Microbiology and treatment of acute apical abscesses.** *Clin Microbiol Rev.*, 26:255-73.
- Sixou J.L., Bailleul-forestier I., dajean-trutaud S. et Vaysee, F., 2004.** Recommandations sur la prescription des fluorures de la naissance à l'adolescence. *J. Odont. Stomatol.Pediatr.*, 11 : 157-156
- Sixou M., 2003.** Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis* 9(suppl. 1) : 54-62.
- Sixou M., Kone D., Duffaut-Lagarrigue D., Lodter J.P. et Berdoulat C., 1993.** Etude in vitro de la sensibilité aux antibiotiques des principales bactéries impliquées dans l'étiologie des parodontites chez l'homme. *Journal de Parodontologie* , p. 257 – 263.
- Slinger R., Chan F., Ferris W., Yeung S.W., St-Denis M. ,Gaboury I. et Aaron S.D. , 2006.** Multiple Combination Antibiotic Susceptibility Testing of Non-Typeable *Haemophilus Influenzae* Biofilms.*Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 56: 247-253.
- Smith A.J., Jackson M.S. et Bagg J., 2001.** The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J. Med. Microbiol.*, 50 : 940-946.
- Smith D.J., Anderson J.M., King W.F., van Houte J., Taubman M.A., 1993.** Oral streptococcal colonization of infants. *Oral Microbiol. Immunol.*, 8(1): 1-4.
- Socransky S.S. et Haffajee A.D., 2005.** Periodontal microbial ecology.*Periodontol.*, 38:135-187.
- Socransky S.S, Haffajee A.D., 2002.** Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.*, 28:12–55

Références bibliographiques

- Socransky S.S. et Haffajee A.D., 1992.** The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.*, 63(4):322-31.
- Stanley N.R. et Lazazzera B.A., 2004.** Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.*, 52:917-24.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B. et Svabic-Vlahovic M., 2000.** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, 40: 175–179.
- Sufia S., Chaudhry S., Izhar F., Syed A., Mirza B.A., Khan A.A., 2011.** Dental caries experience in preschool children: is it related to a child's place of residence and family income? *Oral Health Prev Dent .*, 9(4):375–379
- Taj Y., Essa F., Aziz F. et Kazmi S. U., 2012.** Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of infection in developing countries.* 6(5).
- Takahashi N. et Nyvad B., 2008.** Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process." *Caries Research* 42: 409-418.
- Takahashi N., 2005.** Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series*, 1284 :103 – 112.
- Tanner A. C. R., Mathney J. M. J., Kent R. L. , Chalmers N. I., Hughes C. V., Loo C. Y., Pradhan N., Kanasi E., Hwang J., Dahlan M. A., Papadopolou E. et Dewhirst F. E., 2011.** Cultivable Anaerobic Microbiota of Severe Early Childhood Caries. *J. Clin. Microbiol.*, 49(4) : 1464-1474.
- Tanzer J.M., Livingston J, et Thompson A., 2001.** The Microbiology of Primary Dental Caries in Humans. *Journal of Dental Education*, 65(10): 1028-1038.
- Tappuni A.R. et Challacombe S.J., 1993.** Distribution and isolation frequency of eight streptococcal species in saliva from predentate and dentate children and adults. *J. Dent. Res.*, 72(1): 31-36.
- Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L., 2007.** Principles of Disease and Epidemiology. In *Microbiology: An Introduction*. Pearson International, U.S.A

Références bibliographiques

- Touger-Decker R. et van Loveren C., 2003.** Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr.*,78,4:881-892.
- Trahan L., 1995.** Xylitol : a review of its action on mutans streptococci and dental plaque- its clinical significance. *Int Dent J.*, 45: 77-92.
- Triller M., 1990.** Alimentation et carie let, sc, ffn., 5: 1-4
- Trisha E., 2011.** How Subgingival Plaque Biofilm Gets Started, O’Hehir, RDH, MS, Hygiene town Editorial Director.
- Truin G.J., Konig K.G., Bronkhorst E.M., Frankenmolen F., Mulder J. et van’t Hof M.A., 1998.** Time trends in caries experience of 6- and 12-year-old children of different socioeconomic status in The Hague. *Caries Res.*, 32: 1–4.
- Van Houte J., Jordan H.V., Laraway R., Kent R., Soparkar P. et De Paola P.F., 1990.** Association of the Microbial Flora of Dental Plaque and Saliva with Human Root-surface Caries. *Journal of Dental Research*, 69(8):1463-8.
- Van Houte J. ; Lopman J. et Kent R., 1994.** The predominant cultivable flora of sound and carious human root surfaces. *J Dent Res.*, 73: 1727-34.
- Van nieuw amerongen A., Bolscher J.G.M., Veerman E.C.I. , 2004.** Salivary proteins : protective and diagnostic value in cariology ? *caries research* 38 : 247-253.
- van Ruyven F.O., Lingstrom P., Van Houte J. et Kent R., 2000.** Relationship among mutans streptococci, ‘low pH ‘ bacteria, and iodophilic polysaccharide-producing bacteria in dental plaque and early enamel caries in humans. *Journal of Dental Research*, 79: 778-784.
- Vieira A.R., Marazita M.L. et Goldstein-McHenry T., 2008.** Genome-wide scan finds suggestive caries loci, *Journal of Dental Research*, 87(5) : 435–439, 2008.
- Wheelis M., 2008.** Principles of modern microbiology, Jones and Bartlett Publishers, Inc., Sudbury, MA, 528 p.
- WHO., 1997.** Oral health surveys: basic methods, 4th ed. p.41. World Health.
- Williams R.E.O., Hirsch A.N.N. et Cowan S.T., 1953.** *Aerococcus*, a New Bacterial Genus .*Journal of general Microbiology*, 8 :475-480.

Références bibliographiques

- Woelfel JB., Scheid RC., 2007.** Anatomie dentaire. Application à la pratique de la chirurgie dentaire. Paris, Editions Maloine.
- Yacoubi, A., Bouziane, D., Makhrelouf, L., Bensoltane, A., 2010.** Microbiological Study of Periodontitis in the West of Algeria. *Adv. in Med. Dent. Sci.* 3(3): 80-85.
- Yang J., Yoshida Y., Cisar J.O., 2014.** Genetic basis of coaggregation receptor polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus sanguinis* and related species. *Mol Oral Microbiol.*, 29(1):24-31.
- Zambon J. J., et Kasprzak S. A., 1995.** The microbiology and histopathology of human root caries. *Am J Dent.*, 8:323-8.
- Zaremba M.L. et Borowski J., 2001.** Mikrobiologia lekarska. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, wyd. 3,.
- Zaremba M.L.; Stokowska W.; Klimiuk A.; Daniluk T.; Rozkiewicz D.; Cylwik-Rokicka D.; Waszkiel D.; Tokajuk G.; Kierklo A.; Abdelrazek S., 2006.** Microorganisms in root carious lesions in adults. *Advances in Medical Sciences · Vol. 51 (1) : 238-240.*
- Zaura E. et Mira A., 2015.** Editorial: The oral microbiome in an ecological perspective. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2015, 5: 39.
- Zero D.T., 2004.** Sugars – the arch criminal? *Caries Res.*, 38:277-85. 21. Cours des comptes. Rapport sur la sécurité sociale 2010. Chapitre 13 « les soins dentaires »:326-7.
- Ziebuhr W., Lobner I., Krimmer V. et Hacker J., 2001.** Methods to detect and analyse phenotypic variation in biofilm-forming. *Methods in Enzymology*, 336: 195-203.
- Zijne V., Ammann T., Thurnheer T. et Gmür R.,2012.** Subgingival biofilm structure. *Front Oral Biol.*, 15:1-16.
- Ziouani S., Klouche Khelil N., Ben-yelles I., Hoceini A., Aissaoui N., Nas F. et Ghellai L., 2015.** Oral microflora of supragingival and subgingival biofilms in Algerian healthy adults. *African Journal of Microbiology Research*, 9(23): 1548-1557.

Annexe N°1: Modèles des questionnaires remplis par les sujets des deux populations

Fiche de questionnaire pour sujets indemnes de caries

Nom et prénom

Date de naissance lieu

Adresse

Sexe homme femme

Profession.....

Conditions socioéconomiques

Le motif de la consultation

Soins contrôle

Fréquence de brossage des dents

- Régulière

1 fois 2 fois 3 fois >3 fois

- Irrégulière

Nettoyage inter dentaire:

Soie dentaire (s) Cure-dents (cd) brosse interdentaire

Combinaison (s+cd) rien utilisé

Type de dentifrice:

Marque.....

