



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen

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

Département de Biologie

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

Mémoire

Présenté par

Mme BENDIMERED-HADJADJ AOUL Lilia Ghizlene

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

Thème :

Contribution à l'étude des altérations liées aux bactéries Gram négatives de la cavité buccale des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Soutenu le 11/07/2024, devant le jury composé de :

Dr. KAZI TANI-BABA AHMED Zahira Z. Présidente Université de Tlemcen

Pr. BOUCHERIT-OTMANI Zahia Encadreur Université de Tlemcen

Dr. BOUALI Wafaa Examinatrice Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024

ملخص

ركز هذا العمل على دراسة التغيرات البكتيرية المرتبطة بالتغيرات البكتيرية في تجويف الفم لدى الأطفال المصابين بداء السكري من النوع الأول في مدينة تلمسان. في الفترة ما بين فبراير ومارس 2024، تم أخذ عشرين عينة فموية من الأطفال المصابين بداء السكري في مدينة تلمسان. أطفال مرضى السكري الذين تتراوح أعمارهم بين 2 و15 عامًا في مدينة تلمسان. أظهرت النتائج أن تسع عينات من أصل عشرين عينة كانت مصابة بالبكتيريا سالبة الجرام، بنسبة 45%. ومن بين هذه التغيرات 5 فتيات و4 فتيان. بالإضافة إلى ذلك، 7 من أصل 9 أطفال مصابين بالتغير في الفئة العمرية [10-15] ، من بينهم 4 فتيات و3 فتيان. تم عزل أربعة عشر بكتيريا سالبة الجرام، ثمانية منها تنتمي إلى فصيلة *Klebsiella oxytoca*، وأربعة منها تنتمي إلى فصيلة *Enterobacter cloacae complex*، وواحدة إلى فصيلة *Pantoea agglomerans* وواحدة من نوع *Pantoea dispersa*. كانت جميع البكتيريا المعزولة مقاومة للأموكسيسيلين والبيبيراسيلين والتيكارسيلين. باستثناء سلالة بكتيريا ك. أوكسيتوكا (Ko3)، كانت جميع السلالات الأخرى مقاومة للسيفتازيديم. ومع ذلك، فإن جميع السلالات حساسة لإيميبينيم وسيربوفلوكساسين وأميكاسين وجنتاميسين. تراوحت تراكيز التركيز المغناطيسي المميتة التي تم الحصول عليها من 0.25 إلى 4 ميكروغرام/ملل للأميكاسين من 0.125 إلى 4 ميكروغرام/ملل بالنسبة للسبيروفلوكساسين ومن 0.25 إلى 16 ميكروغرام/ملل للجنتاميسين.

أظهر القياس الكمي للكتلة الحيوية للأغشية الحيوية المتكونة في المختبر بواسطة 14 بكتيريا سالبة الجرام أن جميع السلالات تندرج في نفس الفئة. أظهرت البكتيريا أن جميع السلالات صُنِّفت في فئة "البكتيريا شديدة التكوين للأغشية الحيوية" بكثافات ضوئية تتراوح بين 0.412 و، باستثناء سلالة Ko6 التي صُنِّفت ضمن فئة "معتدلة فئة" معتدلة التكوين للغشاء الحيوي الرقيق"

الكلمات المفتاحية: الالتهابات الفموية -سالبة الجرام - المضادات الحيوية

Résumé

Ce travail a porté sur la recherche des altérations bactériennes liées aux bactéries à Gram négatif dans la cavité buccale des enfants atteints de diabète de type 1 de la ville de Tlemcen.

Entre le mois de février et mars 2024, vingt prélèvements buccodentaires sont effectués chez des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen âgés de 2 à 15 ans.

Les résultats obtenus indiquent que neuf des vingt prélèvements sont altérés par des bactéries Gram négatives, soit un taux de 45%. Parmi ces altérations, nous comptons cinq filles et quatre garçons. En outre, sept enfants sur neuf présentant une altération, appartiennent à la tranche d'âge]10-15] ans, dont quatre filles et trois garçons.

Quatorze bactéries Gram négatives sont isolées dont huit appartiennent à l'espèce *Klebsiella oxytoca*, quatre à l'espèce *Enterobacter cloacae complex*, une à l'espèce *Pantoea agglomerans* et une à l'espèce *Pantoea dispersa*.

Toutes les bactéries isolées sont résistantes à l'amoxicilline, à la pipéracilline et à la ticarcilline. A l'exception de la souche *K. oxytoca* (Ko3), toutes les autres souches sont résistantes à la ceftazidime. En revanche, toutes les souches sont sensibles à l'imipénème, à la cirpofloxacine, à l'amikacine et à la gentamicine.

Les CMI obtenues varient de 0,25 à 4µg/mL pour l'amikacine de 0,125 à 4µg/mL pour la ciprofloxacine et de 0,25 à 16µg/mL pour la gentamicine.

La quantification de la biomasse des biofilms formés *in vitro* par les quatorze bactéries à Gram négatif a montré que toutes les souches sont classées dans la catégorie « fortement formatrices des biofilms » avec des densités optiques allant de 0,412 à 2,7 à l'exception de la souche *K. oxytoca* (Ko6), classée dans la catégorie « modérément formatrices de biofilms ».

Mots-clés : Infections buccodentaires - bactéries Gram négatives - enfants diabétiques - biofilms - antibiotiques

Abstract :

This study investigated bacterial alterations linked to gram-negative bacteria in the oral cavity of children with type 1 diabetes in the city of Tlemcen.

Between February and March 2024, twenty oral samples were taken from diabetic children aged between 2 and 15 in the city of Tlemcen.

The results showed that nine of the twenty samples were affected by Gram-negative bacteria, representing a rate of 45%. Of these, 5 were girls and 4 boys. In addition, 7 of the 9 children with alterations were in the]10-15] age group, including 4 girls and 3 boys.

Fourteen Gram-negative bacteria were isolated, eight of which belonged to *Klebsiella oxytoca*, four to *Enterobacter cloacae complex*, one to *Pantoea agglomerans* and one to *Pantoea dispersa*.

All the bacteria isolated were resistant to amoxicillin, piperacillin and ticarcillin. With the exception of *K. oxytoca* (Ko3), all other strains are resistant to ceftazidim. On the other hand, all strains are sensitive to imipenem, ciprofloxacin, amikacin and gentamicin.

MICs ranged from 0.25 to 4µg/mL for amikacin, from 0.125 to 4µg/mL for ciprofloxacin and from 0.25 to 16µg/mL for gentamicin.

Quantification of the biomass of biofilms formed in vitro by the 14 Gram-negative bacteria showed that all strains are classified as "strongly biofilm-forming", with optical densities ranging from 0.412 to 2.7, with the exception of strain Ko6, which is classified as "moderately biofilm-forming".

Keywords: Oral infections - Gram-negative bacteria - diabetic children - biofilms - antibiotics

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique.....	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	6
1. Prélèvements buccodentaires.....	7
2. Isolement et purification des bactéries Gram négatives	7
3. Identification des bactéries Gram négatives	7
3.1. Croissance sur milieu <i>Triple Sugar Iron</i> (TSI).....	7
3.2. Croissance sur milieu Chrom-Agar Orientation.....	8
3.3. Identification par Galerie API-20E.....	8
4. Détermination du profil de résistance des bactéries Gram négatives isolées.....	9
4.1. Antibiogramme.....	9
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatives.....	10
5. Evaluation du potentiel des bactéries isolées à former des biofilms <i>in vitro</i>	10
Troisième partie : Résultats et discussion.....	12
1. Taux d'altérations buccodentaires par les bactéries Gram négatives	13
2. Identification des bactéries Gram négatives isolées.....	14
3. Profil de résistance des bactéries Gram négatives isolées	15
3.1. Antibiogramme	15
3.2. Concentrations minimales inhibitrices des bactéries Gram négatives	17
4. Biomasses des biofilms formés <i>in vitro</i> par les bactéries Gram négatives	19
Quatrième partie : Conclusion générale.....	21
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	24

Dédicaces

Je remercie Dieu le tout puissant, le miséricordieux de m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour achever ce travail que je dédie:

A mes très chers parents,

Ce travail est le résultat de votre amour inconditionnel, votre soutien indéfectible et de vos sacrifices constants ainsi qu'à votre encouragement sans faille. Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait et continué de faire pour moi.

