

N° D'Ordre

UNIVERSITE DE TLEMCEM ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du grade de  
**MASTER II EN IMMUNOLOGIE**

*Intitulé :*

**Effet de l'Astaxanthine sur la polarisation des  
macrophages au cours du processus carieux**

Présenté par :

**BOUTERFAS Latifa**

Soutenu publiquement le 09/07/2017, devant le jury constitué de :

<b>Mourad ARIBI</b>	<b>Professeur en Immunologie</b>	<b>Président</b>
<b>Mustapha HADDOUCHE</b>	<b>Maitre de conférences A</b>	<b>Examineur</b>
<b>Kamal GHEZZAZ</b>	<b>M A H U en Pathologie Buccale</b>	<b>Examineur</b>
<b>Ilham BEN YELLES</b>	<b>M A H U en Odontologie Conservatrice</b>	<b>Encadreur</b>

Année 2016 – 2017

N° D'Ordre

UNIVERSITE DE TLEMCEM ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/STU-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du grade de  
**MASTER II EN IMMUNOLOGIE**

*Intitulé :*

**Effet de l'Astaxanthine sur la polarisation  
des macrophages au cours du processus carieux**

Présenté par :

**BOUTERFAS Latifa**

Soutenu publiquement le 09/07/2017, devant le jury constitué de :

Mourad ARIBI	Professeur en Immunologie	Président
Mustapha HADDOUCHE	Maitre de conférences A	Examineur
Kamal GHEZZAZ	M A H U en Pathologie Buccale	Examineur
Ilham BEN YELLES	M A H U en Odontologie Conservatrice	Encadreur

Année 2016 – 2017

## Résumé

### Introduction

La maladie carieuse est une maladie infectieuse, multifactorielle caractérisée par la destruction des tissus durs, provoquant ainsi la dégradation du collagène de la dentine par les métalloprotéinases produites par les macrophages sous l'effet des bactéries cariogènes buccales.

### Objectif

Mesurer l'effet de l'astaxanthine sur la consommation du glucose et du calcium et la production de l'IFN $\gamma$ , l'IL-4 et le MMP-9 par les macrophages chez un sujet présentant la maladie carieuse et son contrôle sain.

### But

Montrer l'effet de l'astaxanthine sur la polarisation du macrophage au cours du processus carieux.

### Matériels et méthodes

Un sujet présentant la maladie carieuse et son contrôle sain âgés de 14 ans, ont été recrutés pour une étude prospective, au Laboratoire de Biologie Moléculaire et Immunologie Appliquée.

### Résultats

D'après notre résultat, l'astaxanthine a un effet anti-inflammatoire en

- Inhibant la consommation du glucose à la dose 1Nm de l'ATX ( $p=0.005$ ).
- Augmentant de consommation de calcium responsable de la signalisation à la dose 10Nm d'ATX ( $p=0.009$ ).
- Provoquant une production maximale d'IL-4 à la dose 10Nm d'ATX ( $p=0.051$ ).
- Inhibant la production d'IFN $\gamma$  ( $p=0.015$ ) et MMP-9 ( $p=0.031$ ) à la dose 1 Nm

### Conclusion

L'inflammation est la clé de déclenchement du processus carieux par le macrophage classique M1, l'astaxanthine pourrait limiter l'effet inflammatoire, d'une part par l'augmentation du taux de calcium et d'IL'4 et d'autre part par l'inhibition de : consommation de glucose et l'expression d'IL-4 et MMP-9 en dirigeant la polarisation vers le M2, mais dans des concentrations bien déterminé de cette drogue

### Mots clés

Processus carieux, immunité innée, macrophage, astaxanthine, glucose, calcium, IL-4, IFN- $\gamma$ , MMP-9

## **Abstract**

### **Introduction**

Cariou disease is an infectious, multifactorial disease characterized by the destruction of hard tissues, causing the dentine collagen to degrade by metalloproteinases produced by macrophages under the effect of oral cariogenic bacteria.

### **Objectifs**

To Measure the effect of astaxanthin in consumption of glucose ad calcium and in the production of IFN $\gamma$ , l'IL-4 and MMP-9 by macrophages of a subject with caries dental and his healthy control.

### **Aim**

Show the effect of asthaxantine on macrophage polarization during the carious process.

### **Material and methods**

A subject with caries and his healthy control Aged 14 years were recruited for a prospectives study at the laboratory of Molecular Biology and Applied Immunologie.

### **Results**

According to our results, astaxanthin has an anti-inflammatory effect in

- Inhibiting the consumption of glucose at the dose 1Nm of ATX (p=0.005).
- Increased consumption of calcium responsible for signaling at the dose 10Nm of ATX (p=0.009).
- Providing maximum IL-4 production at. the dose 10Nm of ATX (p=0.051).
- Inhibiting the production of IFN $\gamma$  (p=0.015) and MMP-9 at the dose of 1Nm

### **Conclusion**

Inflammation is the Key to triggering the carious process by the macrophages M1, astaxanthin may limit the inflammatory effect by increasing the calcium and IL-4 levels and decreasing consumption of glucose and MMP-9, IFN $\gamma$  expression, by directing the polarization to M2 but in well-defined concentrations of this drug

### **Keywords**

Cariou process, innate immunity, macrophage, astaxanthin , glucose, calcium, IL-4, IFN- $\gamma$ , MMP-

## ملخص

أفة نخ الاسنان تتميز بتدمير الأنسجة الصلبة مما تسبب في تدهور الكولاجين في العاج بواسطة الميتالوبروتينايز المنتجة من طرف البكتيريا الموجودة في الفم..

## الهدف

اظهار تأثير استاكزونتين على نشاط البلعميات عند المصابين نخر الاسنان و الاصحاء باجراء اختبار حول الكالسيوم و الجلوكوز .IL-4 و IFN- $\gamma$  و MMP-9

المتطوعان هما في سن 14 سنة واحد مصاب و الثاني معافى للقيام بدراسة استطلاعية علي مستوى مخبر البيولوجيا الجزئية و علم المناعة التطبيقية

## استنتاج

المناعة الفطرية يمكن ان يكون لها دور مهم في التسبب بمرض نخر الاسنان. تستطيع استاكزونتين التأثير على حول الكالسيوم وIL-4. وIFN- $\gamma$  و MMP-9 و الجلوكوز

## **Avant-propos**

Je voudrais remercier tout particulièrement :

**Docteur Ilham BEN-YELLES** Maitre-Assistante en Odontologie Conservatrice et Endodontie (Directrice de mémoire)

Professeur **Mourad ARIBI**, en Immunologie, directeur du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et d'Immunologie

Je tiens à remercier aussi tous mes enseignants pour leur soutien et leurs conseils pendant ces cinq ans, aussi tous les doctorants du laboratoire **BIOMOLIM**, spécialement Madame **Zineb HADJIDJ**, Madame **Warda MEZIANE**, et Madame **Sara DAHOU** ainsi que tous mes camarades de la promotion de Master Immunologie 2017.

Par ailleurs, je souhaite adresser mes sincères remerciements en premier lieu à ma famille spécialement mes parents qui sont ma source de confort.