Non fluorée fluorée

Régime alimentaire glucidique

Oui Non

Grignotage entre les repas

Oui Non

Tabagisme et alcoolisme

Oui Non

Présence de mauvaise haleine

Oui Non

Saignement de la gencive lors du brossage des dents

Oui Non

Douleurs des dents

Oui Non

Hygiène

Acceptable Non acceptable

Douleur lors de la mastication

Oui Non

Date de prélèvement : / /

Signature

Fiche de questionnaire pour sujets ayant des dents cariées

Nom et prénom

Date de naissance lieu

Adresse

Sexe homme femme

Profession.....

Conditions socioéconomiques

Le motif de la consultation

Soins contrôle

Fréquence de brossage des dents

- Régulière

1 fois 2 fois 3 fois >3 fois

- Irrégulière

Nettoyage inter dentaire:

Soie dentaire (s) Cure-dents (cd) brosse interdentaire

Combinaison (s+cd) rien utilisé

Type de dentifrice:

Marque.....

Non fluorée fluorée

Régime alimentaire glucidique

Oui Non

Grignotage entre les repas

Oui Non

Tabagisme et alcoolisme

Oui Non
Présence de mauvaise haleine

Oui Non
Saignement de la gencive lors du brossage des dents

Oui Non
Douleurs des dents

Oui Non
Hygiène

Acceptable Non acceptable

Nombre de dents :

Dents Cariées

Dents Absentes

Dents Obturées

Indice CAO =

Douleur lors de la mastication

Oui Non

Date de prélèvement : / /

Signature

Annexe N°2: photos personnelles de quelques étapes de la technique d'étude du biofilm (méthode de microplaques de titration MPT)



Fig .1. Inoculation de la microplaque de titration (96 puits) par la suspension préparée



Fig .2. Lavage des microplaques par la solution PBS

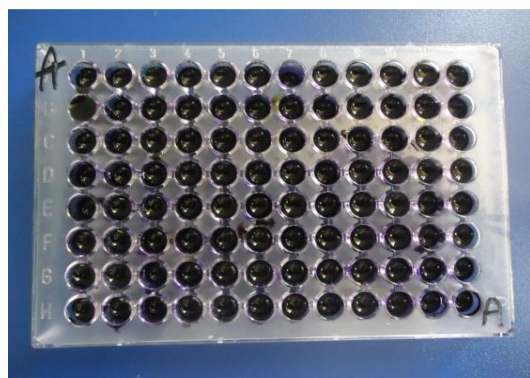


Fig .3. inoculation des puits par le crystal violet à 0.1%



Fig .4. Lecteur de microplaques (bioTek, Allemagne) (lecture de densité optique DO).

Annexe N°3: Tableaux de lecture des plaques API

1. Tableau de lecture des plaques API 20A

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
IND	L-tryptophane	0,98	formation d'INDole	XYL - mélanger / 2-3 min + EHR / 5 min jaune	rouge
URE	urée	0,648	UREase	jaune-orangé	rouge
GLU MAN LAC	D-glucose D-mannitol D-lactose (origine bovine)	1,96 1,96 1,96	acidification (GLUcose) acidification (MANnitol) acidification (LACtose)	BCP	
SAC MAL SAL XYL ARA	D-saccharose D-maltose salicine D-xylose L-arabinose	1,86 1,96 1,64 1,64 1,64	acidification (SACcharose) acidification (MALtose) acidification (SALicine) acidification (XYLose) acidification (ARABinose)	pourpre	jaune / vert-jaune
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment (1)	diffusion du pigment noir (1)
ESC	esculine citrate de fer	0,36 0,11	hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	jaune (2)	brun-noir (2)
				sous UV (365 nm)	
				fluorescence	pas de fluorescence
GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE	glycérol D-cellobiose D-mannose D-mélézitose D-raffinose D-sorbitol L-rhamnose D-tréhalose	1,82 1,86 1,96 1,96 2,18 2,18 1,96 1,96	acidification (GLYcérol) acidification (CELlobiose) acidification (ManNosE) acidification (MÉLÉZitose) acidification (RAFFinose) acidification (SORbitol) acidification (RHAmmose) acidification (TREhalose)	BCP	
				pourpre	jaune / vert-jaune
CAT		-	CATalase	Après 30 min à l'air libre H ₂ O ₂ dans un tube positif	
				absence de bulles	présence de bulles
SPOR		-	spores	absence	présence
GRAM		-	coloration de Gram	rose	violet
COCC		-	morphologie	bacille	coque

2. Tableau de lecture des plaques API 20 STREP

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS			
				NEGATIF		POSITIF	
VP	sodium pyruvate	1,9	production d'acétone (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / jusqu'à 10 min (3)			
				Incolore		Rose-Rouge	
HIP	acide hippurique	0,4	hydrolyse (acide Hippurique)	NIN / jusqu'à 10 min			
				Incolore/Bleu pâle Gris-bleuté		Bleu foncé/Violet	
ESC	esculine citrate de fer	1,16 0,152	hydrolyse β -glucosidase (ESCuline)	4 h	24 h	4 h	24 h
				Incolore Jaune pâle	Incolore Jaune pâle Gris clair	Noir Gris	Noir
PYRA	acide pyroglutamique- β -naphtylamide	0,0256	PYRrolidonyl Arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA à LAP) (1) au besoin décoloré par éclaircissement intense			
				Incolore ou Orange très pâle		Orange	
α GAL	6-bromo-2-naphtyl- α D- galactopyranoside	0,0376	α -GALactosidase	Incolore		Violet	
β GUR	acide naphtol-ASBI- glucuronique	0,0537	β -GluRonidase	Incolore		Bleu	
β GAL	2-naphtyl- β D- galactopyranoside	0,0306	β -GALactosidase	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
PAL	2-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	Incolore ou Violet très pâle		Violet	
LAP	L-leucine- β -naphtylamide	0,0256	Leucine AminoPeptidase	Incolore		Orange	
ADH	L-arginine	1,9	Arginine DiHydrolase	Jaune		Rouge	
				4 h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	D-ribose	1,4	acidification (RIBose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>ARA</u>	L-arabinose	1,4	acidification (ARABinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>MAN</u>	D-mannitol	1,36	acidification (MANnitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>SOR</u>	D-sorbitol	1,36	acidification (SORbitol)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>LAC</u>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACTose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>TRE</u>	D-tréhalose	1,32	acidification (TREhalose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>INU</u>	inuline	5,12	acidification (INUline)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>RAF</u>	D-raffinose	3,12	acidification (RAFFinose)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>AMD</u>	amidon (2)	2,56	acidification (AMIDon)	Rouge	Orange/ Rouge	Orange/ Jaune	Jaune
<u>GLYG</u>	glycogène	1,28	acidification (GLYcoGène)	Rouge ou Orange		Jaune franc	

3. Tableau de lecture des plaques API 20 STAPH

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
0	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
GLU	D-glucose	1,56	(Témoin positif) (D-GLUcose)	rouge *	jaune
FRU	D-fructose	1,4	acidification (D-FRUctose)		
MNE	D-mannose	1,4	acidification (D-ManNosE)		
MAL	D-maltose	1,4	acidification (MALtose)		
LAC	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification (LACtose)		
TRE	D-tréhalose	1,32	acidification (D-TREhalose)		
MAN	D-mannitol	1,36	acidification (D-MANnitol)		
XLT	xylitol	1,4	acidification (XyLiTol)		
MEL	D-mélibiose	1,32	acidification (D-MELibiose)		
NIT	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
PAL	β-naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> jaune violet	
VP	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> incoloro-rose pâle violet-rose	
RAF	D-raffinose	1,56	acidification (RAFFinose)	rouge	jaune
XYL	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
SAC	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
MDG	méthyl-αD- glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-αD- Glucopyranoside)		
NAG	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<u>ADH</u>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<u>URE</u>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet

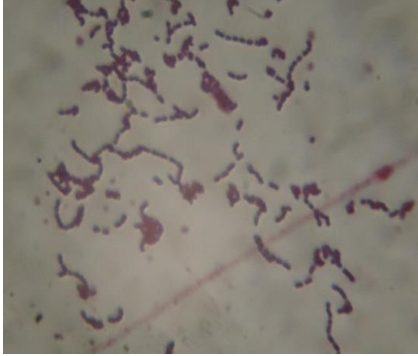
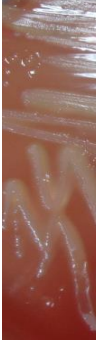
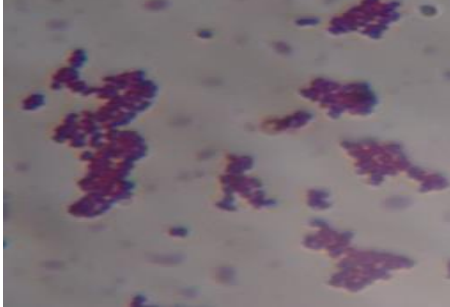



4. Tableau de lecture des plaques API 20 E

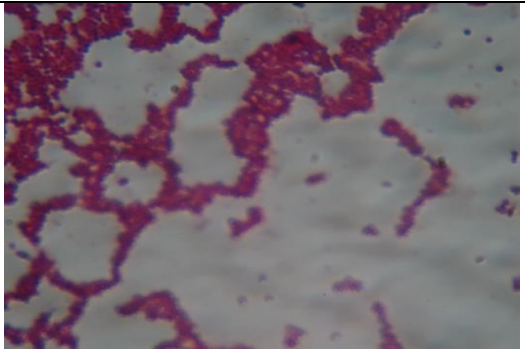

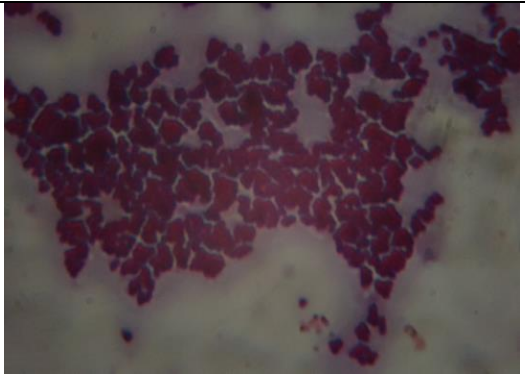

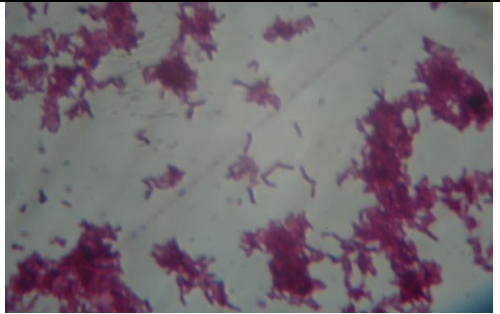
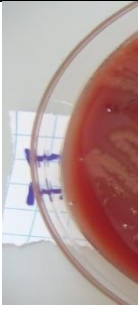
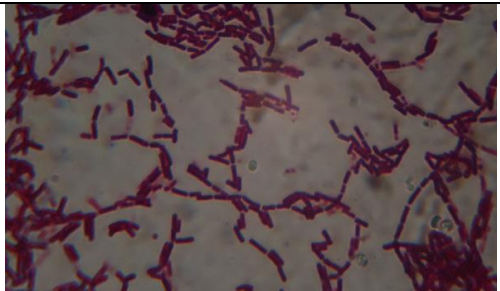
TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	REACTIONS-ENZYMES	RESULTATS	
			NEGATIF	POSITIF
ONPG	2-nitrophényl- β D-galactopyranoside	β -galactosidase (Ortho NitroPhényl- β DGalactopyranosidase)	incolore	jaune
<u>ADH</u>	L-arginine	Arginine DiHydrolase	Jaune	rouge - orangé
<u>LDC</u>	L-lysine	Lysine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>ODC</u>	L-ornithine	Ornithine DéCarboxylase	Jaune	rouge - orangé
<u>CIT</u>	trisodium citrate	utilisation du CITrate	vert pâle - jaune	bleu-vert – bleu
<u>H2S</u>	sodium thiosulfate	production d'H2S / H2S production	incolore - grisâtre	dépôt noir - fin liseré
<u>URE</u>	Urée	UREase	Jaune	rouge - orangé
TDA	L-tryptophane	Tryptophane DésAminase	Jaune	Marron – rougeâtre
IND	L-tryptophane	production d'INDole	JAMES-immédiat	
			Incolore-vert pâle-jaune	rose
	sodium pyruvate	production d'acétoïne	incolore - rose pâle	rose - rouge
	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase (GELatine)	Absence de diffusion	diffusion du pigment noir
GLU	D-glucose	fermentation - oxydation (GLUcose)	bleu - bleu-vert	jaune - jaune gris
MAN	D-mannitol	fermentation - oxydation (MANnitrol)	bleu - bleu-vert	Jaune
INO	Inositol	fermentation - oxydation (INOsitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
SOR	D-sorbitol	fermentation - oxydation (SORbitol)	bleu - bleu-vert	Jaune
RHA	L-rhamnose	fermentation - oxydation (RHAmnose)	bleu - bleu-vert	Jaune
SAC	D-saccharose	fermentation - oxydation (SACcharose)	bleu - bleu-vert	Jaune
MEL	D-melibiose	fermentation - oxydation (MELibiose)	bleu - bleu-vert	Jaune
AMY	Amygdaline	fermentation - oxydation (AMYgdaline)	bleu - bleu-vert	Jaune
ARA	L-arabinose	fermentation - oxydation (ARAbinose)	bleu - bleu-vert	Jaune
OX	(voir notice du test oxydase)	cytochrome-Oxydase	(voir notice du test oxydase)	
Réduction des nitrates tube GLU	potassium nitrate	production de NO2 réduction au stade N2	NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min	
			Jaune	rouge