A mon époux Nadir, merci pour tout ce que tu as fait pour moi, particulièrement pendant la réalisation de ce mémoire. Ton soutien inconditionnel, ta patience et ton encouragement ont été mes plus grands atouts tout au long de ce parcours.

A ma grand-mère

A la mémoire de ma défunte grand-mère qui nous a quittée au cours de cette année, « Mima » saches que même si tu n'es plus physiquement parmi nous, ton esprit et tes encouragements résonnent toujours profondément en moi. Tu as été une source constante de soutien, de sagesse et d'amour inconditionnel tout au long de ma vie. Chacune de mes réussites, y compris la réalisation de ce mémoire, porte ton empreinte.

A la mémoire de mes grands-pères,

A la mémoire de mon défunt oncle qui est partie si tôt,

A mes adorables sœurs Hind et Sarah,

A mes petits frères Abdelghani et Chakib,

A mes beaux-parents et mes belles sœurs,

A mes oncles et tantes,

A mes cousins et cousines,

A tous les membres de ma famille et ma belle famille

A mes copines Daheb, Imane, Ismahane, et spécialement Loubna Sans ton aide précieuse et ton soutien constant, je n'aurais jamais pu terminer ce travail à temps. Ta disponibilité, tes encouragements et ta capacité à apporter des solutions aux défis rencontrés ont été d'une aide incroyable tout au long de cette année.

Aux membres du laboratoire "Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique", qui ont été des guides éclairés, prodiguant leurs conseils avisés et encourageant mes efforts.

A tous mes camarades de la promotion Biochimie 2023-2024, avec qui j'ai partagé des moments d'apprentissage enrichissants et de convivialité chaleureuse.

Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia Professeur de biochimie au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen, encadrante exceptionnelle. Pour son soutien indéfectible, ses encouragements constants et ses précieux conseils tout au long de cette étude. Sa passion pour la recherche et son dévouement à ce projet ont été une source d'inspiration tout au long de ce parcours. Je suis profondément reconnaissante pour son expertise, sa patience et sa disponibilité qui m'ont permis de progresser. Ses commentaires éclairés et ses orientations m'ont guidée à chaque étape de la recherche, enrichissant ainsi la qualité de ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Madame KAZI TANI-BABA AHMED Zahira Zakia, Maître de Conférences Classe A de microbiologie au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD Tlemcen, qui a joué un rôle essentiel dans mon parcours académique. Sa capacité à communiquer des concepts complexes de manière claire ont été une source d'inspiration constante. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

J'exprime également ma sincère gratitude à Mademoiselle BOUALI Wafaa, Maître de Conférences Classe A de microbiologie au département de Biologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner et évaluer ce travail.

Mes remerciements les plus sincère vont également à Monsieur BOUCHERIT Kebir pour la patience et l'écoute attentive qui ont contribué à transformer les défis en opportunités d'apprentissage enrichissantes. Ses conseils éclairés et ses encouragements ont été cruciaux pour affiner mes compétences de recherche et pour mener à bien ce mémoire.

Je souhaite exprimer ma sincère gratitude à Madame GOURARI-BOUZOUINA Karima, Docteur en biochimie, membre du laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie, synthèse et activité biologique» Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen dont l'engagement et le soutien ont enrichi mon expérience académique, Je suis reconnaissante pour l'attention personnelle à mes questions et préoccupations

tout au long de ce projet. Son soutien infaillible et son encouragement ont été déterminants dans la progression et la réalisation de ce mémoire.

Liste des figures

Figure N°1	Cycle de vie d'un biofilm (Bouchard, 2015).....	4
Figure N°2	Répartitions des prélèvements altérés par les bactéries gram négatives par sexe et par âge des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen	13
Figure N°3	Identification des bactéries gram négatives isolées de la langue des enfants de la ville de Tlemcen atteints d'un diabète de type 1.....	14
Figure N°4	Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques testés vis-à-vis des bactéries gram négatives isolées.....	17
Figure N°5	Biomasses des biofilms formes <i>in vitro</i> par les bactéries Gram négatives isolées.....	19

Liste des tableaux

Tableau N°1	Couleurs de quelques bactéries Gram négatives sur milieu Chrom-agar orientation.....	8
Tableau N°2	Antibiotiques Utilisés pour l'antibiogramme.....	9
Tableau N°3	Antibiogramme des bactéries Gram négatives isolées de la langue des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.....	16

Première partie

Synthèse bibliographique

Le diabète de type 1 ou insulinodépendant, est un désordre métabolique, caractérisé par une hyperglycémie chronique provoquée par la destruction progressive et irréversible des cellules β pancréatiques insulino sécrétrices.

Comme dans tous les pays du monde, l'incidence de ce type de diabète en Algérie ne cesse de croître et l'âge du diagnostic est généralement au-dessous de 10 ans, ce qui rend la prise en charge très difficile pour les professionnels de la santé, les éducateurs et les familles **(Touhami et coll., 2019)**

Sur le plan physiologique, le diabète de type 1 s'accompagne de modifications micro-vasculaires qui affectent l'ensemble des organes, y compris les tissus gingivaux de la sphère orale. L'altération buccodentaire est deux fois plus importante chez les patients diabétiques **(Azogui-Lévy et Rochereau, 2013)**.

Sur le plan clinique, le déséquilibre du diabète provoque une diminution du flux salivaire, on parle de xérostomie ou sécheresse buccale **(D'Auito et Massi-Benedetti, 2008)**.

Chez les individus sains, les biofilms microbiens ont un rôle protecteur vis-à-vis de la prolifération des bactéries, potentiellement pathogènes et permettent de s'adapter aux changements de l'environnement. Cependant, chez les patients diabétiques, la présence d'une hyperglycémie chronique associée à une mauvaise hygiène buccodentaire induit une prolifération des bactéries Gram négatives pathogènes opportunistes qui peuvent s'installer dans les biofilms et causer des infections parodontales **[(Tian, 2012) ; (Donlan et coll., 2015)]**.

Par ailleurs, la cavité buccale, est un habitat complexe qui abrite une flore commensale variée ou plus de 700 espèces bactériennes sont recensées. La charge bactérienne totale diffère d'un site à un autre allant de 5 à 50 bactéries par cellule épithéliale de la joue, tandis que les cellules épithéliales de la langue peuvent en contenir jusqu'à 100 par cellule **(Robert, 2012)**.