Ce travail a pour objectif de montrer l'effet de l'astaxanthine sur la polarisation des macrophages au cours du processus carieux .Il a été réalisé au laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie, sous la direction du Docteur Ilham BEN-YELLES.

Le présent mémoire est structuré en six chapitres : Revue de la littérature, Matériels et méthodes, Interprétation des résultats, Discussion, Conclusion et Perspectives, Références bibliographiques.

## Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	ii
ملخص.....	iii
Avant-propos .....	iv
Table des matières.....	v
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations .....	x
Liste des annexes.....	xi
INTRODUCTION .....	1
<b>Chapitre I : REVUE DE LA LITTERATURE</b>	
<b>1. DEFINITION DE LA MALADIE CARIEUSE .....</b>	<b>2</b>
1.2. Etiologies.....	2
1.2.1.1. Le biofilm.....	2
1.2.1.2. La présence de glucides fermentescibles .....	3
1.2.1.3. Fragilité des tissus dentaires .....	3
1.2.2. Facteurs liés à l'environnement buccal .....	3
1.2.2.1. Facteurs favorisants .....	3
1.2.2.2. Facteurs inhibiteurs.....	6
1.2.3. Facteurs propres à l'individu .....	7
1.3. Mécanisme de déminéralisation /reminéralisations .....	8
1.4 .Processus carieux .....	8
<b>2. MALADIE CARIEUSE ET IMMUNITE INNEE .....</b>	<b>8</b>
2.1. Macrophage .....	8
2.2. Origine des macrophages.....	9
<b>3. PARAMETRES A DOSER .....</b>	<b>10</b>
3-1- MMP-9.....	10
3.2. IL-4 .....	10
3.3. IFN $\gamma$ .....	10
3.4. Glucose.....	10
<b>4. ASTAXANTHINE.....</b>	<b>11</b>
<b>PROBLEMATIQUE .....</b>	<b>12</b>

## Chapitre II : MATERIELS ET METHODES

1 .Type d'étude.....	Erreur ! Signet non défini.
2. Définition de la carie .....	Erreur ! Signet non défini.
3. Population d'étude .....	Erreur ! Signet non défini.
4. Critère de jugement .....	Erreur ! Signet non défini.
5. Période d'étude .....	Erreur ! Signet non défini.
6. Lieux d'étude.....	Erreur ! Signet non défini.
7. Récolte de données et éthique .....	Erreur ! Signet non défini.
8. Matériels .....	Erreur ! Signet non défini.
9.Méthodes.....	Erreur ! Signet non défini.

### **Chapitre III : RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

1. Glucose.....	Erreur ! Signet non défini.
1.1. Glucose intra cellulaire .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
1.2. Glucose extracellulaire .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2. Calcium.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.1. Calcium intracellulaire .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
2.2. Calcium extracellulaire .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
3. IFN $\gamma$ .....	Erreur ! Signet non défini.
4. IL-4 .....	Erreur ! Signet non défini.
5. MMP-9 .....	Erreur ! Signet non défini.
 Discussion .....	 Erreur ! Signet non défini.
Conclusion et perspectives.....	Erreur ! Signet non défini.
Bibliographie .....	<b>14</b>
Annexes .....	<b>19</b>



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Facteurs contribuant au processus carieux (adapted by Bouterfas L)	<b>2</b>	
Anatomie des glandes salivaires majeures chez l'homme .....	<b>3</b>	
<b>Figure 3</b> : Réponse de <i>S.mutans</i> aux hydrates de carbone introduits au niveau de la cavité .....	<b>5</b>	
<b>Figure 4</b> : Effet de grignotage sur l'apparition de lésion carieuse .....	<b>7</b>	
<b>Figure 5</b> : Indices environnementales indiquant la polarisation des macrophages .....	<b>9</b>	
<b>Figure 6</b> : Pesée des produits chimiques.....	<b>17</b>	
<b>Figure 7</b> : Préparation de PBS.....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 8</b> : Préparation de matériels.....	<b>18</b>	
<b>Figure 9</b> : Désinfection de la hôte .....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 10</b> : Tube BD Vacutainer® EDTA contenant le sang du témoin.....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 11</b> : La dilution du sang par le PBS	<b>Figure 12</b> : Agitation du sang dilué .....	Erreur ! Signet non défini.
<b>Figure 13</b> : La centrifugation des tubes coniques contenant le sang dilué et le Ficoll .....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 14</b> : Récupération de l'anneau qui contient les PBMC .....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 15</b> : Calcul des nombres des cellules sous microscope .....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 16</b> : Incubation 2 heures à 37°C pour le maintien des cellules en vie.....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 17</b> : Supplémentation de l'astaxantine sur les macrophages adhérents.....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 18</b> : Dosage du glucose intra et extra cellulaire chez le patient et son témoin .....	Erreur ! Signet non défini.	
<b>Figure 19</b> : Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur le contenu du glucose intracellulaire du macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin .....	Erreur ! Signet non défini.	

**Figure 20 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur le contenu du glucose extracellulaire du macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin .....Erreur ! Signet non défini.

**Figure 21 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur le contenu du calcium intracellulaire du macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin .....Erreur ! Signet non défini.

**Figure 22 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur le contenu du calcium extracellulaire du macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin. ....Erreur ! Signet non défini.

**Figure 23 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur la production d'IFN $\gamma$  par le macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin.Erreur ! Signet non défini.

**Figure 24 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur la production d'Il-4 par le macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin.Erreur ! Signet non défini.

**Figure 25 :** Effet des différentes concentrations en astaxanthine sur la production de MMP-9 par le macrophage chez le patient atteint de la maladie carieuse et son témoin. ....Erreur ! Signet non défini.

**Liste des tableaux**

**Tableau 1 : Facteurs de virulence des Streptocoques du groupe *mutans*.....5**



## Liste des abréviations

<b>Ac</b>	: Anticorps
<b>ATS</b>	: Antiseptiques
<b>GMCSF</b>	: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
<b>IFN gamma</b>	: Interférons gamma
<b>IgE</b>	: Immunoglobuline de classe E
<b>IgG</b>	: Immunoglobuline de classe G
<b>IL-10</b>	: Interleukine10
<b>IL-4</b>	: Interleukine 4
<b>LB</b>	: <i>Lactobacille</i>
<b>LPS</b>	: Lipopolysaccharide
<b>M1</b>	: Macrophage 1
<b>M2</b>	: Macrophage2
<b>MMP 9</b>	: Métalloprotéinase matricielle 9
<b>OMS</b>	: Organisation mondiale de santé
<b>STR</b>	: <i>Streptocoque mutans</i>
<b>SVF</b>	: Sérum de vœu foetal
<b>TGF bêta</b>	: Tumor growth factor bêta
<b>Th1</b>	: T helper 1
<b>Th2</b>	: T helper2

## **Liste des annexes**

**Annexes A** : Autorisation de l'académie de Tlemcen..... **19**

**Annexes B** : Consentement éclairé ..... **20**

## INTRODUCTION

Les pathologies d'origine bucco-dentaires sont très répandues dans le monde entier, telle que la maladie carieuse, répertoriée comme le 3ème fléau mondial, de point de vue physiopathologique elle est définie comme une atteinte bactérienne, chronique et multifactorielle, caractérisée par la destruction des tissus durs de la dent affectant la couronne et les racines (Lardinois et al., 2009)

Des barrières physiques telles que les tissus durs de la dent et la barrière chimique : la salive sont mis en jeu pour protéger la dent contre les bactéries responsables du développement de la maladie carieuse (Lips et al., 2017), ces bactéries cariogènes buccales sont les *Streptocoques mutans* et les *Lactobacilles* elles transforment les glucides alimentaires en acides, cette agression est amplifiée par de nombreux facteurs de risque biologiques, ces acides entraînent la chute du pH de la plaque dentaire et causent un déséquilibre de la balance reminéralisation/déminéralisation, par conséquent la dissolution de l'émail, et la dentine mise à nue est vulnérable à l'attaque bactérienne (Garcia et al., 2017).