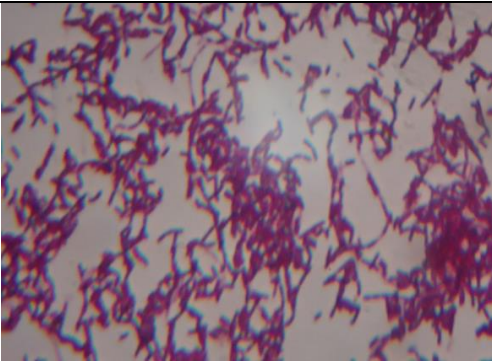

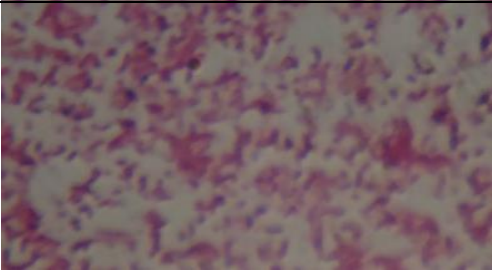

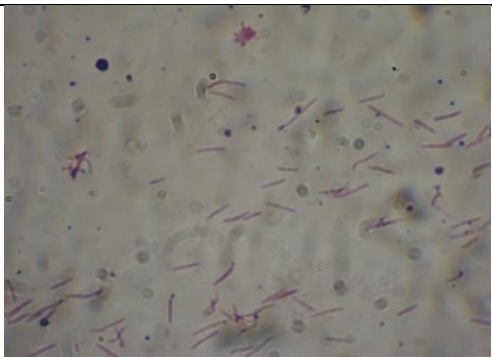

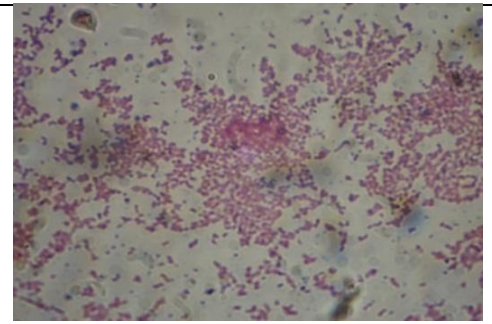

5. Tableau de lecture des plaques API 20 NE

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup.)	REACTIONS/ENZYMES	RESULTATS	
				NEGATIF	POSITIF
NO ₃	potassium nitrate	0,136	réduction des Nitrates en nitrites	NIT 1 + NIT 2 / 5 min	
			réduction des Nitrates en azote	incolore	rose-rouge
				Zn / 5 min	
				rose	incolore
TRP	L-tryptophane	0,2	formation d'indole (TRyptoPhane)	JAMES / Immédiat	
				incolore vert pâle / jaune	rose
GLU	D-glucose	1,92	fermentation (GLUcose)	bleu à vert	jaune
ADH	L-arginine	1,92	Arginine DiHydrolase	jaune	orange / rose / rouge
URE	urée	0,76	UREase	jaune	orange / rose / rouge
ESC	esculine citrate de fer	0,56 0,072	hydrolyse (β -glucosidase) (ESCuline)	jaune	gris / marron / noir
GEL	gélatine (origine bovine)	0,6	hydrolyse (protéase) (GELatine)	pas de diffusion du pigment	diffusion du pigment noir
PNPG	4-nitrophényl- β D- galactopyranoside	0,22	β -galactosidase (Para-NitroPhényl- β D- Galactopyranosidase)	incolore	jaune
[GLU]	D-glucose	1,56	assimilation (GLUcose)	transparence	trouble
[ARA]	L-arabinose	1,4	assimilation (ARAbinose)	transparence	trouble
[MNE]	D-mannose	1,4	assimilation (ManNosE)	transparence	trouble
[MAN]	D-mannitol	1,36	assimilation (MANnitol)	transparence	trouble
[NAG]	N-acétyl-glucosamine	1,28	assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)	transparence	trouble
[MAL]	D-maltose	1,4	assimilation (MALtose)	transparence	trouble
[GNT]	potassium gluconate	1,84	assimilation (potassium GlucoNaTe)	transparence	trouble
[CAP]	acide caprique	0,78	assimilation (acide CAPrique)	transparence	trouble
[ADI]	acide adipique	1,12	assimilation (acide ADIrique)	transparence	trouble
[MLT]	acide malique	1,56	assimilation (MaLaTe)	transparence	trouble
[CIT]	trisodium citrate	2,28	assimilation (trisodium CITrate)	transparence	trouble
[PAC]	acide phénylacétique	0,8	assimilation (acide PhénylACétique)	transparence	trouble
OX	(voir notice du test oxydase)	-	cytochrome-oxydase	(voir notice du test oxydase)	

Annexe N° 4 : photos personnelles de quelques espèces isolées à partir des plaques supragingivales des sujets d'autres indemnes de caries (aspects sur boîte et l'examen microscopique après coloration de coloration de

	Espèces	Coloration de GRAM	
I. Les aérobies			
Cocci Gram +			
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Streptococcus acidomonimus</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus oralis</i>		 <i>St</i>
<i>Gemella</i>	<i>Gemella morbillorum</i> <i>Gemella haemolysans</i>		 C
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>		 E

<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus sp</i>		
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>		 <i>Stap</i>
II. les anaérobies			
Bacille Gram+			
<i>Actinomyces</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Actinomyces meyeri</i> <i>Actinomyces viscosus</i> <i>Actinomyces israelii</i>		 <i>A</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>		

<p><i>Bifidobacterium</i></p>	<p><i>Bifidobacterium spp</i></p>		
<p>Bacille Gram-</p>			
<p><i>Prevotella</i></p>	<p><i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella melaninogenica/oralis</i></p>		
<p><i>capnocytophaga</i></p>	<p><i>Capnocytophaga sp</i></p>		
<p><i>Bacteroides</i></p>	<p><i>Bacteroides sp</i></p>		

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)



Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apitb

ELSEVIER

Original article <http://dx.doi.org/10.1016/j.apitb.2016.06.011>



Caries-related factors and bacterial composition of supragingival plaques in caries free and caries active Algerian adults

Amina Hocceini^{1,2*}, Nihel Klouche Khelil^{1,2}, Ilhem Ben-Yelles³, Amine Mesli¹, Sara Ziouani^{1,2}, Lotfi Ghellai¹, Nadia Aissaoui¹, Fatima Nas¹, Mounia Arab¹

¹Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment, Department of Biology, Faculty of Nature and Life, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

²Laboratory of Experimental Surgery, Dental Surgery Department, Faculty of Medicine, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

³Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, Department of Biology, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria

ARTICLE INFO	Caries-active
Article history:	Bacterial composition
Received 15 Jan 2016 Received in revised form 15 Feb, 2nd revised form 8 Mar 2016 Accepted 22 Apr 2016 Available online 11 Jun 2016	Algerian adults
	Cultural level
	Food intake

Keywords:

Supragingival plaque

Caries-free

A B S T R A C T

and filled teeth index according to the criteria laid down by the World Health Organization. Supragingival plaque samples were collected from 50 caries-free adults (CF) and 50 caries-active adults (CA). Standard procedures of culture and identification of aerobic and anaerobic bacteria were used. Data were analyzed using Chi-square test.

Objective: To compare oral hygiene practices, education and social background, food intake and oral malodor of Algerian adults suffering from dental caries with normal controls, and to determine and compare the bacterial composition of the supragingival plaques from the above-mentioned groups.

Methods: Participants completed a questionnaire and were clinically examined for dental caries using decayed, missing

Results: A total of 117 bacterial strains were isolated from supragingival plaques in CF group subjects, 76 (64.96%) of them belonged to 9 aerobic genera, and 41 (35.04%) to 9 anaerobic genera ($P < 0.05$). While in the second group, 199 strains were isolated, 119 (59.80%) of the strains belonged to 10 aerobic genera and 80 (40.20%) to 10 anaerobic bacteria ($P < 0.05$). *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Actinomyces meyeri*, *Lactobacillus acidophilus* and *Eubacterium limosum* showed a significantly higher prevalence in the CA group ($P < 0.05$). The findings revealed that CA group had a high sugar intake (80%). A significantly higher frequency of tooth brushing ($P < 0.000$) and a significantly less self-reported oral malodor ($P < 0.000$) and tooth pain ($P < 0.000$) were found in CF group, while there was no association of socioeconomic levels and intake of meal snacks with dental caries.

Conclusions: This study confirms the association of some aciduric bacteria with caries formation, and a direct association of sugar intake and cultural level with dental caries. Furthermore, oral hygiene practices minimize the prevalence of tooth decay.

*Corresponding author: Amina Hoceni, Laboratory of Applied Microbiology in Food, Biomedical and Environment, Department of Biology, Faculty of Nature and Life, University of Tlemcen, Tlemcen 13000, Algeria.

Tel: +213 559050991

E-mail: hoclamina@gmail.com

The study protocol was performed according to the Helsinki declaration and approved by the Tlemcen University Hospital Committee for research on human subjects. All participants were informed about the goals of this study and were asked to give their written consent.

Foundation Project: Supported by the National Committee of Research Program and Assessment (Cnepru-code I02020130110).

Peer review under responsibility of Hainan Medical University. The journal implements double-blind peer review practiced by specially invited international editorial board members.

2221-1691/Copyright © 2016 Hainan Medical University. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Dental plaque happens to be a diverse community of the microorganisms found on the tooth surface [1]. Greater than 700 microbial species inhabit the oral cavity [2]. The formation of dental plaque in a healthy individual involves an ordered pattern of colonization by a range of bacteria, and once a dynamic balance is established, the composition of the resident microbiota of each site remains relatively stable over time [3]. Dental caries is one of the most common chronic and multifactorial diseases affecting the human population [4]. It is considered by the World

Health Organization as one of the most important global oral health burdens that affects people of various age groups all over the world.

Cariogenic plaques result when acidogenic and aciduric bacterial species increase following high frequency of exposure to carbohydrate. The microbial metabolism of such carbohydrates will result in the acidification of the biofilm, which in turn may lead to acid-induced demineralization of the dental hard tissues [5]. Moreover, the prevalence and incidence of dental caries in a population is influenced by a number of risk factor such as sex, age, socioeconomic status, dietary patterns and oral hygiene habits [6].

There are three microbial hypotheses regarding the etiology of dental caries [7], namely the specific plaque hypothesis, the non-specific plaque hypothesis, and the ecological plaque hypothesis. The specific plaque hypothesis has proposed that only a few species of the total microflora are actively involved in disease [8]. Of which the most relevant were mutans streptococci [main species: *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) and

Streptococcus sobrinus] and lactobacilli [9]. Contrary to the specific plaque hypothesis, the non-specific plaque hypothesis suggests that caries is the consequence of the overall interaction of all the groups of bacteria within plaque [10]. The ecological plaque hypothesis suggests that caries is the result of an imbalance in the microflora due to ecological stress, resulting in an enrichment of certain disease-related micro-organisms [8].