A la différence des bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* et *Lactobacillus*, responsables des lésions carieuses, les espèces à Gram négatif et anaérobies notamment les *Fusobacterium*, les *Porphyromonas*, ou les *Prevotella* sont les plus fréquentes dans les infections endodontiques, périapicales et parodontiques **[(Chardin et coll., 2006) ; (Selwitz et coll., 2007) ; (Lamont et coll., 2018)]**

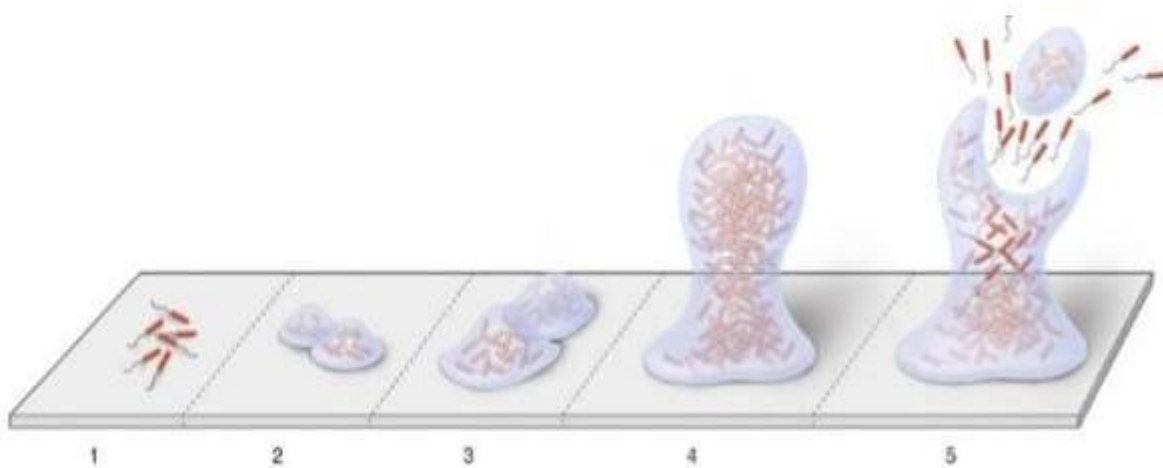
Les bactéries Gram négatives peuvent adhérer aux différentes surfaces de la cavité buccale comme les dents, la langue et la gencive et former des biofilms résistants aux défenses de l'hôte et aux antimicrobiens. Ce processus est accentué par l'hyperglycémie chronique **(Păunică et coll., 2022)**.

Environ 80% des infections microbiennes bucco-dentaires sont liées aux biofilms **(Seneviratne et coll., 2011)**.

De plus, dans la cavité buccale, les surfaces dentaires et gingivales sont immergées en permanence dans la salive et le fluide gingival. Cet environnement chaud et humide favorise la croissance d'un grand nombre de microorganismes qui sont à l'origine de la formation des biofilms. On parle alors de biofilms buccodentaires ou plaque dentaire **(Marsh et Martin, 2009)**.

Un biofilm est un consortium structuré d'une ou de plusieurs espèces bactériennes fixées à une surface submergée ou soumise à un environnement aqueux, enrobées dans une matrice polymérique autoproduite, constituée de polysaccharides, de protéines et d'ADN extracellulaire **(Marsh et Zaura, 2017)**.

La formation d'un biofilm bactérien est initié par l'apparition d'une pellicule acquise exogène (PAE) sur l'émail, grâce à des glycoprotéines salivaires, qui modulent la flore orale. Cette étape est suivie par l'attachement initial réversible des bactéries pionnières par des forces de faibles énergies qui devient irréversible avec la formation d'une matrice bactérienne. Le processus de multiplication des bactéries entraîne la formation de couches de cellules, aboutissant à un biofilm tridimensionnel d'une épaisseur maximale. Enfin, on observe un équilibre entre la croissance bactérienne et la dispersion des bactéries planctoniques en dehors du biofilm **(figure N°1)**.



Attachement initial réversible des bactéries (1), attachement irréversible et formation d'une matrice autour des bactéries (2), co-agrégation et multiplication des bactéries jusqu'à ce que le biofilm atteigne une épaisseur maximale (3 et 4), dispersion des bactéries planctoniques en dehors du biofilm (5)

Figure N°1 : Cycle de vie d'un biofilm (Bouchard, 2015)

Les bactéries incluses dans un biofilm sont souvent plus résistantes aux agents antimicrobiens. Cette résistance peut s'expliquer par différentes hypothèses parmi lesquelles nous pouvons citer :

- L'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques par les bactéries.
- La présence de la matrice extracellulaire qui limite le passage des antimicrobiens. Cette barrière est d'autant plus efficace que le biofilm est mature.
- La présence de cellules persistantes dans les couches profondes du biofilm qui ne se divisent plus. En d'autres termes, elles seraient insensibles aux antibiotiques qui n'attaquent que les bactéries en phase de multiplication.
- Les biofilms âgés de *Streptococcus sanguis* ou *Actinobacillus actinomycetemcomitans* présentent une plus grande tolérance à la chlorhexidine, antiseptique souvent utilisé dans les bains de bouche ainsi qu'aux antibiotiques comparativement aux biofilms jeunes.

Ainsi, l'environnement hyper glycémique chez les diabétiques favorise à plusieurs niveaux la formation, la persistance et la pathogénicité accrue des biofilms bactériens

à l'origine des parodontites sévères observées dans cette population (**Păunică et coll., 2022**).

Rappelons que la présence concomitante d'une glycémie élevée autour des gencives et d'un flux salivaire réduit, offrent à la flore pathogène buccale un environnement propice pour leur prolifération et favorisent l'apparition de la plaque dentaire (**Catherine et coll., 2012**).

Partant de toutes ces données, nous avons entrepris cette étude qui a porté sur la recherche des altérations buccodentaires par les bactéries à Gram négatif chez des enfants atteints de diabète de type 1 de la ville de Tlemcen.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Ce travail est réalisé au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » (LapSab) de l'Université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen.

1. Prélèvements buccodentaires

Pendant les mois de février et mars de 2024, vingt enfants atteints de diabète de type 1, âgés de 3 à 15 ans, de la ville de Tlemcen, suivis à la Clinique BOUDGHENE du CHU de Tlemcen, sont soumis à des prélèvements buccodentaires par écouvillonnage de la langue (face dorsale et face ventrale).

Les écouvillons sont acheminés au laboratoire et placés dans des tubes contenant 2mL d'eau physiologique stérile. Après une agitation au vortex pendant 2 minutes, 100µL sont prélevés et ajoutés à 900µL de bouillon nutritif. Les tubes sont placés dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

2. Isolement et purification des bactéries Gram négatives

A partir des échantillons présentant un trouble, des boîtes de Pétri contenant de la Gélose Mac conkey sontensemencées puis placées dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Les souches isolées sont purifiées par passages successifs sur gélose Mac conkey. Chaque souche pure estensemencée sur gélose nutritive inclinée en tube puis incubée à 37°C pendant 24 à 48 heures et conservée à +4 °C.

3. Identification des bactéries Gram négatives

Les bactéries Gram négatives isolées sont identifiées par des tests biochimiques macroscopiques et microscopiques.

3.1. Croissance sur milieu *Triple Sugar Iron* (TSI)

La gélose TSI est utilisée pour l'identification présomptive des entérobactéries, basée sur la fermentation de trois sucres (glucose, lactose et saccharose) ainsi que sur la production de gaz et d'H₂S.

L'ensemencement se fait par des stries serrées sur la pente de la gélose TSI avec une piqûre centrale du culot. Les tubes sont incubés pendant 18 heures à 37°C.

La fermentation du glucose se manifeste par un changement de la couleur du culot au jaune, la production de gaz se traduit par la formation de bulles de gaz dans la gélose



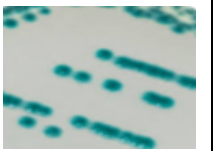


ou son décollement. La fermentation du lactose et/ou du saccharose se traduit par un virage de la couleur de la pente au jaune et la production de H₂S par noircissement du milieu.

3.2. Croissance sur milieu CHROM-Agar Orientation

La gélose CHROM-Agar Orientation est un milieu chromogène qui permet l'identification de certains groupes bactériens d'intérêt clinique grâce à des couleurs bien distinctes.