En effet, La dentine renferme 70% de matière minérale, 10% d'eau et 20% de charge organique répartie en protéines collagéniques : collagène de type 1 et 2 et trame non protéinique type : MMP-9 dans un état latent, lors d'une acidité élevée, ces enzymes subissent un clivage et s'activent en dégradant le collagène de la dentine (Hernández Ríos et al. 2009), le processus inflammatoire est déclenché (Mohammed, 2003)

Par ailleurs, les macrophages sont des cellules de l'immunité innée peuvent être divisés en deux sous-populations principales : le macrophage classique M1, induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que IFN $\gamma$  (Dallagi et al., 2015) et les MMP-9 (Kito et al., 2012), par contre le macrophage M2 alternative produisent des médiateurs anti-inflammatoires comme l'IL-4, et sert à la résolution de l'inflammation (Wang and Joyce, 2010)

Des études in vitro ont démontré que l'astaxanthine peut réduire l'expression de métalloprotéinase 9 (Zhang et al., 2015).

Ainsi, ce projet de Thèse de Master a pour objectif d'étudier l'effet *ex vivo* de l'astaxanthine sur la polarisation de macrophage au cours du processus carieux.

# **Chapitre 1.**

## **Revue de la littérature**



## 1. DEFINITION DE LA MALADIE CARIEUSE

C'est une maladie infectieuse qui touche la partie minéralisée de la dent, considérée comme une pathologie multi factorielle, transmissible classée au 3ème rang des fléaux mondiaux, immédiatement après les affections cancéreuses et les maladies cardiovasculaires, d'après les experts de l'OMS, c'est en effet une atteinte microbienne des tissus calcifiés des dents causant leur destruction par les acides produits à partir de la fermentation bactérienne des glucides alimentaires (Trentesaux et al., 2011), beaucoup d'auteurs ont donné différentes définitions dès le 17 siècle par Fauchard, Frey, Baume (1962),OMS en 1977 Frank et Col.

### 1.2. Etiologies

Puisqu'il s'agit d'une maladie multifactorielle donc son évolution due à l'interaction de plusieurs facteurs de risque :

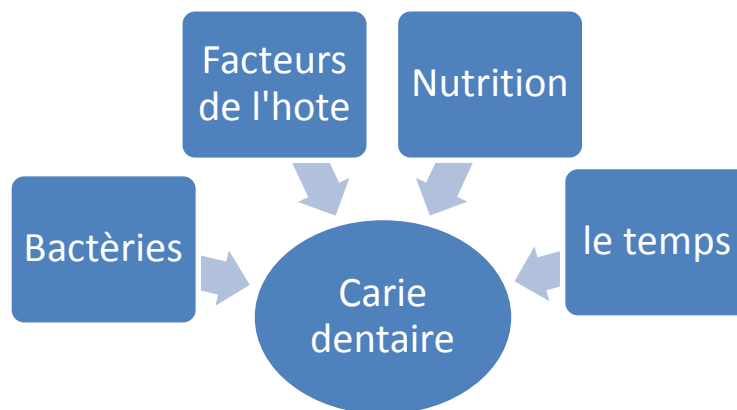


Figure 1. Facteurs contribuant au processus carieux (adapted by Bouterfas L)

#### 1.2.1.1. Le biofilm

Les principales bactéries cariogènes impliquées dans la physiopathologie de la maladie carieuse sont les *Streptococcus mutans* (SM) (Nicolas and Lavoie, 2011a) et *Streptococcus sobrinus* ainsi que les *Lactobacilles*, à un niveau non pathologique, la croissance de ces bactéries est favorisée lorsque l'écologie de la plaque dentaire est perturbée par des changements dans les conditions environnementales.

Les *Streptococcus mutans* ont des propriétés acidogéniques et aciduriques et à partir du saccharose provenant de l'alimentation, synthétisent des LPS intra cellulaires, lactose et fructose qui lui donne la capacité d'adhérer aux surfaces dentaires (Nicolas and Lavoie, 2011b).

### 1.2.1.2. La présence de glucides fermentescibles

La consommation de glucides facilement fermentescibles favorise l'activité et le développement des *S.mutans* en transformant les glucides apportés par l'alimentation en acides organiques qui entraînent la chute de pH au niveau de la dent et déminéralisation de l'email, durant cette étape les bactéries peuvent adhérer au niveau de la dentine et dégrader la matrice dentinaire (Forssten et al., 2010).

### 1.2.1.3. Fragilité des tissus dentaires

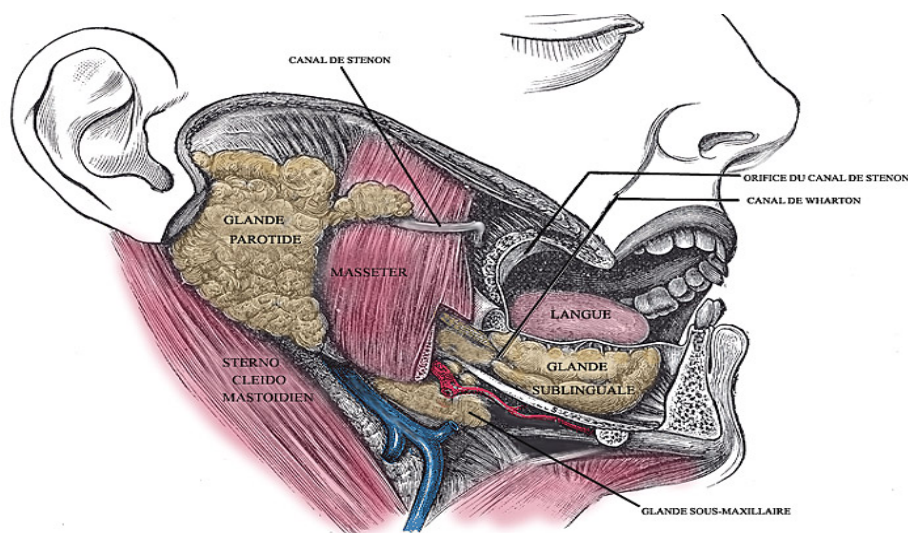
Par les mutations lors de la dentinogénèse imparfaite (Kannu et al., 2017), une hypovitaminose D (Bener et al., 2013) Ainsi que la vulnérabilité de certains sites liés à l'anatomie de la dent qui représentent des zones de rétention de la plaque ,plus la durée est longue et importante, plus la lésion est sévère.