Two closely related species of mutans streptococci, namely

S. mutans and *Streptococcus sobrinus*, are associated with dental caries in humans [11]. Based on current research, it is believed that the bacteria of the genus *Lactobacillus* are important in further caries development, especially in the dentin [12]. However, it is now recognized that a large number of species naturally present in oral plaque biofilm produce acid from dietary carbohydrate and that the consequent caries-associated microbiota is complex [13].

Since oral bacteria are considered as one of the etiologic factors involved in caries development, various microbial studies have been conducted to better understand this dental problem.

Because of a lack of data available for detecting the bacterial diversity of dental caries in the Algerian adults population, the present study was performed to determine all cultivable bacterial species associated with health and dental caries of permanent teeth in adults, to determine the associations of specific bacterial species or bacterial communities with healthy and carious teeth, and to reveal the relation of food intake, oral hygiene practices, cultural level, socioeconomic status and oral malodor with dental caries among Algerian adults

2. Materials and methods

2.1. Subject population

The study protocol was performed according to the Helsinki declaration and approved by the Tlemcen University Hospital Committee for research on human subjects. All participants were informed about the goals of this study and were asked to give their written consent.

One hundred healthy patients, aged 20–35 years were recruited from the dental clinic at the Departments of Dentistry, University of Tlemcen. They completed a medical and dental history questionnaire and signed an informed consent document. The questionnaire consisted of two parts. The first part consisted of general information such as age, sex and educational qualification. The second part consisted of six questions related to oral health, attitude and practices.

Subjects underwent dental examination for caries prevalence by a dentist, who applied the World Health Organization's caries diagnostic criteria to determine the decayed, missing, filled teeth (DMFT) index [14]. The subjects were divided into two groups: caries-free (CF) group (DMFT = 0, n = 50) and caries-active (CA) group (4 DMFT 8, n = 50).

Exclusion criteria included antibiotic therapy in the previous 3 months, any systemic diseases and having less than 24 permanent teeth.

2.2. Plaque sampling

Samples were collected in the morning, 12 h after tooth brushing and 2 h after the last food and/or drink intake.

The supragingival plaque samples of CF and CA groups were collected by isolating the teeth with sterile cotton rolls and rubbing the vestibular face of the smooth and proximal surfaces of the central and lateral incisor, canines, premolars, and the first and second molars with a sterile swab. Each sample was pooled in 1 mL of pre-reduced brain heart infusion broth, (pH 7.2, Oxoid, Basingstoke, UK) and transported immediately to microbiology laboratory located next to the dental clinic.

2.3. Microbiological processing

The specimens were processed in the laboratory for the cultivation of aerobic and anaerobic bacteria.

First, the samples were vortexed for 30 s and the suspension was serially diluted (10^{-1} – 10^{-4}) with sterile brain heart infusion broth (pH 7.2, Oxoid, Basingstoke, UK), aliquots (100 mL) of each dilution and the undiluted suspension were inoculated onto non-selective and selective media. Enriched blood agar [Columbia agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 5% laked blood] was used for the isolation of facultative and anaerobic bacteria. Plates were incubated anaerobically for 5–7 days at 37 C in an environment consisting of 80% N₂, 10% CO₂, and 10% H₂, and aerobically for 24–48 h at 37 C. Selective media such as MacConkey (Oxoid, Basingstoke, UK) used for the isolation of enterobacteria and Chapman (Oxoid, Basingstoke, UK) for staphylococci were also inoculated and incubated under an aerobic condition for 24–48 h at 37 C.

Bacterial identification was based on the colony morphology and pigmentation, Gram staining and the biochemical reactions (API 20 A, API 20 Strep, API 20 E, API 20 Staph) (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) [15,16]. Antibiotics sensitivity test was also used to confirm biochemical test results.

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed on SPSS v.20.0 statistics software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Simple frequency tables and descriptive statistics were processed and analyzed by Chi-square test (χ^2). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results them aged between 20 and 25 years, 16 (32%) within 25–30 years and 3 (6%) were within 30–35 years (Table 1).

Table 1

Socio-demographic distribution frequency in adults with and without caries (%).

General information	Without caries (n = 50)	With caries (n = 50)	P value
---------------------	----------------------------	-------------------------	---------

Age group			
20–25	82	62	< 0.05
26–30	18	32	
31–35	0	6	
Gender			
Male	26	32	> 0.05
Female	74	68	
SES			
Low	0	6	> 0.05
Middle	70	74	
High	30	20	
Cultural level			
Low	4	26	< 0.05
High	96	74	

SES: Socioeconomic status. $P < 0.05$: Statistically significant difference between parameter frequency for subjects with and without active caries.

In CF group, 15 (30%) persons belong to high social class and 35 (70%) to middle social class. Whereas in the CA group, 10 (20%) persons belong to a high social class, 37 (74%) to middle social class and 3 (6%) to lower social class (Table 1). Patients with lower education background had a statistically highly significant caries experience ($P < 0.05$) compared to those with higher levels of education (Table 1).

The frequency of each parameter for subjects with and without active caries is shown in Table 2. A significant difference

A total number of 100 individuals were examined for dental caries. One half (50%) was CA, whereas the other half was CF.

The questionnaire data revealed that there were 13 males (26%) and 37 females (74%) in the CF group, in which 41 (82%) persons were aged between 20 and 25 years and 9 (18%) within 25–30 years age group. Whereas in the second group, there were 16 (32%) males and 34 (68%) females, in which 31 (62%) of

Table 2

Clinical parameters frequency in adults with and without caries (%).

Clinical parameters	Without caries	With caries	P value
	(n = 50)	(n = 50)	
Sugar intake			
Yes	30	80	< 0.05
No	70	20	
Tooth-brushing frequency			
Irregular	2	50	
Once a day	8	28	< 0.05
Twice a day	62	22	
More than twice a day	28	0	
Tooth pain			
Yes	0	46	
No	100	54	< 0.05
Oral malodor			
Yes	6	32	< 0.05
No	94	68	
Intake of between meal snacks			
Yes	54	56	> 0.05
No	46	44	
Inter-dental cleaning			
Dental floss (F)	24	0	
Toothpick (TP)	6	8	< 0.05
Inter-dental brush	12	2	
Combination (F + TP)	20	8	
Nothing used	38	82	

P < 0.05: Statistically significant difference between parameter frequency for subjects with and without active caries.

between adults with and without active caries was observed in sugar intake, oral malodor, tooth-brushing frequency, tooth pain

and inter-dental cleaning (P < 0.05). However, there were no significant differences in intake between meal snacks.

The analysis of dental plaques of CA adults revealed the presence of 117 strains belonging to 18 genera of 9 aerobic and 9 anaerobic genera (P < 0.05). And from dental plaques of adults with caries, a total of 199 strains were isolated, with 10 aerobic and 10 anaerobic genera.

Moreover, there were more isolation of Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria for the two groups (P < 0.05).

There were no significant differences between the isolation rate of various species in examined groups, except for *S. mutans*

(6% vs. 20%) (P < 0.05), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (16% vs. 38%) (P < 0.05), *Aerococcus viridans* (*A. viridans*) (6% vs. 22%) (P < 0.05), *Actinomyces meyeri* (*A. meyeri*) (10% vs. 28%) (P < 0.05), *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) (6% vs. 22%) (P < 0.05), and *Eubacterium limosum*

(*E. limosum*) (0% vs. 8%) (P < 0.05), which were statistically significant, and occurred in CA subjects (Table 3).

Table 3

Isolation frequency of aerobic and anaerobic bacteria in supragingival

plaque of CF and CA groups (%).