Après ensemencement sur boîtes de Pétri et incubation pendant 24 heures à 37°C, les différents groupes bactériens produisent des colonies colorées caractéristiques de certaines espèces ou genres bactériens (**Tableau N°1**).

Tableau N°1 : Couleurs de quelques bactéries Gram négatives sur milieu Chrom-Agar Orientation

Espèces	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complexe	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Escherichia Coli</i>
Couleur des colonies					

3.3. Identification par Galerie API 20E

La galerie API® 20E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif. Elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne et les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages de couleurs spontanés ou révélés par addition de certains réactifs.

La lecture se fait après 24 heures d'incubation à 37°C à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue en se référant au catalogue analytique ou au logiciel d'identification.

4. Détermination du profil de résistance des bactéries Gram négatives isolées

4.1. Antibiogramme

L'antibiogramme est réalisé par la technique de diffusion sur gélose selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016)*. A partir d'une culture de 18 heures, des colonies isolées et identiques sont prélevées et placées dans un tube contenant 5mL d'eau physiologique stérile. La concentration cellulaire de départ est ajustée 0,5 Mc Farland par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 625nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible. La densité optique doit être comprise entre 0,08 et 0,1.

Des disques avec des concentrations déterminées d'antibiotiques sont déposés sur la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton préalablement ensemencée par la souche à tester.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition aux valeurs critiques permet de classer les bactéries dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire ou Résistante.

Les antibiotiques utilisés sont regroupés dans le **tableau N°2**.

Tableau N°2 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Familles	Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque (µg)
B-lactamines	Amoxicilline	AMO	20
	Ceftazidime	CAZ	30
	Imipenème	IPM	10
	Ticarcilline	IT	30
	Pipéracilline	PRL	36
	Amoxicilline + Acide Clavulanique	AMC	10
Aminosides	Gentamicine	CN	10
	Tobramycine	TOB	10
	Amikacine	AK	30
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5

4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des bactéries Gram négatives

La sensibilité des bactéries Gram négatives isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen à trois antibiotiques (la gentamicine, l'amikacine et la ciprofloxacine) est déterminée par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits selon le protocole standard de *Clinical and Laboratory Standards Institute* publié en 2016 (CLSI, 2016).

Les solutions mères des antibiotiques sont préparées en extemporané dans l'eau distillée stérile à une concentration de 512µg/mL.

50µL d'une suspension bactérienne à une concentration de 10⁶UFC/mL sont introduits dans les puits d'une microplaque, auxquels 50µL des solutions des antibiotiques à tester sont ajoutés. Les concentrations finales des antibiotiques varient de 0,125µg/mL à 64µg/mL.

La microplaque est ensuite scellée puis incubée pendant 24 heures à 37°C. Les CMI correspondent à la concentration d'antibiotique ou aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

5. Evaluation du potentiel des bactéries isolées à former des biofilms *in vitro*

Le potentiel des bactéries Gram négatives à former des biofilms *in vitro* est évalué selon le protocole de **Christensen et coll., (1985)**, basé sur la quantification de la biomasse des biofilms formés par coloration au crystal violet.

Une préculture de 24 heures sur milieu Trypticase de soja (TSB) est centrifugée à +4°C pendant 15 minutes à 1000g. Le culot est lavé deux fois avec du tampon phosphate salé PBS (pH 7,4 ; 10mM) puis resuspendu dans le milieu TSB.

100µL d'une suspension bactérienne à une concentration de 10⁷cellules/mL sont répartis dans les puits d'une microplaque qui est ensuite placée dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

Les microplaques contenant des biofilms de 24heures sont lavées avec du PBS afin d'éliminer les cellules planctoniques et non adhérentes aux surfaces des puits. Les microplaques sont séchées en position inversée pendant 15 minutes à température ambiante et les biofilms formés sont fixés par addition de 100µL de méthanol à 99 %. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante,

100µL de la solution de crystal violet sont ajoutés et les microplaques sont réincubées pendant 20 minutes à température ambiante. Après élimination de l'excès du crystal violet, 150µL d'acide acétique (33%) sont ajoutés dans tous les puits pour libérer le colorant lié aux cellules adhérentes.

La biomasse des biofilms formés est quantifiée par lecture de la densité optique à une longueur d'onde de 570nm dans un lecteur de microplaques (**BiochromAsys UVM340**).

Selon les valeurs de la densité optique, les bactéries sont classées dans l'une des trois catégories définies par **Mathur et coll., (2006)**.

DO < 0,120 : non formatrices ou faiblement formatrices de biofilms

0,120 ≤ DO ≤ 0,240 : modérément formatrices de biofilms

DO > 0,240 : fortement formatrices de biofilms

Troisième Partie

Résultats et discussion

1. Taux d'altérations buccodentaires par les bactéries Gram négatives

A partir des vingt prélèvements réalisés, neuf ont donné une culture positive sur milieu Mac conkey soit un taux d'altération par les bactéries Gram négatives de 45%. Les prélèvements altérés sont répartis entre 5 filles et 4 garçons.

La **figure N°2** présente la répartition des altérations par sexe et par âge des enfants inclus dans cette étude.

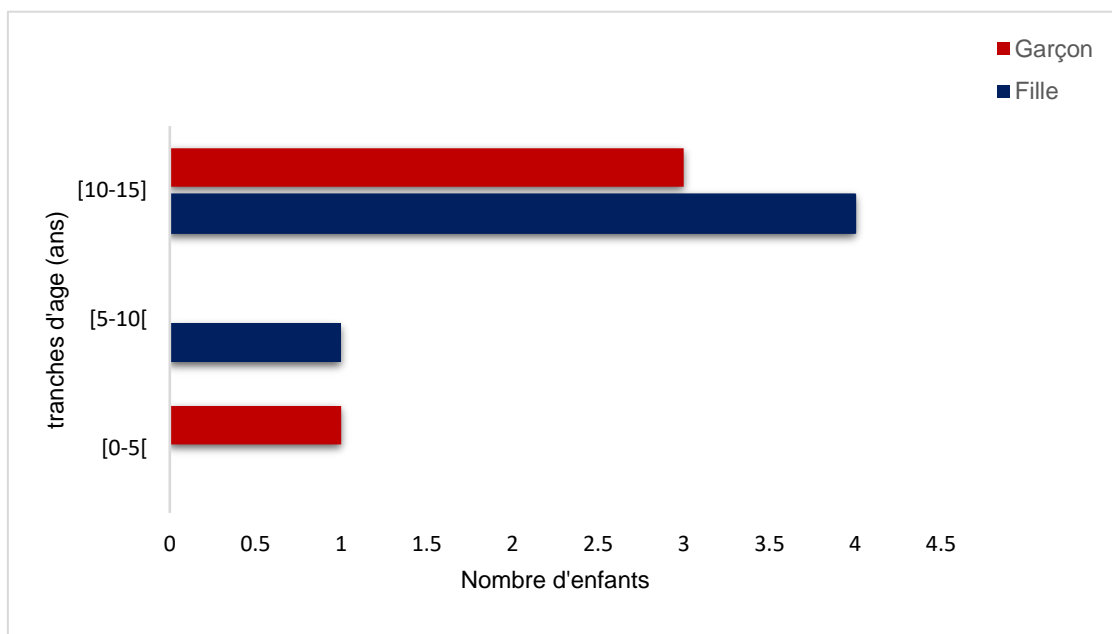


Figure N°2 : Répartition des prélèvements altérés par les bactéries Gram négatives par sexe et par âge des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Nous constatons que les 5 filles présentant une altération par les bactéries Gram négatives sont dans les tranches d'âge [5-10[ans et [10-15] ans avec une et quatre filles respectivement. Alors que pour les garçons, un est dans la tranche d'âge [0-5[ans et trois dans celle de [10-15] ans.