## 1.2.2. Facteurs liés à l'environnement buccal

Ils existent plusieurs facteurs qui peuvent amplifier ou inhiber la lésion carieuse

### 1.2.2.1. Facteurs favorisants

#### a .Déficiency salivaire



Source: Anatomy of the humand body –Henry gray 1918)

**Figure 2 : Anatomie des glandes salivaire majeure chez l'homme**

La salive synthétisée par la fonction de trois glandes : Parotide, sous-maxillaire et la glande Sublinguale, joue un rôle significatif dans la prévention de la maladie carieuse. Un débit salivaire approprié et la composition unique de la salive sont essentiels pour conserver la santé des tissus oraux. La salive lubrifie et protège les tissus buccaux, agissant comme une barrière contre les agents mécaniques, thermiques et chimiques , Elle a rôle aussi dans le nettoyage, dégustation, digestion, protection contre les affections, pouvoir tampon, reminéralisation (Ito et al., 2012)

Une diminution du flux salivaire peut être causée par une atteinte microbienne des glandes salivaires, la prise de certains médicaments (Kargul et al., 1998), aussi certaines maladies auto-immunes telles que le syndrome de Gougerot Sjogren (Mapoure et al., 2011)tous ces facteurs provoquent la genèse de la maladie carieuse.

Une diminution du flux salivaire peut être causée par une atteinte microbienne des glandes salivaires, la prise de certains médicaments (Kargul et al., 1998), aussi certaines maladies auto-immunes telles que le syndrome de Gougerot (Mapoure et al., 2011)...tous ces facteurs aboutissent à la genèse de la maladie carieuse

#### **b. Apport glucidique important**

La consommation quotidienne des sucres fermentescibles présente dans notre alimentation tel le saccharose, le fructose et le lactose implique l'implantation de bactéries cariogènes buccales spécialement *S.mutans* et comme résultat l'apparition du processus carieux, (Olczak-Kowalczyk et al., 2016)

#### **c .Taux élevé de STR et LB**

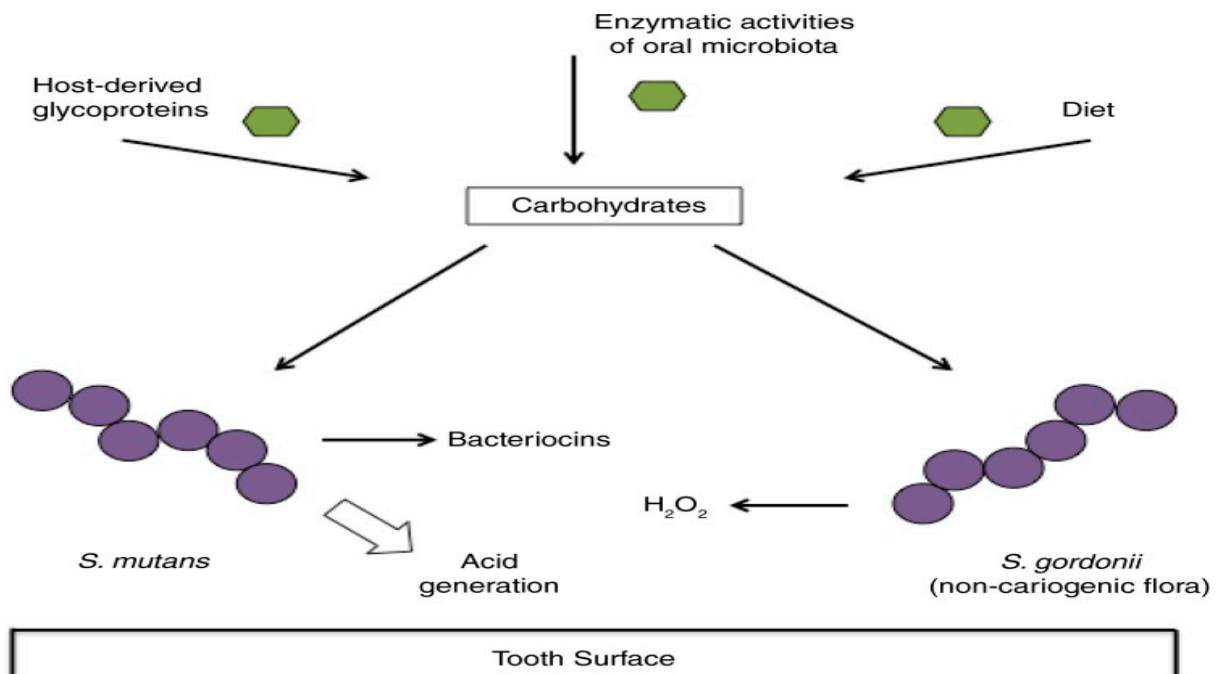
- **Streptocoques et carie**

Les Streptocoques sont des cocci à gram positif, immobiles, le plus souvent non capsulés, leur diamètre varie de 0.5 à 1 micromètre. Les Streptocoques occupent une place essentielle dans le développement des plaques bactériennes ; ils représentent au moins 50% des bactéries au niveau des plaques supragingivales. Toutes les espèces fermentent glucose, tréhalose, mannitol et sorbitol, et produisent des glycanes extracellulaires à partir du saccharose, elles sont responsables de la dissolution de l'émail (Liu et al., 2017)

L'espèce *S.mutans* est la plus prévalente avec des pourcentages d'individus porteurs de l'ordre de 75% à 90%, suivie de *Sobrinus* (de 10 à 30%)

**Tableau 1-1 : Facteurs de virulence des Streptocoques du groupe mutans**

Facteurs de virulence	Effet pathogène
Synthèse de polymères extracellulaires	Adhérence aux surfaces dentaires (plus agrégation et absorption)
Synthèse de polymères intracellulaires	Survie bactérienne et production d'acide lors de carence en saccharose
Acidogénicité (production d'acides)	Déminéralisation des tissus durs
Aciduricité (acidophilie)	Développement en milieu acide
Acido-tolérance (résistance aux acides)	Survie en milieu acide
Production de dextranases et fructanases inducibles	Apport de glucose et fructose en cas de carence de nutriments (hydrolyse des polymères extracellulaires)



(Source: Moye et al., 2014).

**Figure 3 : Réponse de *S.mutans* aux hydrates de carbones introduits au niveau de la cavité**

- **Lactobacilles et carie**

Autres bactéries clés de la carie, elles croissent à des pH très bas en présence d'éléments nutritionnels plus ou moins complexes : acides aminés, peptides, vitamines et acides gras

Elles métabolisent le glucose en polymères intracellulaires et extracellulaires, mais leur métabolisme est surtout dirigé vers la production de quantités importantes d'acides lactiques (Chokshi et al., 2016).