Bacterial species	Supragingival plaque		P value
	CF (n = 50)	CA (n = 50)	
I. Aerobic bacteria			
Gram-positive cocci			
<i>Streptococcus sanguinis</i>	2	4	0.558
<i>Streptococcus acidomonimus</i>	10	12	0.749
<i>Streptococcus constellatus</i>	8	14	0.338
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10	10	1.000
<i>Streptococcus uberis</i>	4	6	0.646
<i>S. mutans</i>	6	20	0.037
<i>Streptococcus oralis</i>	4	6	0.646

Streptococcus anginosus	8	12	0.505
Streptococcus intermedius	2	6	0.307
Gemella morbillorum	4	0	0.153
Gemella haemolysans	8	6	0.695
E. faecium	16	38	0.013
Micrococcus sp.	0	2	0.315
A. viridans	6	22	0.021
S. aureus	8	12	0.505
Staphylococcus hominis	8	10	0.727
Lactococcus lactis ssp. lactis	8	10	0.727
Lactococcus lactis ssp. cremoris	10	8	0.727
Gram-negative cocci			
Moraxella spp.	14	16	0.779
Gram-negative rods			
Klebsiella pneumoniae	12	10	0.749
Aeromonas hydrophila	8	14	0.338
II. Anaerobic bacteria			
Gram-positive rods			
Actinomyces naeslundii	24	30	0.499
A. meyeri	10	28	0.022
Actinomyces israelii	4	6	0.646
Actinomyces viscosus	0	2	0.315
L. acidophilus	6	22	0.021
Bifidobacterium spp.	2	6	0.307
Propionibacterium propionicum	8	12	0.505
E. limosum	0	8	0.041
Gram-negative rods			
Prevotella sp.	8	18	0.137
Fusobacterium mortiformum	4	8	0.400
Capnocytophaga sp.	6	10	0.461
Bacteroides sp.	2	6	0.307
Porphyromonas asaccharolytica	4	4	1.000

P < 0.05: Statistically significant difference between species isolation frequency for subjects with and without active caries. S. aureus:

Staphylococcus aureus.

For the CA group, E. faecium were the major isolated strains (38%) followed by Actinomyces naeslundii (30%) (Table 3). Whereas, S. mutans and L. acidophilus represented 20% and 22% respectively.

4. Discussion

The present study offers the first description of the micro-flora associated with supragingival plaque in CF and CA Algerian adults based on culture methods. A wide diversity of bacterial species was observed. The relationship between cultural level, socioeconomic status, the food intake, oral hygiene practices, tooth pain, and oral malodor with dental caries was revealed by the questionnaires data.

Women had higher prevalence and severity of caries compared to men, which was consistent with the findings of Lukacs [17], Doyal and Naidoo [18], and Ferraro and Vieira [19]. This higher caries prevalence in females may be due to different salivary composition and flow rate, hormonal fluctuations during pregnancy, dietary habits, and particular social roles of women among their family (caretaker, meal preparation, etc.) [19]. Other studies have proposed that the differential effects of genes influencing dental caries may partly explain the observed differences in the two sexes [20].

Eighty-three studies found at least one measure of caries to be significantly higher in low socioeconomic position compared with high socioeconomic position individuals, while only three studies found the opposite [21]. In the present study, there were no association between socioeconomic status and caries prevalence in Algeria (P < 0.05) due to the free medical services that allow access to dental care services to all socioeconomic levels.

The frequency of sugar intake was most important in CA adults (80%) than that of in CF adults (30%). Previous studies have observed a linear relationship between sugar consumption and caries [22].

It is now recognized that there are a large number of species naturally occurring in the oral plaque biofilm, which produces acid from dietary carbohydrate [13]. However, when the presence of fermentable carbohydrates is frequent, a gradual increase in such bacteria occurs in the oral environment, causing an imbalance in the demineralization/remineralization process in dental tissues [23]. A caries process progress and a lesion develops when the remineralization is not given enough time to eliminate the damage done during demineralization [24].

In this study, mutant streptococci and lactobacilli were more frequently isolated from supragingival plaques of CA subjects (20% and 22% respectively). Several studies in humans are largely based on the mathematical relationship between various streptococci, lactobacilli and dental caries [25].

Sixty-two percent of the CF group brushed their teeth twice a day, whereas 50% of the CA group brushed less than once a day. Tooth brushing with a fluoride-containing toothpaste is one of the main oral behaviors to reduce the number of bacteria in the oral cavity [26]. Fluoride application removes bacteria from the mouth, and concomitantly reduce the risk of tooth caries.

For areas between the teeth that a toothbrush can't reach, regular flossing will help prevent tooth decay by removing food particles [27], 24% of adults without tooth decay used dental floss and 38% of this group used dental floss in combination with toothpick.

The significant difference in oral malodor between subjects with and without active caries (Table 1) shows that oral mal-odor in subjects with active caries (32%) was significantly higher than in those without active caries (6%) ($P < 0.05$). Poor oral hygiene habits and presence of conditions such a dryness of mouth, bleeding gums, dental caries and coating or deposits over tongue tend to influence the prevalence of halitosis [28].

The anaerobic microbiota of the tongue biofilm is one of the main factor responsible for the release of sulfur-containing compounds, which are directly involved in the occurrence of halitosis [29]. Previous research showed that among the Gram-negative bacteria, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium species, Tannerella forsythia, and Treponema denticola are major contributors of volatile sulfur compounds [30], which may be the reason of the high frequency of Prevotella (18%) in supragingival plaque of CA Algerian adults.

There was no statistical significant differences between the examined groups when it comes to snacks intake between meals ($P = 0.841$). These results are in accordance with previous study [31]. Moreover, Bowen et al. [32] concluded that it is not the frequency of ingestion per say that is related to the development of caries, but the time that sugars are available to microorganisms in the mouth.

According to the results of the present study, it is concluded that there was no significant difference of bacterial genera composition isolated from supragingival plaques in adults with and without caries except for Micrococcus sp. and E. limosum that was absent in the CA supragingival plaque.

There were more isolations of Gram-positive than Gram-negative bacteria in plaques of CF (75.21%, 24.79%) ($P < 0.05$) and CA subjects (78.39%, 21.61%) ($P < 0.05$), which concur with those reported by Ahmed et al. [33] and Ziouani et al. [34]. In another hand, facultative anaerobes and aerobic bacteria were more predominant than anaerobic bacteria in supragingival plaques of CF (66.67%, 33.33%) ($P < 0.05$) and CA groups (59.80%, 40.20%) ($P < 0.05$), while other authors indicated that aerobic bacteria were isolated more frequently from supragingival plaque of both groups [34,35].

A wide range of the Streptococcus genera was isolated from the supragingival plaque of both the CF and CA Algerian subjects, which confirmed previous reports that some Streptococcus species are associated with healthy states [36], while others are associated with disease states [37]. S. mutans was more frequent in supragingival plaque of CA adults (10/50; 20%) than CF adults (3/50; 6%) ($P < 0.05$) (Table 3). A similar finding was observed in a previous study showing a positive correlation of dental caries with increasing titers of S. mutans [38]. In a parallel way, the incidence rate of L. acidophilus in CA samples (22%) were higher than in CF samples (6%) ($P < 0.05$) (Table Previous researches have reported that Lactobacillus is considered as essential acido-genic bacteria causing caries [39].

According to these results, mutans streptococci and Lactobacillus spp. are the main aetiologic agents of dental caries in humans [40,41].

Previous studies indicated that the genera of Actinomyces in plaque are significantly associated with dental caries [42]. Several species of these genera were isolated from plaques of CF and CA Algerian adults, in which A. meyeri was isolated with a significant statistical difference ($P < 0.05$).

3). Studies on co-aggregation interactions between Streptococcus spp. and Actinomyces spp. have revealed that the inter-bacterial adhesion between these two bacteria promotes early dental plaque biofilm development [43]. More importantly, those early colonizing bacteria provide specific binding sites either directly or through salivary glycoproteins binding to the pioneer organisms for subsequent bacterial colonization and promote the development of biofilm [44].

E. faecium strains were more frequently isolated from supragingival plaques of CA subjects (19/50; 38%) than CF subjects (8/50; 16%) with a significant statistical difference ($P < 0.05$). They have been known to be acidogenic and aciduric and they are not commonly seen in the human oral cavity [45] until the studies of Reyes et al. in 2012 [46], which was the first known report of its isolation in the oral cavity of CA humans. This bacterium was also isolated with a high frequency in supragingival plaques of CF Algerian adults [34].

Another bacterium found in the CA and CF plaque samples in this study is Prevotella sp. with an important frequency in the CA supragingival plaques (9/50; 18%). Previous research

has shown that Prevotella spp. and Capnocytophaga spp. possess similar co-aggregation properties [47]. Moreover, Gomar-Vercher et al. [48] found that Prevotella showed an increasing percentage in caries compared to healthy individuals.

The strain A. viridans was also isolated from the supragingival plaque samples of CF and CA (6%, 22%) groups with a significant statistical difference ($P < 0.05$). This bacterium is

present only in very small numbers in the upper respiratory tract of normal persons, and they may be present in rather small numbers on normal skin [49]. But there have been no reports on the isolation of this bacterium from dental plaque until the studies of Ziouani et al. [34] which revealed the presence of an important frequency of *A. viridans* in supragingival plaques of CF Algerian adults. Also, previous studies have found that the majority of this α -group (aerococci) form acid in glucose broth (final pH value 5.0–5.6) [49].