2. Identification des bactéries Gram négatives isolées

Sur les neuf prélèvements positifs, quatorze bactéries Gram négatives sont isolées dont douze fermentaires et deux non fermentaires.

Les bactéries Gram négatives isolées sont identifiées par croissance sur milieu Chrom-Agar Orientation, par galerie API-20E et par Vitek2 (**figure N°3**).

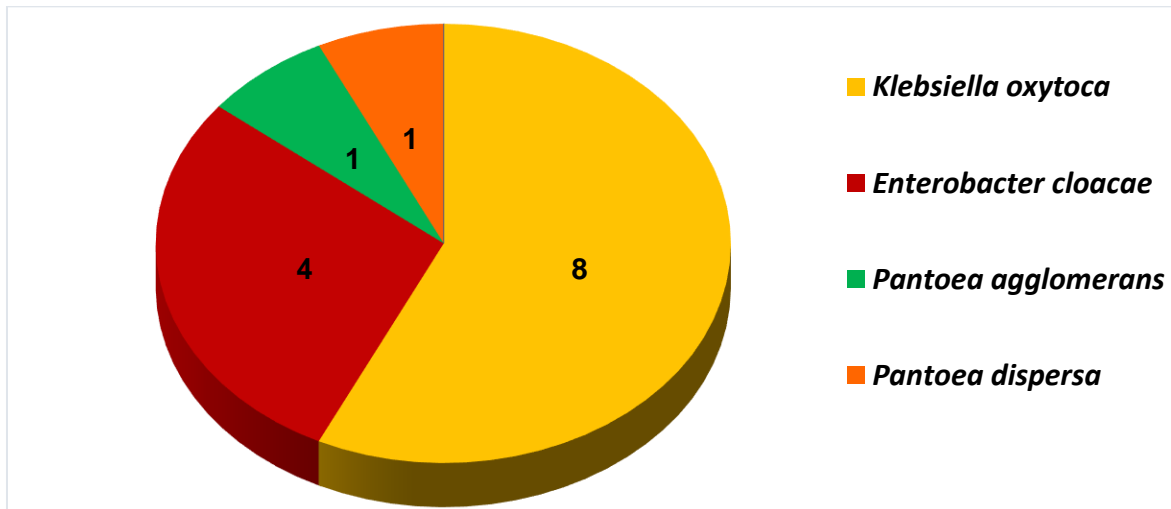


Figure N°3 : Identification des bactéries Gram négatives isolées de la langue des enfants atteints d'un diabète de type 1

Nous remarquons que sur les quatorze souches isolées, douze sont des entérobactéries dont huit appartiennent à l'espèce *Klebsiella oxytoca* (57,14%), quatre à l'espèce *Enterobacter cloacae complex* (28,57%) et deux souches sont des bactéries Gram négatives non fermentaires, une assignée à l'espèce *Pantoea agglomerans* (7,14%) et une à l'espèce *Pantoea dispersa* (7,14%).

Les entérobactéries et les bacilles à Gram négatif non fermentaires occupent une place très importante en pathologie humaine infectieuse en raison de la variété des espèces bactériennes qui les composent et de leur incidence en santé humaine (**Freney et coll., 2002**).

L'espèce *Klebsiella oxytoca* est la plus rencontrée dans nos prélèvements ; il s'agit de l'une des deux espèces du genre *Klebsiella*, qui fait partie de la grande famille des

Enterobacteriaceae, tout comme *Klebsiella pneumoniae*. Elle est présente dans le tractus gastro-intestinal de l'homme (**Holt et coll., 2015**).

Enterobater cloacae est une espèce présente également à l'état commensal dans le tractus gastro-intestinal de l'homme (**Mezzatesta et coll., 2012**).

Par ailleurs, *Klebsiella oxytoca* et *Pantoea* spp. sont des entérobactéries pathogènes opportunistes émergentes qui ont été identifiées dans des infections orales au Burkina Faso ce qui montre l'importance de la cavité orale comme réservoir de bactéries potentiellement pathogènes (**Wendpoulomé et coll., 2016**).

Ces bactéries peuvent coloniser la cavité buccale et causer des infections chez les individus immunodéprimés ou présentant d'autres facteurs de risque tels qu'une mauvaise hygiène buccodentaire, la présence de prothèses dentaires, la xérostomie, le diabète non équilibré, l'utilisation prolongée d'antibiotiques à large spectre, la chimiothérapie ou la radiothérapie (**Aas et al., 2008**).

Selon **Sedgley et Samaranayake, (1994)**, la fréquence des bacilles entériques dans la cavité buccale est liée à la santé buccodentaire.

3. Profil de résistance des bactéries Gram négatives isolées

3.1. Antibiogramme

La sensibilité des bactéries Gram négatives isolées est testée vis-à-vis de onze antibiotiques appartenant à 4 familles différentes. Les résultats de l'antibiogramme sont regroupés dans **le tableau N°3**.

Nous constatons que toutes les bactéries isolées sont sensibles à l'imipénème, à la cirpofloxacine, à l'amikacine et à la gentamicine. Ces antibiotiques constituent une option thérapeutique potentielle pour traiter les infections buccodentaires causées par ces bactéries. En outre, les souches isolées ne contiennent pas de carbapénémases en raison de leur sensibilité à l'imipénème, un antibiotique de la classe des carbapénèmes (**Bissong et coll., 2014**).

Par ailleurs, toutes les souches sont sensibles à la tobramicine à l'exception de *K. oxytoca* (Ko8) et *E. cloacae* (Ec2).

D'autre part, toutes les bactéries isolées sont résistantes à l'amoxicilline, à la pipéracilline et à la ticarcilline. De plus, à l'exception de *K. oxytoca* (Ko3) qui est sensible à la ceftazidime, les autres souches sont résistantes à cet antibiotique.

Tableau N°3 : Antibiogramme des bactéries Gram négatives isolées de la langue des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

	CAZ	AMC	IPM	AMO	PRL	IT	CIP	AK	TOB	CN
	≤17≥20	≤13≥18	≤19≥23	≤13≥18	≤17≥21	≤14≥20	≤15≥21	≤14≥17	≤12≥15	≤12≥15
Ko1	6 R	11 R	27 S	14 R	6 R	14 R	41 S	25 S	26 S	25 S
Ko2	6 R	22 S	27 S	6 R	6 R	6 R	32 S	22 S	20 S	26 S
Ko3	29 S	6 R	27 S	6 R	6 R	6 R	40 S	24 S	17 S	22 S
Ko4	6 R	11 R	32 S	10 R	6 R	14 R	40 S	25 S	20 S	30 S
Ko5	6 R	10 R	27 S	11 R	6 R	14 R	35 S	23 S	26 S	25 S
Ko6	6 R	6 R	26 S	6 R	6 R	8 R	36 S	25 S	22 S	24 S
Ko7	6 R	11 R	27 S	14 R	6 R	10 R	32 S	24 S	20 S	26 S
Ko8	6 R	22 S	27 S	9 R	6 R	6 R	22 S	18 S	11 R	18 S
Ec1	6 R	18 S	27 S	13 R	6 R	6 R	33 S	24 S	20 S	22 S
Ec2	6 R	22 S	25 S	10 R	6 R	6 R	30 S	33 S	11 R	19 S
Ec3	6 R	22 S	27 S	16 R	6 R	6 R	40 S	22 S	17 S	26 S
Ec4	6 R	28 S	39 S	12 R	6 R	6 R	37 S	27 S	24 S	24 S
Pa	6 R	25 S	31 S	9 R	6 R	6 R	43 S	28 S	21 S	26 S
Pd	6 R	20 S	30 S	9 R	6 R	6 R	37 S	22 S	26 S	26 S

Caz : Ceftazidime, **AMC** : Amoxicilline + Acide clavulanique, **IPM** : Imipeneme, **AMO** : Amoxicilline, **PRL** : Pipéracilline, **IT** : Ticarcilline, **CIP** : Ciprofloxacine, **AK** : Amikacine, **TOB** : Tobramyine, **CN** : Gentamicine.