**d. Sous saturation en calcium, phosphate, et fluorures**

La salive est constituée de plusieurs ions tels que le calcium, le phosphate et le fluor jouant un rôle très important dans la reminéralisation et la santé bucco-dentaire, Une déficience de ces ions dans la salive ainsi que les caractéristiques propres à la plaque dentaire servent au développement de la maladie carieuse (Kito et al., 2012).

**1.2.2.2. Facteurs inhibiteurs**

**a. Brossage biquotidien**

C'est un facteur étiologique caractéristique de la maladie carieuse à cause des fluorures qui ont un effet très important pendant la phase de formation et de maturation pré-éruptive des dents et après son éruption aussi ils limitent la déminéralisation et favorisent la reminéralisation et inhibent le métabolisme des bactéries cariogènes (Govindaraju and Gurunathan, 2017)

L'apport alimentaire contient de fluor mais en quantité insuffisante comme Les eaux minérales naturelles embouteillées, le thé environ de (0,5 à 1,5 mg/L) (Norman et al., 2017) donc il est utile de compléter son apport par l'utilisation d'un dentifrice fluoré avec une méthode de brossage approprié .

**b. Utilisation de bain de bouche à base d'ATS**

Les bains de bouche à usage quotidien constituent un complément au brossage parce qu'ils sont riches en composés fluorés tels que Xylitol (Nayak et al., 2014)

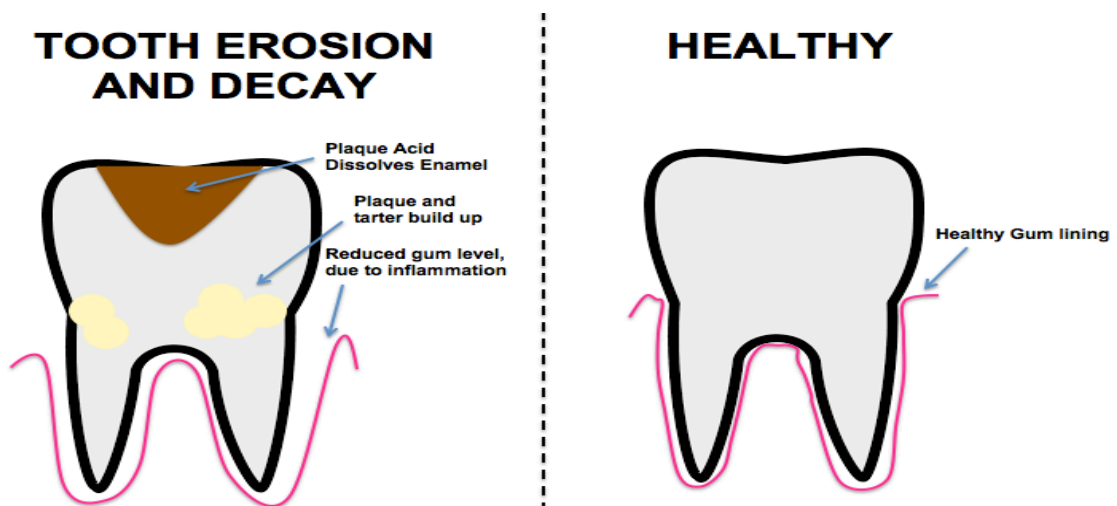
### 1.2.3. Facteurs propres à l'individu

Ceci implique le niveau de vie et d'éducation ainsi que le comportement individuel.

#### a. Niveau socio-économique

Dans la plupart des cas, le processus carieux est réversible en inversant le stade dans le stade précoce en observant une bonne hygiène bucco-dentaire, tout dépend de niveau d'éducation du patient, son statut social et leur connaissance en matière de santé orale (Hobdell et al., 2003) .

#### b. Grignotage



(source :Magalhães et al., 2012)

**Figure 4 : Effet de grignotage sur l'apparition de lésion carieuse**

Il a un effet très important sur le pH de la plaque bactérienne, il faut améliorer les repas principaux (4 repas par jour) et évitez de grignoter. Il faut aussi s'éloigner des mauvaises habitudes alimentaires et surtout celles des aliments cariogéniques tel que l'usage abusif des boissons sucrées, prise de collation entre les repas et le soir au coucher (Zhang et al. 2014).

#### c. L'hérédité

La prédisposition génétique a la carie peut expliquer la susceptibilité de certains sujets a la maladie carieuse malgré un environnement peu cariogène, alors que d'autres sont résistants malgré les multitudes de facteurs de risques auxquels sont exposés.

### **1.3. Mécanisme de déminéralisation /reminéralisations**

Après chaque prise alimentaire sucrée, une déminéralisation de l'émail se met en place et en quelques minutes sous l'effet des facteurs salivaires protecteurs, une reminéralisation de surface intervient. Si les apports alimentaires glucidiques sont souvent répétés dans la journée dans l'absence de l'hygiène buccaux dentaire, le pH maintenu bas se traduira à plus long terme par des lésions carieuses non cavitaires (Mkinen, 2010).

### **1.4 .Processus carieux**

Sa principale cause est l'élaboration des polysaccharides à partir du saccharose provenant de l'alimentation par les bactéries de la cavité buccale, principalement les *S.mutans* et les *Streptocoques Sobrinus* pour la réserve du sucre. Après les *Lactobacilles* et les *Actinomyces* servent à la progression de la lésion carieuse en présence des facteurs de risque favorisant, d'autres part, ces mêmes bactéries métabolisent le sucre en acide lactique (la glycolyse) entraînant la chute de pH, déminéralisation de l'émail sans reminéralisation et le déclenchement du phénomène d'inflammation par le macrophage M1 (Miller et al. 2015)

Le macrophage, active la sécrétion des métalloprotéinases qui dégradent le collagène de la dentine, ces enzymes existent déjà dans la dent mais en état latent et en faible quantité (Manicone and Mcguire, 2008).

## **2. MALADIE CARIEUSE ET IMMUNITE INNEE**

Le développement de la maladie carieuse est stoppé par des barrières de défense de l'immunité innée telles que la salive qui est considérée comme une barrière chimique, elle joue un rôle essentiel dans le mécanisme de reminéralisation/déminéralisation à cause de sa composition riche en minéraux et son pouvoir tampon (Tamasas and Cox, 2017), autre part l'apparition du processus inflammatoire par l'activation du macrophage et la sécrétion des cytokines pro inflammatoires et les métalloprotéinases qui dégradent les tissus dentaires de l'émail vers la dentine(Farges et al., 2015).

### **2.1. Macrophage**

Le nom macrophage vient du grec « makros » et « phagein ». La découverte des macrophages remonte aux années 1880 lorsque Mechnikoff décrivait la phagocytose, définie par la majorité des immunologistes comme des cellules phagocytaires de l'immunité innée, responsable de l'élimination du pathogène, impliqué dans les réactions inflammatoires et anti-infectieuses (Bosurgi et al. 2011).