Members of the genera *Fusobacterium*, *Porphyromonas* and

Bacteroides were also isolated from the supragingival plaques of both groups. They are able to coaggregate with other bacteria in the oral cavity [50,51].

Some bacterial species which are putative respiratory pathogens [52] (e.g. *S. aureus*) colonize the supragingival plaques of CF (8%) and CA adults (12%). A similar isolation was observed in supragingival plaque of CF adults [53] and CA patients [54]. *S. aureus* are transient microorganisms in the mouth and are secondary invaders of the dental caries [55].

In the other hand, microbial investigations have shown that the bacterium *Moraxella* is an exclusive human pathogen involving the upper respiratory tract [56]. This bacterium was isolated from supragingival plaque of CF (14%) and CA subjects (16%).

Culture methods represented an important tool for the detection of bacteria from supragingival plaque and another site of the oral cavity. This is the first study that elucidates supragingival plaque bacterial diversity in CF and CA Algerian adults.

The supragingival bacterial flora of both groups was composed mainly of Gram-positive aerobic and facultative anaerobic bacteria. A lot of genera represented the main part of the total microbiota, independent of the presence or absence of caries.

We were able to pinpoint several caries-related genera included *S. mutans*, *E. faecium*, *A. viridans*, *A. meyeri*, *L. acidophilus* and *E. limosum*. When *A. viridans* was isolated for the first time from dental plaque, this bacterium was also isolated from supragingival and subgingival plaques of Algerian adults [34].

[22] [Grover HS, Blaggana A, Jain Y, Saini N. Detection and measurement of oral malodor in chronic periodontitis patients and its correlation with levels of select oral anaerobes in subgingival plaque. Contemp Clin Dent 2015; 6\(Suppl 1\): S181-7.](#)

[23] [Punitha VC, Amudhan A, Sivaprakasam P, Rathana Prabhu V. Role of dietary habits and diet in caries occurrence and severity among urban adolescent school children. J Pharm Bioallied Sci 2015; 7\(Suppl 1\): S296-300.](#)

[24] [Bowen WH, Amsbaugh SM, Monell-Torrens S, Brunelle J. Effects of varying intervals between meals on dental caries in rats. Caries Res 1983; 17: 466-71.](#)

[25] [Ahmed A, Liu JJ, Moosa Y, Tang L, Zang SZ, Xin Y. Mi-crobial profiling of dental caries and periodontitis patients using denaturing](#)

The present findings support the ecological plaque hypothesis, in that caries is the result of an imbalance in the total microflora due to ecological stress, resulting in a growth advantage of some “oral pathogens” or disease-related micro-organisms [57].

A strong association was found between carbohydrate consumption and the presence of dental caries among 20–35 year-old Algerian adults. Tooth brushing and oral hygiene practices were inversely associated with dental caries.

Cultured microorganisms are required for antibiotic resistance, capacity for biofilm formation and molecular methods.

Future research should focus on the structure as well as the behavior and function of plaque bacterial communities. It will also be important to control the oral micro-flora for systemic reasons since strong links are being established between oral pathologies and other diseases, such as cardiovascular disease, certain types of cancer, and pulmonary infections [58].

In conclusion, the microbial diversity found in the present study should, therefore, be considered in the treatment strategy of caries in adult patients.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the National Committee of Research Program and Assessment (Cnepru-code I02020130110).

References

[gradient gel electrophoresis. Afr J Microbiol Res 2012; 6\(10\): 2559-66.](#)

- [34] [Ziouani S, Klouche Khelil N, Benvelles I, Hoceini A, Aissaoui N, Nas F, et al. Oral microflora of supragingival and subgingival biofilms in Algerian healthy adults. Afr J Microbiol Res 2015; 9\(23\): 1548-57.](#)
- [35] [Maripandi A, Arun Kumar T, Al Salamah AA. Prevalence of dental caries bacterial pathogens and evaluation of inhibitory concentration effect on different tooth pastes against Streptococcus spp. Afr J Microbiol Res 2011; 5\(14\): 1778-83.](#)
- [36] [Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. J Clin Microbiol 2008; 46\(4\): 1407-17.](#)
- [37] [Simon L. The role of Streptococcus mutans and oral ecology in the formation of dental caries. J Young Investig 2007. \[Online\] Available from: <http://www.jvi.org/issue/the-role-of-streptococcus-mutans-and-oral-ecology-in-the-formation-of-dental-caries/> \[Accessed on 15th March, 2016\]](#)
- [38] [Pannu P, Gambhir R, Sujana A. Correlation between the sali-vary Streptococcus mutans levels and dental caries experience in adult population of Chandigarh, India. Eur J Dent 2013; 7\(2\): 191-5.](#)
- [39] [Hiremath SS. Textbook of preventive and community dentistry. 2nd ed. Chennai: Elsevier India; 2011, p. 336.](#)
- [40] [Seki M, Yamoshita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. Oral Microbiol Immunol 2006; 21: 47-52.](#)
- [41] [Dymock D. Detection of microorganisms in dental plaque. In: Jass J, Surman S, Walker J, editors. Medical biofilms. New York: John Wiley & Sons Ltd; 2003, p. 199-220.](#)
- [42] [Nvvad B, Crielaard W, Mira A, Takahashi N, Beighton D. Dental caries from a molecular microbiological perspective. Caries Res 2013; 47\(2\): 89-102.](#)
- [43] [Yang J, Yoshida Y, Cisar JO. Genetic basis of coaggregation receptor polysaccharide biosynthesis in Streptococcus sanguinis and related species. Mol Oral Microbiol 2014; 29\(1\): 24-31.](#)
- [44] [Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. Virulence 2011; 2\(5\): 435-44.](#)
- [45] [Tanzer JM, Livingston J, Thompson A. The microbiology of primary dental caries in humans. J Dent Educ 2001; 65\(10\): 1028-37.](#)
- [46] [Reyes CPA, Dalmacio LMM. Bacterial diversity in the saliva and plaque of caries-free and caries-active Filipino adults. Philipp J Sci 2012; 141\(2\): 217-27.](#)
- [47] [Shen S, Samaranyake LP, Yip HK. Coaggregation profiles of the microflora from root surface caries lesions. Arch Oral Biol 2005; 50: 23-32.](#)
- [48] [Gomar-Vercher S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Montiel-Company JM, Almerich-Silla JM. Relationship of children's sali-vary microbiota with their caries status: a pyrosequencing study. Clin Oral Investig 2014; 18: 2087-94.](#)
- [49] [Williams RE, Hirsch A, Cowan ST. Aerococcus, a new bacterial genus. J Gen Microbiol 1953; 8: 475-80.](#)
- [50] [Lamont RJ, Jenkinson HF. Oral microbiology at a glance. Singapore: Wiley-Blackwell; 2010, p. 6-7.](#)
- [51] [Daep CA, Lamont RJ, Demuth DR. Interaction of Porphyromonas gingivalis with oral Streptococci requires a motif that resembles the eukaryotic nuclear receptor box protein-protein interaction domain. Infect Immun 2008; 76\(7\): 3273-80.](#)
- [52] [Sumi Y, Miura H, Nagaya M, Michiwaki Y, Uematsu H. Colonization on the tongue surface by respiratory pathogens in residents of a nursing home – a pilot study. Gerontology 2006; 23: 55-9.](#)
- [53] [Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, Nemoto TK. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. J Med Microbiol 2008; 57\(Pt 1\): 95-9.](#)
- [54] [Ooshima T, Yoshida T, Aono W, Takei T, Izumitani A, Sobue S, et al. Changes with time in the oral microflora and dental caries induction in hyposalivated rats fed on sucrose diet. Microbiol Immunol 1992; 36\(12\): 1223-31.](#)

[55] [Davis EA, Harris JB. Microbiology. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1990.](#)

[56] [El Lakkis I, Khardori N. The mighty world of microbes: an overview. In: Wattal C, Khardori N, editors. Hospital infection prevention: principles & practices. New Delhi: Springer India; 2014, p. 9.](#)

- [57] [Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent Res 1994; 8: 263-71.](#)
- [58] [DeWitte SN, Bekvalac J. Oral health and frailty in the medieval English cemetery of St. Mary Graces. Am J Phys Anthropol 2010; 142\(3\): 341-54.](#)

الأهداف: كان الهدف من هذه الدراسة مقارنة الممارسات الصحية لنظافة الفم، المستوى التعليمي والاجتماعي، النظام الغذائي والرائحة الكريهة للفم بين البالغين جزائريين يعانون من تسوس الأسنان و آخرين ذوو اسنان سليمة، كان هدف آخر من هذه الدراسة لتحديد ومقارنة تكوين البكتيريا في لويحت فوق اللثة لمجموعات المذكورة أعلاه وقمنا ايضا بتقييم قدرة البكتيريا الفموية على تكوين البيوفيلم الفموية.