3.2. Concentrations minimales inhibitrices des bactéries Gram négatives

Les CMI de l'amikacine, de la gentamycine et de la ciprofloxacine vis-à-vis des quatorze bactéries Gram négatives isolées de la langue des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen sont représentées sur la **figure N°4**.

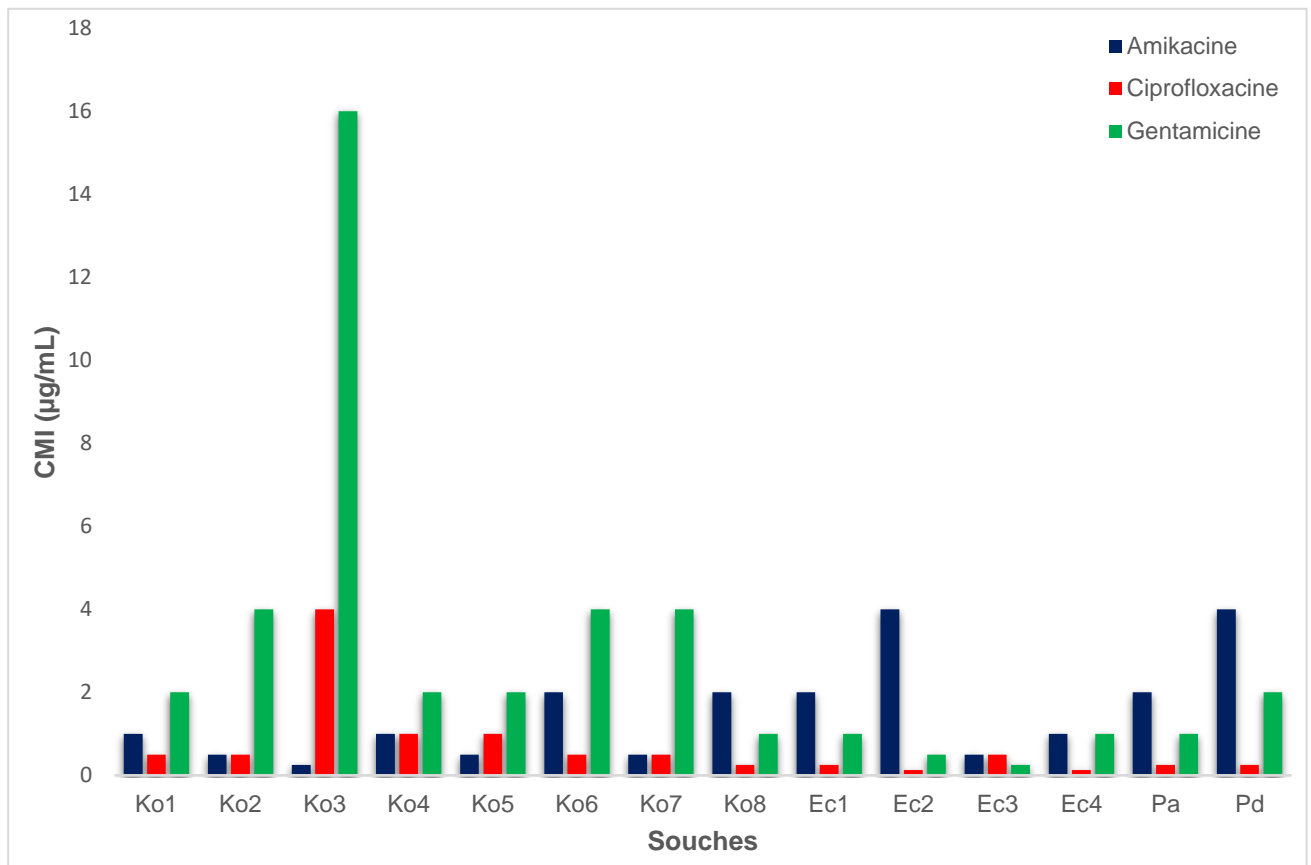


Figure N°4 : Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques testés vis-à-vis des bactéries Gram négatives isolées

Les valeurs des CMI obtenues varient de 0,25 à 4µg/mL pour l'amikacine de 0,125 à 4µg/mL pour la ciprofloxacine et de 0,25 à 16µg/mL pour la gentamicine.

Selon le **CLSI, (2016)**, les *Enterobacteriaceae* sont considérées comme sensibles à la ciprofloxacine, à la gentamicine et à l'amikacine si la CMI est inférieure ou égale à 1µg/mL, 4µg/mL et 16µg/mL respectivement. En revanche, les souches sont classées dans la catégorie résistante si la CMI est supérieure ou égale à 4µg/mL pour la ciprofloxacine, à 16µg/mL pour la gentamicine et à 64µg/mL pour l'amikacine.

De ce fait, toutes les bactéries isolées sont sensibles aux trois antibiotiques testés (amikacine, ciprofloxacine et gentamicine), à l'exception de la souche *K. oxytoca* (Ko3) qui est résistante à la cirpfloxacine et à la gentamicine avec des CMI respectives de 4 et 16µg/mL. Les résultats de la CMI confirment ceux de l'antibiogramme.

Pour ce qui est de la souche *Klebsiella oxytoca* (Ko3), sa résistance à la gentamicine et à la cirpofloxacine s'explique par les valeurs des CMI qui sont dans la limite inférieure des seuils fixés par le **CLSI, (2016)**.

La sensibilité des entérobactéries à la ciprofloxacine, à l'amikacine et à la gentamicine à déjà été rapportée dans la littérature par **Cheng et coll., (2013)** à Taiwan, **Loucif et coll., (2016)** en Algérie et par **Wasfi et coll., (2016)** en Égypte

Les aminoglycosides, comme l'amikacine et les fluoroquinolones telles que la ciprofloxacine, sont connus pour leur large spectre d'action. Leur efficacité vis-à-vis de nombreuses bactéries Gram négatives fait de ces molécules un choix thérapeutique pour la prise en charge des infections causées par ces microorganismes **[(Dalhoff, 2012) ; (Krause et coll., 2016)]**.

4. Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les bactéries Gram négatives

La figure N°5 représente les biomasses des biofilms formés *in vitro* par les quatorze bactéries Gram négatives isolées de la langue des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.

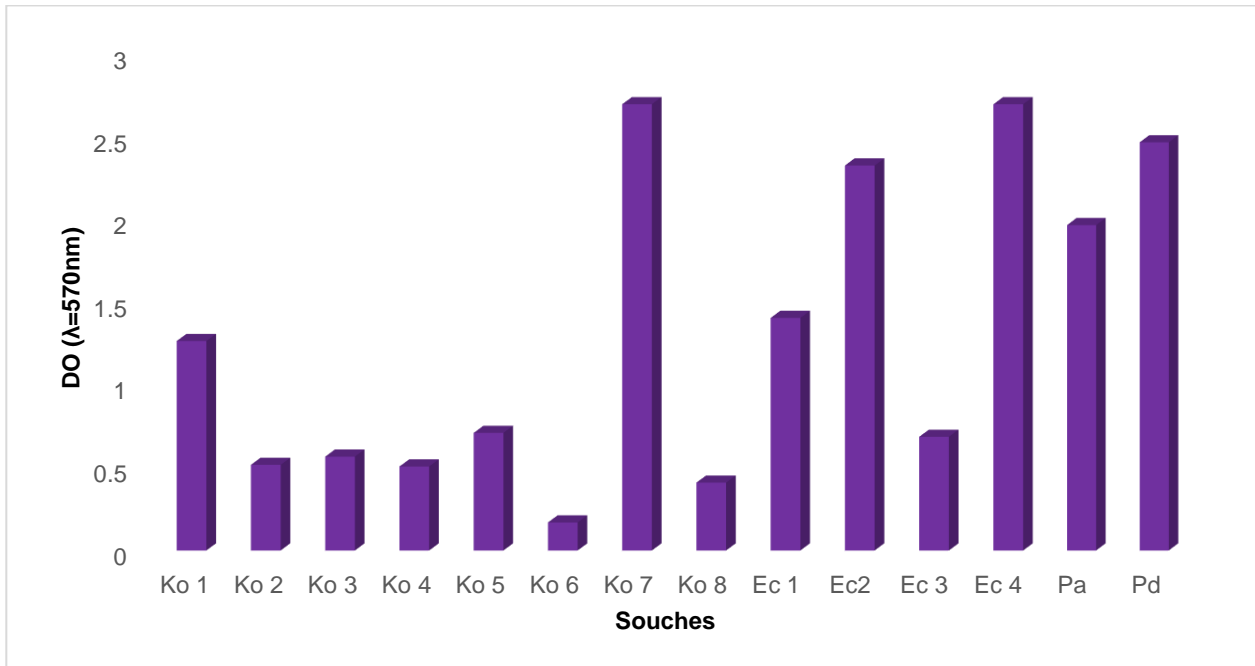


Figure N°5 : Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les bactéries Gram négatives isolées

Il ressort de cette figure que les densités optiques mesurées à une longueur d'onde de 570nm sont comprises entre 0,17 et 2,7. Selon l'étude de **Mathur et ses collaborateurs** publiée en **2006**, une bactérie est formatrice de biofilms, si la densité optique est supérieure à 0,120, par conséquent, les quatorze bactéries Gram négatives sont formatrices de biofilms.

D'après ces mêmes auteurs, la souche *K. oxytoca* (Ko6) est classée dans la catégorie « modérément formatrices de biofilms » avec une DO de 0,17. Toutes les autres, en revanche, sont classées comme « fortement formatrices de biofilms » avec des densités optiques allant de 0,412 à 2,7.

La formation des biofilms par les bactéries est un phénomène courant, en particulier dans l'environnement buccodentaire, où ils jouent un rôle crucial dans le

développement de pathologies telles que la carie dentaire et les maladies parodontales, on parle alors de plaque dentaire **(Marsh, 2005)**. En effet, la plaque dentaire fut décrite pour la première fois comme un biofilm bactérien en 1991 par Marsh **(Marsh et Bradshaw, 1995)**.

Cette capacité des bactéries à adhérer et à se maintenir sur une surface est une stratégie de survie fondamentale chez les microorganismes. De plus, la présence des biofilms bactériens dans la cavité buccale peut être particulièrement préoccupante chez les patients diabétiques en raison de leur susceptibilité élevée aux infections et de leur système immunitaire affaibli, ainsi qu'un déséquilibre de la glycémie qui peut favoriser la prolifération bactérienne **[(Novak et coll., 2007) ; (Al-Maskari et coll., 2011)]**.

Quatrième Partie

Conclusion générale

La présente étude menée au laboratoire de recherche « Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique » a porté sur la recherche des altérations liées aux bactéries Gram négatives de la cavité buccale des enfants atteints de diabète de type 1 de la ville de Tlemcen.

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

- Sur les vingt prélèvements réalisés sur la langue des enfants atteints de diabète de type 1 de la ville de Tlemcen inclus dans cette étude, neuf sont altérés par les bactéries Gram négatives, ce qui représente un taux d'altération global de 45%. Ces altérations concernent 5 filles et 4 garçons.

- La répartition de ces altérations en fonction de l'âge et du sexe des enfants a montré qu'une fille est dans la tranche d'âge [5-10[ans et quatre dans celle de [10-15] ans. Alors que pour les garçons, un est dans la tranche d'âge [0-5[ans et trois dans celle de [10-15] ans.

- Quatorze bactéries Gram négatives sont isolées à partir des neuf prélèvements positifs. Leur identification par galerie API 20E et Vitek2 a montré que huit souches appartiennent à l'espèce *Klebsiella oxytoca*, six à l'espèce *Enterobacter cloacae complex*, une souche à l'espèce *Pantoea agglomerans* et une à l'espèce *Pantoea dispersa*.

- Toutes les bactéries isolées sont sensibles à l'imipénème, à la cirpofloxacine, à l'amikacine et à la gentamicine. En revanche, elles sont résistantes à la pipéracilline et à la ticarcilline. De plus, à l'exception de *Klebsiella oxytoca* (Ko3) et de *Pantoea dispersa* (Pd) qui sont sensibles à la ceftazidime et à l'amoxicilline respectivement, les autres souches sont résistantes à ces deux antibiotiques.

- Les CMI obtenues sont comprises entre 0,25 et 4µg/mL pour l'amikacine entre 0,125 et 4µg/mL pour la ciprofloxacine et entre 0,25 et 16µg/mL pour la gentamicine. Selon les normes du **CLSI (2016)**, toutes les bactéries isolées sont sensibles à ces trois antibiotiques à l'exception de la souche *Klebsiella oxytoca* (Ko3) qui est résistante à la cirpofloxacine et à la gentamicine avec des CMI respectives de 4 et 16µg/mL.

- Les résultats des CMI confirment ceux de l'antibiogramme. La résistance de la souche *Klebsiella oxytoca* (Ko3) à la gentamicine et à la cirpofloxacine s'explique par les valeurs des CMI qui sont dans la limite inférieure des seuils fixés par le **CLSI, (2016)**.

- Toutes les souches isolées sont formatrices de biofilms *in vitro*. La quantification des biomasses des biofilms formées par ces espèces a montré que la souche *Klibsiella oxytoca* (Ko6) est classée dans la catégorie « modérément formatrices de biofilms ». En revanche, les autres souches sont dans la catégorie « fortement formatrices des biofilms ».

Notre étude a mis en évidence l'implication des entérobactéries dans les infections buccodentaires des enfants diabétiques.

Selon **Jepsen et coll., (2017)**, la prise en charge des enfants diabétiques doit inclure une hygiène bucco-dentaire rigoureuse, un suivi rapproché par un parodontiste, éventuellement associé à des antibiotiques locaux ou systémiques et un contrôle glycémique strict.

Pour poursuivre ce travail, il serait intéressant de réaliser :

- Une étude élargie sur l'ensemble des enfants diabétiques de la wilaya de Tlemcen avec une caractérisation moléculaire des souches isolées
- Une évaluation de l'impact des biofilms buccodentaires sur l'efficacité des traitements antibiotiques et l'évolution des pathologies buccodentaires chez les enfants diabétiques.

Cinquième Partie

Références bibliographiques

- 1- **Al-Maskari, A. Y., Al-Maskari, M. Y., and Al-Sudairy, S. (2011)** Oral manifestations and complications of diabetes mellitus: A review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 11(2), 179-186.
- 2- **Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E. and Paster, B. J. (2008)** Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology*, 46(4), 1407-1417.
- 3- **Azogui-Lévy S. and Rochereau T. (2013)** Prévention des pathologies bucco-dentaires chez le diabétique : exploitation de l'enquête ESPS 2008. *Rev d'Épidémiologie Santé Publique*.61: S239–S240.
- 4- **Barbosa F. C., Mayer M. P., Saba-Chujfi E. and Cai S. (2001)** Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*, 16(5), 306-310.
- 5- **Bissong M.E.A., Fon P.N. and Kamga H.L.F. (2014)** Microbiological profile of oral infections in diabetic patients and non-diabetic controls in Southwest, Cameroon. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 15(3), 138-143. <https://doi.org/10.4314/ajcem.v15i3.4>
- 6- **Benedetti L., Kurdyk B. and Dumonteil D. (2016)** Echos de la micronutrition - Dossier spécial santé bucco-dentaire [Internet]. [cité 18 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.iedm.asso.fr/IMG/pdf/echos-49-07-2016.pdf>
- 7- **Bouchard P. (2015)** : Pathogénie des maladies parodontales in Parodontologie & dentisterie implantaire, Ed. Lavoisier Médecine Sciences
- 8- **Catherine J.H., Lefevre B., Nawrocki L. and Torres J.H. (2012)** Prise en charge des foyers infectieux bucco-dentaires. http://societechirorale.com/documents/Recommandations/recommandations_foyers_infectieux_1.pdf
- 9- **Chardin H., Barsotti O. and Bonnaure-Mallet M. (2006)** Microbiologie en odonto-stomatologie. Paris : Maloine
- 10- **Cheng A., Liu C.Y., Tsai H.Y., Hsu M.S., Yang C.J., Huang Y.T. and Hsueh P.R. (2013)** Bacteremia caused by *Pantoea agglomerans* at a medical center in Taiwan, 2000–2010. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 46(3), 187-194.

- 11-Cruz A.T., Cazacu A.C. and Allen C.H. (2007) *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human disease. *J Clin Microbiol* 45: 1989– 1992
- 12-Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. and Beachey E.H. (1985) Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *staphylococci* to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
- 13-Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; document M100S,26th ed .
- 14-Dalhoff A. (2012). Resistance surveillance studies: a multifaceted problem-the fluoroquinolone example. *Infection*, 40(3), 239-262.
- 15- D'Auito F and Massi-Benedetti (2008) «Les soins buccaux chez les personnes atteintes de diabète: pourquoi est-ce important?» *Diabetes voice* ; 53:33-36
- 16- Dewhirst F. E., Chen T., Izard, J., Paster B.J., Tanner A.C., Yu W.H., Lakshmanan A. and Wade W.G. (2010) The human oral microbiome. *Journal of bacteriology*, 192(19), 5002-5017. <https://doi.org/10.1128/JB.00542-10>.
- 17-Donlan R.M. and Costerton J.W. (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- 18-Freney J., Renaud F., Hansen, W. and Bollet C. (2002) Précis de bactériologie clinique. Eska.
- 19-Hagiya H. and Otsuka F. (2014) *Pantoea dispersa* bacteremia caused by central line-associated bloodstream infection. *Braz J Infect Dis* 18: 696–697
- 20-Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D. and Thomson N.R. (2015) Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), E3574-E3581

- 21-Jepsen S., Blanco J. and Buchalla W. (2017)** Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. *J Clin Periodontol.*;44 Suppl 18:S85-S93.
- 22-Krause K.M., Serio A.W., Kane T.R. and Connolly L.E. (2016).** Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029.
- 23-Lai S., Cagetti M.G., Cocco F., Cossellu D., Meloni G. and Campus G. (2017)** Evaluation of the difference in caries experience in diabetic and non-diabetic children-A case control study. *PloSOne*.12(11):e0188451.
- 24-Lamont R.J., Koo H. and Hajishengallis G. (2018)** The oral microbiota : dynamic communities and host interactions. *Nat RevMicrobiol* 2018; 16 : 745–59.
- 25-Loucif L., Gacemi-Kirane D., Cherak Z., Chamlal N., Grainat N. and Rolain, J.M. (2016).** First report of German cockroaches (*Blattella germanica*) as reservoirs of CTX-M-15 extended-spectrum- β -lactamase- and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(10), 6377-6380.
- 26-Marsh P.D. (2005)** Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(s6), 7-15.
- 27-Marsh PD, Martin MV. (2009)** Oral microbiology, 5^{ème} Edition. Edinburgh, UK: *Churchill Livingstone*. 222p
- 28-Marsh P.D., Moter A. and Devine D.A. (2011)** Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontology* 2000, 55(1), 16-35.
- 29-Marsh P.D. and Zaura E. (2017)** Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *Journal of clinical periodontology* 44 Suppl 18: S12-22. doi:10.1111/jcpe.12679.
- 30-Mathur T., Singhal S., Kha 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 journal of medical microbiology*, 24(1), 25-29.

- 31-Mehar V., Yadav D., Sanghvi J., Gupta N. and Singh K. (2013)** *Pantoea dispersa*: an unusual cause of neonatal sepsis. *Braz J Infect Dis* 17: 726–728.
- 32-Mezzatesta M.L., Gona F. and Stefani S. (2012).** *Enterobacter cloacae* complex : clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 7. (7), 890
- 33-Novak M.J., Potter R.M., Blodgett J. and Ebersole J.L. (2007)** Periodontal disease in Hispanic Americans with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Periodontology*, 78(4), 629-636.
- 34-Păunică I., Giurgiu M., Dumitriu A.S., Păunică S., Pantea Stoian A.M., Martu M.A. and Serafinceanu C. (2022)** The bidirectional relationship between periodontal disease and diabetes mellitus-areview. *Biomedicines*; 10(11):2919.
- 35-Pariyar M., Adhikari S., Regmi R.S., Dhungel B., Banjara M.R., Rijal B.P., Rijal K.R. and Ghimire P. (2023).** Beta-Lactamase-Producing Gram-negative bacterial isolates among the patients attending a tertiary care hospital, Kathmandu, Nepal. *Microbiology Insights*, 16, 1-9.
<https://doi.org/10.1177/11786361221150761>
- 36-Peloquin C.A., Berning S.E., Nitta A.T., Simone P.M., Goble M., Huitt G. A. and Iseman M.D. (2004).** Aminoglycoside toxicity: daily versus thrice-weekly dosing for treatment of mycobacterial diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 38(11), 1538-1544.
- 37-Podschun R. and Ullmann U. (1998).** "Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors." *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- 38- Roberts A.P. and Mullany P. (2010)** Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 8(12), 1441-1450.
- 39- Robert (2012)** Bacteria in the mouth. *Dent Update* 2005; 32: 134-6, 139-40, 142

- 40-Schmid H., Schubert S., Weber C. and Bogner J.R. (2003)** Isolation of a *Pantoea dispersa*-like strain from a 71-year-old woman with acute myeloid leukemia and multiple myeloma. *Infection* 31: 66–67
- 41-Sedgley C.M. and 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
- 42-Selwitz R.H., Ismail A.I. and Pitts N.B. (2007)** Dental caries. *Lancet* 2007; 369 : 51–9.
- 43-Seneviratne C.J., Zhang C.F. and Samaranayake L.P. (2011)** Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chin J Dent Res.*;14(2):87-94.
- 44-Touhami M., Zennaki A., Bouchetara A., Naceur M., Aoui A., Gharnouti M., Latroch C., Bouziane-Nedjadi K. and Boudraa G. (2019)** Epidemiological evolution of type 1 diabetes in children : data from the register of the department of Oran, Algeria, 1973–2017. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 67, 369–374.
- 45- Wasfi R., Elkhatib W.F. and Ashour H.M. (2016)** Molecular typing and virulence analysis of multidrug resistant *Klebsiella pneumonia* clinical isolates recovered from Egyptian hospitals. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- 46- Wendpoulomdé A.D., Kaboré A., Konaté S., Boisramé A.S., Traoré N. Barro and Sangaré L. (2016)** Susceptibilité antimicrobienne des souches cliniques d'entérobactéries isolées d'infections buccodentaires à Ouagadougou, Burkina Faso. *Rev. Iv. Odonto-Stomatol.*, 18, n° 2, pp. 42-50