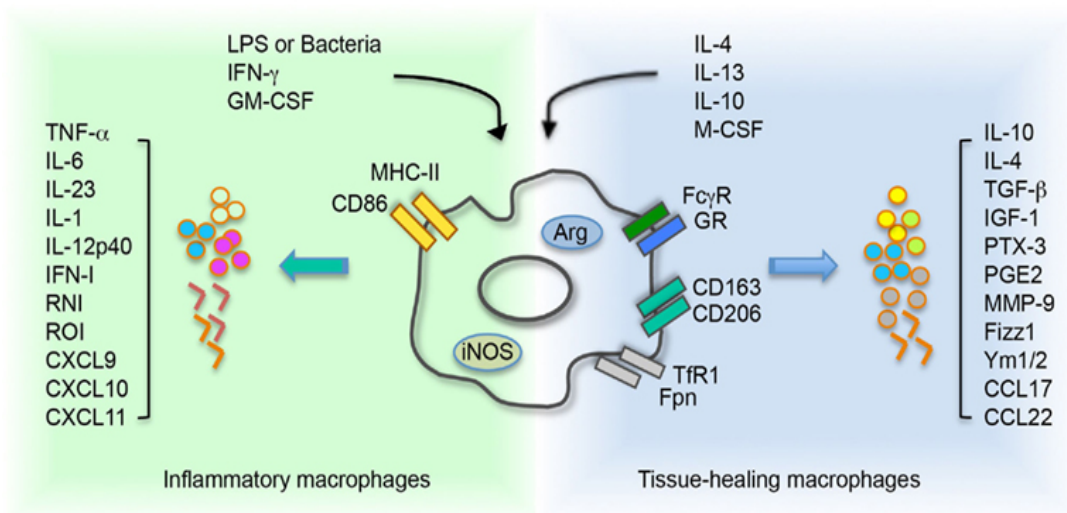
## 2.2. Origine des macrophages

Dans la moelle osseuse, la cellule souche hématopoïétique se différencie en deux lignées, lignée lymphoïde et lignée myéloïde ; cette dernière donne plusieurs précurseurs parmi eux celui des monocytes. En réponse à des facteurs de croissance M-CSF, ce précurseur se divise et se différencie en monoblastes puis pro-monocytes avant de devenir des monocytes qui sortent de la moelle osseuse et entrent dans la circulation sanguine.

Les monocytes matures ne restent dans le sang que deux à trois jours ; puis migrent vers les tissus où ils subissent des modifications morphologiques, cytochimiques et fonctionnelles pour constituer des macrophages spécifiques de chaque tissu avec une durée de vie plus longue (Bosurgi et al., 2011).

## 2.3. Polarisation du macrophage

Les macrophages ont une plasticité remarquable, ils peuvent modifier leur physiologie en réponse à des stimuli endogènes qui sont générés rapidement suivant la lésion ou l'infection. Ces stimuli sont généralement produits par des cellules de l'immunité innée, ou par les cellules immunitaires spécifiques d'antigène ou encore par le macrophage lui-même.



Source ;Bosurgi et al., 2011)

**Figure 1 : Indices environnementales indiquant la polarisation des macrophages**



Les macrophages sont divisés en 2 sous-populations, s'il s'agit de l'IFN $\gamma$ , LPS/ bactérie ou GM-CSF la polarisation est vers le macrophage classique (M1) qui a une activité microbienne et une capacité tumoricide par la stimulation de réponse inflammatoire de type Th<sub>1</sub> suivi par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire tel que l'IFN $\gamma$ .

Le M2 est activé lors d'une stimulation par IL-4 and/or IL-13, IL-10 ou M-CSF la voie d'activation et par Th<sub>2</sub> en sécrétant l'IL-4 (Ying et al., 2013).

### **3. PARAMETRES A DOSER**

#### **3-1- MMP-9**

Le MMP 9 est une enzyme protéolytique de type gélatinase, de poids moléculaire 92 KDa quand il est sous forme de pro-enzyme, après activation il est de 88KDa (Yabluchanskiy et al., 2013)

Il est synthétisé par les bactéries lors d'une inflammation causée par l'acidité élevée au niveau de la dentine, mais sont aussi des enzymes matricielles de la dentine elle-même, il est sécrété lors de la dentinogénèse primaire, responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire dans des conditions pathologiques, c'est un précurseur inactif de la lésion carieuse (Hernández Ríos et al., 2009).

#### **3.2. IL-4**

Les macrophages sécrètent IL-4, lorsque la polarisation est vers le M2, c'est une cytokine avec un effet anti-inflammatoire (Wang and Joyce, 2010).

#### **3.3. IFN $\gamma$**

Il appartient à la famille des cytokines, il est produit lorsque l'organisme reconnaît un élément potentiellement dangereux, le macrophage sécrètent les cytokines pro-inflammatoire telles que IFN- $\gamma$  (Su et al., 2015).

#### **3.4. Glucose**

Le macrophage est comme toute cellule immunitaire, a besoin des facteurs de croissances et des éléments nutritifs comme le glucose, qu'elle l'utilise pour leur activation et prolifération (Klueh et al., 2014).

### **3.5. Calcium**

Le macrophage utilisent le calcium dans la traduction du signal apoptotique (Goswami et al. 2017).

### **4. ASTAXANTHINE**

Appartient à la famille des caroténoïdes, fabriqué par plusieurs d'algues et de planctons, son rôle est d'augmenter le flux sanguin dans la rétine et surtout possède de puissantes propriétés antioxydantes et des effets anti-inflammatoires protégeant ainsi les tissus du cristallin contre les effets néfastes des radicaux libres ,Cette drogue est utilisée parce qu'elle inhibe la transduction du signal de mort par le calcium ,ce qui explique son effet protecteur de cancer, stimulateur de production d'AC et son activité anti bactérienne (Meng et al., 2017).

L'astaxanthine inhibe la production de MMP-9, responsable du l'évolution de la maladie carieuse (Zhang et al. 2015b).

## PROBLEMATIQUE

La maladie carieuse est définie comme étant un processus pathologique localisé, d'origine externe, apparaissant après l'éruption dentaire, qui s'accompagne par une atteinte de l'émail, suivi d'un ramollissement de la masse dentinaire (E Terrer – 2016), composée essentiellement de collagène type I et II et des pro-enzymes tel que le MMP-9 dans un état latent

La lésion est due à l'action combinée de plusieurs facteurs à savoir le biofilm bactérien, le terrain de prédisposition et l'acidité élevée qui cause l'activation des MMP existants dans la dentine et sa production en plus par les macrophages pro-inflammatoires. Fait important, le rôle des bactéries dans la stimulation du système immunitaire, aussi bien innée qu'adaptatif, est bien élucidé et a fait l'objet de recherches très intenses, par ailleurs le système immunitaire lutte contre la lésion carieuse d'une part par les barrières de défense de l'immunité innée telles que la salive et les tissus durs de la dent ,d'autre part par le déclenchement de profil inflammatoire par les macrophages classiquement activés M1 et par conséquence la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires tels que IFN $\gamma$ ....