الطرق: قام المشاركون بملء استبيان وتم فحص سريري لتحديد المؤشر الخاص بالأسنان المفقودة والأسنان المسوسة والمصانة وفقا للمعايير التي وضعتها منظمة الصحة العالمية. تم جمع عينات لويحت فوق اللثة من 50 بالغ بأسنان مسوسة و 50 بالغ ذو اسنان سليمة واستخدمت الطرق الميكروبيولوجية الكلاسيكية للتعرف على البكتيريا الهوائية واللاهوائية. وقد تم تحليل البيانات باستخدام الاختبار الاحصائي النوعي. وقد استخدمنا لدراسة قدرة البكتيريا على تكوين البيوفيلم الفموية تقنيتي

النتائج: تم عزل 117 سلالات بكتيرية من اللويحت فوق لثوية للأشخاص السليمين من التسوس، 76 (64.95%) منهم ينتمون إلى 9 أجناس هوائية، و 41 (35.05%) إلى 9 أجناس لاهوائية (>0.05). في المجموعة الثانية، تم عزل 199 سلالات، 119 (59.79%) من السلالات تنتمي إلى 10 اجناس هوائية و 80 (40.21%) إلى 10 اجناس لاهوائية (>0.05) أظهرت البكتيريا المذكورة اثناء معدلات عالية عند الأشخاص ذوو الاسنان المسوسة

Streptococcus mutans, Enterococcus faecium, Aerococcus viridans, Actinomyces meyeri, Lactobacillus acidophilus و Eubacterium limosum

كشفت النتائج ان الأشخاص الذين يعانون من التسوس يتناولون كميات كبيرة من السكر (80%) و اظهرت هذه الدراسة ارتفاع نسبة فرش الاسنان عند الاشخاص ذوو الاسنان السليمة ونسبة جد ضئيلة لالم الاسنان و رائحة الفم الكريهة عند نفس المجموعة في حين لم يكن هناك ارتباط بين المستوى الاجتماعي وتناول الطعام بين الوجبت مع التسوس

نتائج الدراسة تؤكد تأثير السكر في تحسين القدرة على تشكيل البيوفيلم بالنسبة للسلالات المعزولة فضلا عن الاعتماد على تقنية (MTP) بالمقارنة مع تقنية (RCA) في دراسة تشكيل البيوفيلم الفموي.

الخلاصة: هذه الدراسة تؤكد ارتباط بعض البكتيريا مع تشكيل تسوس الأسنان، وارتباط مباشر لتناول السكر والمستوى الثقافي مع تسوس الأسنان، وعلاوة على ذلك، ممارسات النظافة الصحية الفموية تقلل من انتشار تسوس الأسنان

الكلمات الرئيسية: لوحة فوق اللثة، تسوس، التكوين البكتيريا، البالغين جزائريين، المستوى الثقافي، وتناول الطعام

Abstract

Objectives: The aim of this study was to compare oral hygiene practices, education and social background, food intake and oral malodor between Algerian adults suffering from dental caries in comparison with normal controls, another objective of the study was to determine and compare the bacterial composition of the supragingival plaques from the above-mentioned groups. The strains biofilm formation capacity was also assessed.

Methods: Participants completed a questionnaire and were clinically examined for dental caries using decayed, missing and filled teeth (DMFT) index according to the criteria laid down by the World Health Organization. Supragingival plaque samples were collected from 50 caries-free adults (CF) and 50 caries-active adults (CA). Standard procedures of culture and identification of aerobic and anaerobic bacteria were used. Data were analyzed using Chi-square test. MTP and CRA methods were used to assess the strains biofilm formation capacity.

Results: 117 bacterial strains were isolated from supragingival plaques in caries-free subjects, 76 (64.95%) of them belonged to 9 aerobic genera, and 41 (35.05%) to 9 anaerobic genera ($p < 0.05$), while in the second group, 199 strains were isolated, 119 (59.79%) of the strains belonged to 10 aerobic genera and 80 (40.21%) to 10 anaerobic bacteria ($p < 0.05$). *Streptococcus mutans, Enterococcus faecium, Aerococcus viridans, Actinomyces meyeri, Lactobacillus acidophilus and Eubacterium limosum* showed a significantly higher prevalence in the CA group ($p < 0.05$).

The findings revealed that (CA) group had a high sugar intake (80%). A significantly higher frequency of tooth brushing ($P < 0.000$) and a significantly less self-reported oral malodor ($P < 0.000$) and tooth pain ($P < 0.000$) were found in (CF) group. While, there was no association of socio economic levels and intake of between meal snacks with dental caries ($p > 0.05$).

The results of this study confirm the effect of sucrose in improving the biofilm formation capacity of isolated strains as well as the reliability of the quantitative technique of microtiter plates (PMT) compared to the qualitative method on Red Congo agar (RCA) in the study of the biofilm formation capacity.

Conclusion: this study confirms the association of some aciduric bacteria with caries formation, and a direct association of sugar intake and cultural level with dental caries, furthermore, oral hygiene practices minimises the prevalence of tooth decay.

Key words: supragingival plaque, caries-free, caries-active, bacterial composition, Algerian adults, cultural level, food intake

Résumé

Objectifs: L'objectif de cette étude était de comparer les pratiques d'hygiène orale, l'éducation et le statut socio-économique, le régime alimentaire et la mauvaise haleine entre des adultes algériens ayant des dents cariées et d'autres qui sont indemnes de carie dentaire, un autre objectif de cette étude était de déterminer et comparer la composition bactérienne des plaques supra gingivales des groupes mentionnés ci-dessus. L'aptitude de formation du biofilm bucco-dentaire des isolats bactériens a été évaluée.

Méthodes: Les participants ont rempli un questionnaire et ont été examinés cliniquement pour déterminer l'indice CAO (dents cariées, absentes et obturées) selon les critères fixés par l'Organisation Mondiale de la Santé. Des échantillons des plaques supra gingivales ont été recueillis à partir de 50 sujets sans carie dentaire et 50 sujets présentant des lésions carieuses. Les méthodes classiques de culture et d'identification des bactéries aérobies et anaérobies ont été utilisées. Les données ont été analysées en utilisant le test khi deux (χ^2). Les méthodes PMT et RCA ont été utilisées pour étudier le pouvoir des souches à former le biofilm bucco-dentaire.

Résultats: 117 souches bactériennes ont été isolées à partir des plaques supragingivales des sujets indemnes de caries, 76 (64,95%) d'entre eux appartenaient à 9 genres aérobies, et 41 (35,05%) à 9 genres anaérobies ($p < 0,05$). Dans le deuxième groupe, 199 souches ont été isolées, 119 (59,79%) des souches appartenaient à 10 genres aérobie et 80 (40,21%) à 10 genres anaérobies ($p < 0,05$). *Streptococcus mutans, Enterococcus faecium, Aerococcus viridans, Actinomyces meyeri, Lactobacillus acidophilus et Eubacterium limosum* ont montré une prévalence significativement élevée dans le groupe des sujets ayant des dents cariées ($p < 0,05$).

Les résultats ont révélé que les adultes présentant des dents cariées ont une forte consommation de sucre (80%). Une fréquence significativement élevée de brossage des dents ($P < 0,000$) et une faible fréquence de mauvaise haleine ($P < 0,000$) et de douleur des dents ($P < 0,000$) ont été trouvés dans le groupe des adultes indemnes de caries. Alors qu'il n'y avait pas d'association entre le niveau socio-économique et le grignotage entre les repas avec la carie dentaire ($p > 0,05$).

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

Conclusion: cette étude confirme l'association de certaines bactéries aciduriques avec la formation de caries, et une association directe de la consommation de sucre et le niveau culturel avec la carie dentaire, en outre, les pratiques d'hygiène buccale minimisent la prévalence de la carie dentaire.

Mots clés: plaque supra gingivale, carie dentaire, la composition bactérienne, les adultes algériens, niveau culturel, le régime alimentaire.