Plusieurs essais cliniques ont testé l'effet de certaines drogues sur les métalloprotéinases 9 tels que Rosuvastatine, qui a un effet inhibiteur (P Sapienza, V Borrelli, AV Sterpetti, S Dinicola... - Annale de Chirurgie ..., 2011).

Dans cette optique notre équipe de laboratoire Biomolim sous la Direction de docteur Ilham BEN-YELLES a essayé par une étude ex vivo de travailler sur l'hypothèse d'utiliser l'Astaxanthine (Kishimoto, Y., Tani, M., Uto-Kondo, H. et al. .2010) à cause de ses effets anti-inflammatoires pour arrêter le processus carieux on dirigeant la polarisation de macrophage vers M2 (le macrophage anti-inflammatoire)

**Pour les parties Matériels et méthodes, résultats et interprétation, Discussions, et conclusion et perspectives sont confidentiels au laboratoire**

## Bibliographie

### B

**Bener, A., Hoffmann, G., and Al Darwish, M. (2013).** Vitamin D deficiency and risk of dental caries among young children: A public health problem. *Indian J. Oral Sci.* 4, 75.

### C

**Chokshi, A., Mahesh, P., Sharada, P., Chokshi, K., Anupriya, S., and Ashwini, B.K. (2016).** A correlative study of the levels of salivary *Streptococcus mutans*, lactobacilli and *Actinomyces* with dental caries experience in subjects with mixed and permanent dentition. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* 20, 25–28.

### D

**Dallagi, A., Girouard, J., Hamelin-Morrisette, J., Dadzie, R., Laurent, L., Vaillancourt, C., Lafond, J., Carrier, C., and Reyes-Moreno, C. (2015).** The activating effect of IFN- $\gamma$  on monocytes/macrophages is regulated by the  $\text{LIF}/\text{trophoblast}/\text{IL-10}$  axis via Stat1 inhibition and Stat3 activation. *Cell. Mol. Immunol.* 12, 326–341.

### F

**Farges, J.-C., Alliot-Licht, B., Renard, E., Ducret, M., Gaudin, A., Smith, A.J., and Cooper, P.R. (2015).** Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015, 230251.

**Fik, C.P., Konieczny, S., Pashley, D.H., Waschinski, C.J., Ladisch, R.S., Salz, U., Bock, T., and Tiller, J.C. (2014).** Telechelic Poly(2-oxazoline)s with a Biocidal and a Polymerizable Terminal as Collagenase Inhibiting Additive for Long-Term Active Antimicrobial Dental Materials: Telechelic Poly(2-oxazoline)s with a Biocidal and a Polymerizable Terminal?? *Macromol. Biosci.* 14, 1569–1579.

**Forssten, S.D., Björklund, M., and Ouweland, A.C. (2010).** *Streptococcus mutans*, caries and simulation models. *Nutrients* 2, 290–298.

### G

**Garcia, S.S., Blackledge, M.S., Michalek, S., Su, L., Ptacek, T., Eipers, P., Morrow, C., Lefkowitz, E.J., Melander, C., and Wu, H. (2017).** Targeting of *Streptococcus mutans* Biofilms by a Novel Small Molecule Prevents Dental Caries and Preserves the Oral Microbiome. *J. Dent. Res.* 22034517698096.

**Goswami, R., Merth, M., Sharma, S., Alharbi, M.O., Aranda-Espinoza, H., Zhu, X., and Rahaman, S.O. (2017).** TRPV4 calcium-permeable channel is a novel regulator of

oxidized LDL-induced macrophage foam cell formation. *Free Radic. Biol. Med.* 110, 142–150.

**Govindaraju, L., and Gurunathan, D. (2017).** Effectiveness of Chewable Tooth Brush in Children-A Prospective Clinical Study. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* 11, ZC31-ZC34.

## H

**Hernández Ríos, M., Sorsa, T., Obregón, F., Tervahartiala, T., Valenzuela, M.A., Pozo, P., Dutzan, N., Lesaffre, E., Molas, M., and Gamonal, J. (2009).** Proteolytic roles of matrix metalloproteinase (MMP)-13 during progression of chronic periodontitis: initial evidence for MMP-13/MMP-9 activation cascade: MMP-13 in periodontitis progression. *J. Clin. Periodontol.* 36, 1011–1017.

**Hobdell, M.H., Oliveira, E.R., Bautista, R., Myburgh, N.G., Laloo, R., Narendran, S., and Johnson, N.W. (2003).** Oral diseases and socio-economic status (SES). *Br. Dent. J.* 194, 91–96.

**Hoek, K.L., Samir, P., Howard, L.M., Niu, X., Prasad, N., Galassie, A., Liu, Q., Allos, T.M., Floyd, K.A., Guo, Y., et al. (2015).** A Cell-Based Systems Biology Assessment of Human Blood to Monitor Immune Responses after Influenza Vaccination. *PLOS ONE* 10, e0118528.

## I

**Italiani, P., and Boraschi, D. (2014).** From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front. Immunol.* 5.

**Ito, T., Maeda, T., and Senpuku, H. (2012).** Roles of salivary components in *Streptococcus mutans* colonization in a new animal model using NOD/SCID.e2f1<sup>-/-</sup> mice. *PloS One* 7, e32063.

## K

**Kannu, P., Mahjoub, A., Babul-Hirji, R., Carter, M., and Harrington, J. (2017).** PLS3 Mutations in X-Linked Osteoporosis: Clinical and Bone Characteristics of Two Novel Mutations. *Horm. Res. Paediatr.*

**Kargul, B., Tanboga, I., Ergeneli, S., Karakoc, F., and Dagli, E. (1998).** Inhaler medicament effects on saliva and plaque pH in asthmatic children. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 22, 137–140.

**Kito, S., Koga, H., Kodama, M., Yamamoto, N., Kokuryo, S., Habu, M., Matsuo, K., Nishino, T., Kubota, K., Muraoka, K., et al. (2012).** Reflection of 18F-FDG accumulation

in the evaluation of the extent of periapical or periodontal inflammation. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 114, e62-69.

**Klueh, U., Frailey, J.T., Qiao, Y., Antar, O., and Kreutzer, D.L. (2014).** Cell based metabolic barriers to glucose diffusion: Macrophages and continuous glucose monitoring. *Biomaterials* 35, 3145–3153.

## L

**Lardinois, J., Guéders, A., and Geerts, S. (2009).** [Caries prevalence among children in Belgium]. *Rev. Med. Liege* 64, 587–591.

**Liu, J., Zhang, J., Guo, L., Zhao, W., Hu, X., and Wei, X. (2017).** Inactivation of a putative efflux pump (LmrB) in *Streptococcus mutans* results in altered biofilm structure and increased exopolysaccharide synthesis: implications for biofilm resistance. *Biofouling* 33, 481–493.

**Loreto, C., Galanti, C., Musumeci, G., Rusu, M.C., and Leonardi, R. (2014).** Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-13 in human caries dentin. *Eur. J. Histochem.* 58.

## M

**Magalhães, A.C., Wiegand, A., Young, A., and Schlueter, N. (2012).** Dental erosion. *Int. J. Dent.* 2012, 356021.

**Mandl, M., Schmitz, S., Weber, C., and Hristov, M. (2014).** Characterization of the CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte population in human bone marrow. *PLoS One* 9, e112140.

**Manicone, A., and McGuire, J. (2008).** Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19, 34–41.

**Mapoure, N.-Y., Ali-Ahmad, R., Aubert, L., Fernandez, C., Schleinitz, N., and Macia, F. (2011).** [Acute axonal polyneuropathy and Gougerot-Sjögren syndrome]. *Rev. Neurol. (Paris)* 167, 530–532.

**Mkinen, K.K. (2010).** Sugar Alcohols, Caries Incidence, and Remineralization of Caries Lesions: A Literature Review. 2010, 1–23.

**Mohammed, F.F. (2003).** Metalloproteinases, inflammation, and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 62, 43ii–47.

## N

**Nayak, P.A., Nayak, U.A., and Khandelwal, V. (2014).** The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clin. Cosmet. Investig. Dent.* 89.

**Nicolas, G.G., and Lavoie, M.C. (2011a).** [Streptococcus mutans and oral streptococci in dental plaque]. *Can. J. Microbiol.* 57, 1–20.

**Nicolas, G.G., and Lavoie, M.C. (2011b).** Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Can. J. Microbiol.* 57, 1–20.

**Norman, M., Twetman, S., Hultgren Talvilahti, A., Granström, E., and Stecksén-Blicks, C. (2017).** Urinary fluoride excretion in preschool children after intake of fluoridated milk and use of fluoride-containing toothpaste. *Community Dent. Health* 34, 27–31.

## O

**Olczak-Kowalczyk, D., Turska, A., Gozdowski, D., and Kaczmarek, U. (2016).** Dental Caries Level and Sugar Consumption in 12-Year-Old Children from Poland. *Adv. Clin. Exp. Med. Off. Organ Wroclaw Med. Univ.* 25, 545–550.

## S

**Su, X., Yu, Y., Zhong, Y., Giannopoulou, E.G., Hu, X., Liu, H., Cross, J.R., R?tsch, G., Rice, C.M., and Ivashkiv, L.B. (2015).** Interferon-? regulates cellular metabolism and mRNA translation to potentiate macrophage activation. *Nat. Immunol.* 16, 838–849.

## T

**Tamasas, B., and Cox, T.C. (2017).** Massively Increased Caries Susceptibility in an Irf6 Cleft Lip/Palate Model. *J. Dent. Res.* 96, 315–322.

**Terry, R.L., and Miller, S.D. (2014).** Molecular control of monocyte development. *Cell. Immunol.* 291, 16–21.

**Trentesaux, T., Sandrin-Berthon, B., Stuckens, C., Hamel, O., and Herv?, C. (2011).** La carie dentaire comme maladie chronique, vers une nouvelle approche clinique. *Presse Mdicale* 40, 162–166.

## W

**Wang, H.-W., and Joyce, J.A. (2010).** Alternative activation of tumor-associated macrophages by IL-4: priming for protumoral functions. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4824–4835.

**Warner, R.L., Bhagavathula, N., Nerusu, K.C., Lateef, H., Younkin, E., Johnson, K.J., and Varani, J. (2004).** Matrix metalloproteinases in acute inflammation: induction of



MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts and epithelial cells following exposure to pro-inflammatory mediators in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* 76, 189–195.

**Ying, W., Cheruku, P.S., Bazer, F.W., Safe, S.H., and Zhou, B. (2013).** Investigation of Macrophage Polarization Using Bone Marrow Derived Macrophages. *J. Vis. Exp.*

**Z**

**Zhang, S., Chau, A.M., Lo, E.C., and Chu, C.-H. (2014).** Dental caries and erosion status of 12-year-old Hong Kong children. *BMC Public Health* 14, 7.

**Zhang, X.-S., Zhang, X., Zhang, Q.-R., Wu, Q., Li, W., Jiang, T.-W., and Hang, C.-H. (2015a).** Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res.* 1624, 113–124.

**Zhang, X.-S., Zhang, X., Zhang, Q.-R., Wu, Q., Li, W., Jiang, T.-W., and Hang, C.-H. (2015b).** Astaxanthin reduces matrix metalloproteinase-9 expression and activity in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res.* 1624, 113–124.

## Annexes

## Annexes A

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التربية الوطنية

مديرية التربية لولاية تلمسان  
الأمانة العامة  
اترقفها: 999/أ.ع.م.ت. 2015/

تلمسان في 05 أكتوبر 2015

مدير التربية  
إلى

السيد: مدير مختبر البيولوجيا الجزيئية  
التطبيقية و علم المناعة

الموضوع: بائخ ترخيص  
المرجع: - مراسلتكم رقم 51 بتاريخ 2015/09/17.

ردا على طلبكم المشار إليه بالمرجع أعلاه الذي تقدمتم من خلاله بطلب انقيام بمتابعة الأطفال الذين يعانون من النوعية انلعاية بالمؤسسات التربوية ، يشرفني إبلاغكم بموافقتنا وعليكم الاتصال بالمؤسسات المعنية لتنسيق معها (دوت الأساس بمدرسة التلاميذ).

عن مدير التربية و بالتفويض منه  
الأمين العام  
زين العابدين جمال خلاد



## Annexes B

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
 UNIVERSITÉ ABOU-BEKR BELKAÏD DE TLEMÇEN  
 CENTRE HOSPITALIER ET UNIVERSITAIRE DE TLEMÇEN  
 SERVICE D'ODONTOLOGIE CONSERVATRICE / ENDODONTIE  
 LABORATOIRE DE RECHERCHE N° 51 : Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie





**CONSENTEMENT ECLAIRE**  
موافقة

أنا السيد(ة): .....

مولود بتاريخ: ..... ب.

الموطن ب: .....

أسمح للدكتور بن بلس الهام أستاذة مساعدة متخصصة في محاضرة الأسنان بالمستشفى الجامعي بتلمسن.

1. أن اشترك كمريض مؤهل لهذه الدراسة.

2. لجمع كل المعلومات المتعلقة بحالة فمي.

3. التقاط الصور الفوتغرافية المتعلقة بي الإزمة لهذه الدراسة.

4. سحب كمية من الدم لإتمام هذه الدراسة.

5. نشر النتائج المتحصّل عليها و أخيرا الصور التي تم إتخاذها مع إخفاء العين.

M : .....

Né (e) le : ..... à .....

Demeurant à : .....

J'autorise le Docteur Ilham BEN YELLES, Maître- assistante en Odontologie Conservatrice au CHU Tlemcen.

1. À me recruter en tant que patient (e) éligible dans cette étude.
2. À prendre tous les renseignements concernant mon statut buccal.
3. À prendre toutes les photographies sur ma personne nécessaires à leurs études.
4. A me prendre un prélèvement sanguin pour effectuer son étude.
5. À publier les résultats obtenus et, éventuellement à diffuser les photographies avec yeux masquées sur ma personne.

Signature du Tuteur/Tutrice  
Lu et approuvé

انا المعضي اسفله

Tlemcen, le : / /  
تلمسن في: