



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

MEMOIRE

Présenté par

M^{lle} TALEB Yasmina

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 bactériennes à
Staphylococcus aureus de la cavité buccale d'enfants
diabétiques de la ville de Tlemcen**

Soutenu le, devant le jury composé de :

Dr. Kazi Tani-Baba Ahmed Zahira Zakia	Présidente	Université de Tlemcen
Pr. Boucherit-Otmani Zahia	Encadreur	Université de Tlemcen
Dr. Seghir Abdelfettah	Examineur	Université de Tlemcen
Dr. Hassaine-Lahfa Imane	Examinatrice	Université de Tlemcen

Année universitaire 2023/2024

ملخص:

ركزت هذه الدراسة على البحث عن التغيرات البكتيرية المرتبطة بالمكورات العنقودية الذهبية 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 أطفال مصابين بالسكري بمدينة تلمسان تتراوح أعمارهم بين 3 إلى 15 سنة

وتشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن 17 من العينات الـ 20 المأخوذة مصابة بالبكتيريا إيجابية الجرام، أي بنسبة 85%. ومن بين هذه التعديلات، نحصى 12 فتاة و5 أولاد. بالإضافة إلى ذلك فإن 15 من أصل 17 (88%) من هؤلاء الأطفال الذين يعانون من تغيرات ينتمون إلى الفئة العمرية [10-15] سنة، منهم 10 بنات و5 أولاد و94% منهم لديهم أسنان متسوسة والتهاب في اللثة وترسبات على الأسنان

في المجموع تم عزل 24 بكتيريا موجبة الجرام، 20 منها تنتمي إلى جنس المكورات العنقودية و4 إلى جنس المكورات الدقيقة. أظهر تحديد هوية هذه السلالات بواسطة API-Staph أن 12 منها تنتمي إلى جنس المكورات العنقودية الذهبية (50%)، و6 إلى جنس المكورات العنقودية البشرية (25%)، وواحدة إلى جنس المكورات العنقودية الكروموجونية (4%) وواحدة إلى جنس المكورات العنقودية الدقيقة. بالنسبة للبكتيريا من جنس الميكروكوكوكس، تنتمي جميعها إلى فصيلة كوكوريا فارياناس/روز (17%)

كانت جميع سلالات المكورات العنقودية الذهبية المعزولة حساسة للسيبروفلوكساسين والفانكوميسين، حيث تراوحت قيم التركيز المميتة المتوسطة بين 0.25 إلى 1 ميكروغرام/ملتر و0.5 إلى 2 ميكروغرام/ملتر على التوالي. أما بالنسبة لمعدلات التركيز المتوسط، فقد تراوحت بين 0.25 إلى 1 ميكروغرام/ملل للسيبروفلوكساسين و0.5 إلى 4 ميكروغرام/ملل لفانكوميسين. بالنسبة إلى سيكلوهكسيميد، تراوحت قيم التركيزات المتوسطة التركيز من 0.156 إلى 20 ميلي غرام/ملل للسلالات Sa1 و Sa2 و Sa3 و Sa6 و Sa7 و Sa11. ولم يلاحظ أي نمو للسلالات الأخرى. أظهر التحديد الكمي للكتلة الحيوية للأغشية الحيوية المتكونة في المختبر بواسطة سلالات بكتيريا لمكورات العنقودية الذهبية أن السلالة Sa12 صُنفت على أنها «مكونة للأغشية الحيوية المتوسطة»، بينما صُنفت جميع السلالات الأخرى على أنها «مكونة للأغشية الحيوية القوية».

الكلمات المفتاحية:

التهابات الفم – البكتيريا موجبة الجرام – المكورات العنقودية الذهبية – مرض السكري من النوع الأول – مقاومة – غشاء حيوي.

Résumé

Cette étude a porté sur la recherche des altérations bactériennes liées à *Staphylococcus aureus* 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 3 à 15 ans.

Les résultats obtenus indiquent que 17 des 20 prélèvements effectués sont altérés par des bactéries Gram positives, soit 85%. Parmi ces altérations, nous comptons 12 filles et 5 garçons. En outre, 15 sur 17 (88%) de ces enfants présentant une altération appartiennent à la tranche d'âge]10-15] ans, dont 10 filles et 5 garçons et 94% ont des dents cariées, des gingivites et une plaque dentaire.

Au total, 24 bactéries Gram positives sont isolées dont 20 appartiennent au genre *Staphylococcus* et 4 au genre *Micrococcus*. L'identification de ces souches par galeries API-Staph a montré que 12 appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus* (50%), 6 à l'espèce *Staphylococcus hominis* (25%) et 1 à l'espèce *Staphylococcus chromogenes* (4%) et 1 à l'espèce *Staphylococcus cohnii* ssp (4%). Pour les bactéries du genre *Micrococcus*, elles sont assignées toutes à l'espèce *Micrococcus varians* /rose (17%).

Toutes les souches de *S. aureus* isolées sont sensibles à la ciprofloxacine et la vancomycine avec des CMI's comprises entre 0,25 à 1µg/mL et de 0,5 à 2µg/mL respectivement. Quant aux CMBs, elles varient de 0,25 à 1 µg/mL pour la ciprofloxacine et de 0,5 à 4µg/mL pour la vancomycine. En ce qui concerne la cycloheximide, les CMI's vont de 0,156 à 20mg/mL pour les souches Sa1, Sa2, Sa3, Sa6, Sa7 et Sa11. Aucune croissance pour les autres souches n'est observée. La quantification de la biomasse des biofilms formés *in vitro* par les souches de *S. aureus* a montré que la souche Sa12 est classée dans la catégorie «modérément formatrice de biofilms», alors que toutes les autres, appartiennent à la catégorie «fortement formatrice de biofilms».

Mots-clés : Infections buccodentaires – bactéries Gram positives –*Staphylococcus aureus* – diabète de type1– résistance– biofilm.

Abstract :

This study focused on the search for bacterial changes linked to *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of children with type 1 diabetes in the city of Tlemcen. Between February and March 2024, twenty oral samples are taken from diabetic children in the city of Tlemcen aged 3 to 15 years old.

The results obtained indicate that 17 of the 20 samples taken are affected by Gram positive bacteria, or 85%. Among these alterations, we count 12 girls and 5 boys. In addition, 15 out of 17 (88%) of these children with an alteration belong to the age group]10-15] years, including 10 girls and 5 boys and 94% have decayed teeth, gingivitis and dental plaque.

A total of 24 Gram-positive bacteria were isolated, of which 20 belonged to the *Staphylococcus* genus and 4 to the *Micrococcus* genus. Identification of these strains by API-Staph galleries showed that 12 belonged to the species *Staphylococcus aureus* (50%), 6 to the species *Staphylococcus hominis* (25%), 1 to the species *Staphylococcus chromogenes* (4%) and 1 to the species *Staphylococcus cohnii* ssp (4%). Bacteria of the genus *Micrococcus* were all assigned to the species *Micrococcus varians /rose* (17%).

All *S. aureus* strains isolated were sensitive to ciprofloxacin and vancomycin, with MICs ranging from 0.25 to 1 µg/mL and 0.5 to 2 µg/mL respectively. MBCs ranged from 0.25 to 1 µg/mL for ciprofloxacin and 0.5 to 4 µg/mL for vancomycin. For cycloheximide, MICs ranged from 0.156 to 20 mg/mL for strains Sa1, Sa2, Sa3, Sa6, Sa7 and Sa11. No growth was observed for the other strains. Quantification of the biomass of biofilms formed in vitro by *S. aureus* strains showed that strain Sa12 was classified as “moderately biofilm-forming”, while all the others were classified as “strongly biofilm-forming”.

Key words:

Oral infections –Gram positive bacteria –*Staphylococcus aureus* – type 1 diabetes – resistance - biofilms

Table des matières

Première partie : Synthèse bibliographique.....	1
Deuxième partie : Matériel et méthodes.....	6
1. Prélèvements buccodentaires.....	7
2. Isolement et purification des bactéries à Gram positif... ..	7
3. Identification des bactéries à Gram positif.....	8
3.1. Coloration de Gram.....	8
3.2. Recherche de la catalase.....	8
3.3. Recherche de la coagulase.....	8
3.4. Recherche de la DNase.....	8
3.5. Croissance sur milieu Chrom-Agar Orientation.....	9
3.6. Galerie API –Staph.....	10
4. Détermination du profil de résistance des souches de <i>S.aureus</i> isolées.....	10
4.1. Antibiogramme.....	10
4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées.....	12
5. Détermination de la biomasse des biofilms formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées.....	13
Troisième partie : Résultats et discussion.....	14
1.Taux d'altération des bactéries Gram positives.....	15
1.1. Répartition des altérations par les bactéries Gram positives selon l'âge et le sexe des enfants.....	15
1.2. Répartition des altérations bactériennes à Gram positif en fonction de l'état de la cavité buccale des enfants diabétiques	16
2. Identification des bactéries à Gram positif isolées.....	17
3. Profil de résistance des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées.....	18
3.1. Antibiogramme.....	18
3.2. Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées.....	20
3.3. Concentrations minimales bactéricides des antibiotiques vis-à-vis des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées.....	23

4. Biomasses des biofilms formés <i>in vitro</i> par <i>Staphylococcus aureus</i>	23
Quatrième partie : Conclusion générale.....	24
Cinquième partie : Références bibliographiques.....	27

Dédicace

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

A ma mère,

A celle qui a été le premier soutien dans la réalisation de mes ambitions. A celle qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais dit non à mes exigences, qui a tout fait pour me voir à ce stade de ma réussite. Aucun mot ne pourra exprimer mon profond amour pour toi. Puisse Dieu le tout puissant, te réserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père

Celui qui a toujours été mon guide et mon inspiration. A celui sur lequel je m'appuie dans les moments difficiles et auprès de qui j'ai appris la force le courage et la patience. Ta sagesse, ton soutien inconditionnel et ton amour ont été les piliers sur lesquels j'ai construit ma réussite. J'espère que Dieu le tout puissant vous garde et vous comble d'une bonne santé.

*A ma grande sœur **Bouchra** ; mon soutien dans la vie, A mon petit frère **Riad** ; votre présence dans ma vie a un grand impact.*

Merci d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces années, pour votre amour inconditionnel

*A mes oncles mes tantes, mes cousins et à toute la famille **Taleb** et **Arab***

A l'âme de ma grand-mère que Dieu lui accorde son vaste paradis

A mes amies Amel, Sarah, Ghizelen, Ibtissem, Fatima, Loubna, Mariem, Chahrazed, Yousra vous êtes plus que des amies vous êtes Mes sœurs.

A tous ceux qui ont participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Remerciements

Je remercie tout d'abord Allah le tout puissant pour la patience et le courage qu'il m'a donné pour effectuer ce travail et atteindre mon objectif.

Je tiens à remercier chaleureusement mon encadreur Madame BOUCHERIT-OTMANI Zahia, Professeur de biochimie au département de biologie, faculté des Sciences de Nature et de la vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen, pour son encadrement, sa disponibilité au cours de cette expérience, sa générosité, ses précieux conseils qui m'ont permis de réaliser ce travail. Je tiens à vous exprimer également ma profonde gratitude pour votre professionnalisme, votre disponibilité, confiance et votre encouragement qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions.

Mes sincères remerciements à Madame KAZI TANI-BABA AHMED Zahira Zakia, Maître de conférences classe A de microbiologie au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de Terre et de l'Univers, université Aboubekr-BELKAÏD de Tlemcen, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de soutenance.

Ma gratitude va également à Monsieur SEGHIR Abdelfettah, Maître de conférences classe A de biochimie au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de Terre et de l'Univers, université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je suis très reconnaissante envers Madame HASSAINE-LAHFA Imane, Maître assistante Classe B de biochimie au département de biologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de Terre et de l'Univers, Université Aboubekr-BELKAÏD de Tlemcen qui a accepté de siéger parmi les membres de ce jury.

Je tiens à remercier également Monsieur BOUCHERIT Kebir ancien professeur Université Aboubekr-BELKAÏD de Tlemcen pour sa présence, son intérêt, ses précieuses corrections et observations.

Je remercie chaleureusement Madame BOUZOUINA-GOURARI Karima, Doctorante au laboratoire «Antibiotiques Antifongiques : physico-chimie, synthèse et activité biologique», université Aboubekr BELKAÏD-Tlemcen, pour son aide précieuse, ses conseils et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.

A l'ensemble du personnel du laboratoire "Antibiotique Antifongique : Physico-chimie, synthèse et activité biologique (LapSab)".

A tous ceux qui nous ont aidés de près et de loin pour la réalisation de ce travail.

Liste des abréviations

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DO : Densité optique

TSB : Trypticase de soja liquide

Liste des figures

Figure N°01	Étapes de formation des biofilms (Sauer et coll., 2022).....	4
Figure N°02	Visualisation des étapes de formation d'un biofilm de <i>S. aureus</i> sur cathéters par microscopie électronique à balayage (Rebiahi et coll., 2014).....	4
Figure N°03	Résultat du test de la DNase.....	9
Figure N°04	Aspect des bactéries sur le CHROM-Agar™ Orientation.....	10
Figure N°05	Répartition des altérations par les bactéries Gram positives selon l'âge et le sexe des enfants.....	15
Figure N°06	Répartition des altérations bactériennes à Gram positif en fonction de l'état général de la cavité buccale des enfants inclus dans cette étude.....	16
Figure N°07	Identification des bactéries Gram positives isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.....	17
Figure N°08	Biomasses des biofilms formés <i>in vitro</i> par les souches de <i>S. aureus</i> isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.....	20
Figure N°09	CMI de la ciprofloxacine, de la vancomycine et de la cycloheximide vis-à-vis des souches de <i>S. aureus</i>	22
Figure N°10	CMBs de la ciprofloxacine et de la vancomycine vis-à-vis des souches de <i>S. aureus</i>	23

Liste des tableaux

Tableau N°01	Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme.....	11
Tableau N°02	Classification des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> selon leurs potentiels à former des biofilms in vitro (Mathur et coll., 2006).....	13
Tableau N°03	Antibiogramme des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen.....	19

Première partie

Synthèse bibliographique

Le diabète de type 1 est l'une des maladies métaboliques chroniques les plus fréquentes chez l'enfant. Il est caractérisé par la destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas provoquant une insulino-pénie (**Andrew Calabria, 2022**). Ces dernières décennies, l'incidence mondiale du diabète de type 1 chez les enfants âgés de moins de 15 ans ne cesse d'augmenter et l'apparition de cette maladie à des âges de plus en plus précoces pose un sérieux problème de prise en charge en milieu pédiatrique.

Avec une incidence de 26 pour 100 000 enfants et adolescents âgés de moins de 20 ans et de 2900 cas de moins de 15 ans, l'Algérie est classée parmi les dix premiers pays à très forte incidence de diabète de type 1 (**Fédération Internationale du Diabète, FID 2017**).

Lorsqu'un diabète n'est pas convenablement traité, l'augmentation du taux de glucose ne se fait pas uniquement dans le sang mais également dans la salive, ce qui engendre une diminution du flux salivaire ou hyposialie/asialie, une modification du pH, l'apparition de maladies parodontales, des caries dentaires et des perturbations de la flore buccale (**Manuel et coll., 2012**).

De par sa situation anatomique et son rôle physiologique, la cavité buccale est l'un des sites les plus sceptiques du corps humain. On estime qu'au total, la cavité buccale contient près de 700 bactéries parmi lesquelles 300 espèces ont pu être isolées et cultivées en laboratoire [(**Aas et coll., 2005**) ; (**Dewhirst et coll., 2010**)].

Les bactéries de la flore buccale sont réparties en trois catégories. Les bactéries parodontogènes responsables des parodontopathies, les bactéries cariogènes impliquées dans les lésions carieuses et les bactéries retrouvées dans les infections endodontiques et périapicales, les abcès et les cellulites telles que celles appartenant aux genres *Streptocoques* et *Staphylocoques* (**Chardin et coll., 2006**).

Le genre *Staphylococcus*, bactéries Gram positives, composé de 55 espèces et 23 sous-espèces, parmi lesquelles l'espèce *Staphylococcus aureus*, plus connue sous le nom de Staphylocoque doré (**Madhaiyan et coll., 2020**).

Il s'agit d'une bactérie qui se présente sous forme de coques de 0,5 à 1,5 μ m de diamètre, isolés ou groupés en diplocoques ou en amas (grappe de raisin) (**Landgraf et Destro, 2013**).

C'est une bactérie ubiquitaire non exigeante capable de se développer sur des milieux de culture non sélectifs. Son type respiratoire aéro-anaérobie facultatif lui permet d'être présente dans le microbiote cutanéomuqueux en aérobiose **(Roberts et Chambers, 2005)** et dans des tissus mal oxygénés comme ceux des plaies profondes **(Turner et coll., 2020)**.

Staphylococcus aureus est porté par 20% de la population générale avec une localisation préférentielle pour le rhinopharynx (fosses nasales et la gorge). On le retrouve aussi sur la peau et les muqueuses, le cuir chevelu, les mains et le périnée **[(Peacock et coll., 2001) ; (Smith et coll., 2001)]**.

La cavité buccale n'est pas l'écosystème normal pour *Staphylococcus aureus* qui est rarement isolé, toute fois, sa présence sur les dents, la langue ou dans la salive, peut potentiellement causer des infections opportunistes si les conditions sont favorables.

En effet, des modifications biologiques telles que la prise d'antibiotiques, un affaiblissement des défenses immunitaires de l'hôte par une corticothérapie ou une immunothérapie suppressive, ou encore un diabète insulinodépendant non équilibré, peuvent engendrer un déséquilibre de la microflore buccale **[(Devals, 2003) ; (Philip et coll., 2009)]**.

Dans de telles conditions, *Staphylococcus aureus* peut devenir pathogène et causer des infections parodontales telles que des abcès, des infections des tissus mous et des infections des glandes salivaires **(Bruthon et coll., 2006)**. De plus, la production de facteurs de virulence tels que des toxines ou des molécules d'adhésion par cette espèce font d'elle une bactérie pathogène opportuniste, responsable de diverses infections suppuratives ou toxi-infections **(Tong et coll., 2015)**.

Staphylococcus aureus sécrète des exoenzymes (protéases, collagénases, lipases, nucléases...) qui participent à la destruction des tissus de l'hôte, ce qui favorise l'extension de l'infection et l'extraction de nutriments utiles pour la bactérie. Il produit également une coagulase qui favorise la formation d'un thrombus septique et la dissémination hématogène de l'infection **(Dinges et coll., 2000)**.

En santé humaine, il a été montré que 80% des infections bactériennes chroniques sont associées aux biofilms qui sont liées d'une part à l'utilisation des dispositifs médicaux et, d'autre part, à des pathologies chroniques comme les infections buccodentaires **(Hogo et coll., 2009)**.

Par ailleurs, des études antérieures ont montré que le diabète de type 1 chez les enfants, peut avoir un impact négatif sur l'état parodontal, le statut carieux et les paramètres salivaires, ce qui pourrait engendrer une modification de la flore buccale favorisant ainsi la formation de plaque dentaire qui constitue le biofilm le plus épais de l'organisme [(Salvi et coll., 2005) ; (Lai et coll., 2017)].

Selon la définition donnée par Costerton et coll., (1997), le biofilm est défini comme étant une communauté de microorganismes fixés à un support et produisant une matrice polysaccharidique extracellulaire. La formation des biofilms bactériens passe par des étapes d'adhésion, de maturation et de dispersion (figures N°01 et 02).

Ce processus est initié par une phase d'adhésion réversible qui fait intervenir un phénomène physico-chimique non spécifique, conditionnée par la nature des espèces de bactéries, la composition de la surface et sa nature ainsi que la disponibilité des nutriments (Bezoui, 2016) ; (Davey et OToole, 2000).

Cette adhésion devient irréversible lorsque les bactéries produisent des molécules d'adhésion spécifiques qui permettent aux cellules d'établir des liaisons cellules-surface et aussi cellules-cellules [(Kolter, 2008) ; (Høiby, 2011)].

Cette étape est suivie par la formation de microcolonies composées de bactéries sessiles qui synthétisent la matrice polymérique extracellulaire ou *extracellular polymeric substance* (EPS) composée majoritairement de polysaccharides, c'est la phase de maturation (Pande et coll., 2015). A ce stade, le biofilm présente une structure tridimensionnelle avec un gradient de concentrations en nutriments et en oxygène qui s'établit par l'intermédiaire de canaux internes au sein de ce biofilm. Les nutriments et l'oxygène sont en forte concentration à la surface du biofilm alors que leur concentration diminue vers la base du biofilm au niveau de laquelle s'accumulent des déchets métaboliques.

A la fin de ce processus, des bactéries peuvent se détacher du biofilm sous forme de cellules isolées ou en amas en réponse à certaines conditions environnementales telles que l'accumulation de déchets, la carence en quelques besoins nutritifs ou bien la limitation de surfaces. Il s'agit de la phase de dispersion (Bezoui, 2016).

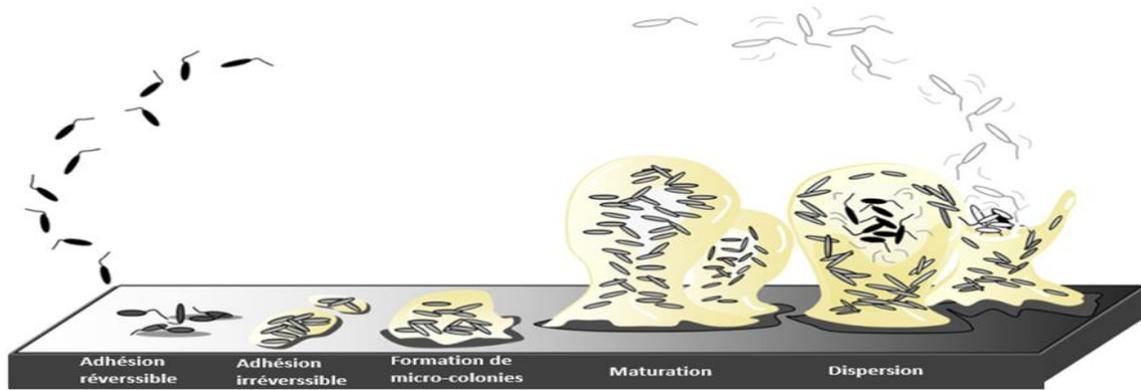


Figure N°01 : Etapes de formation de biofilm (Sauer et coll., 2022)

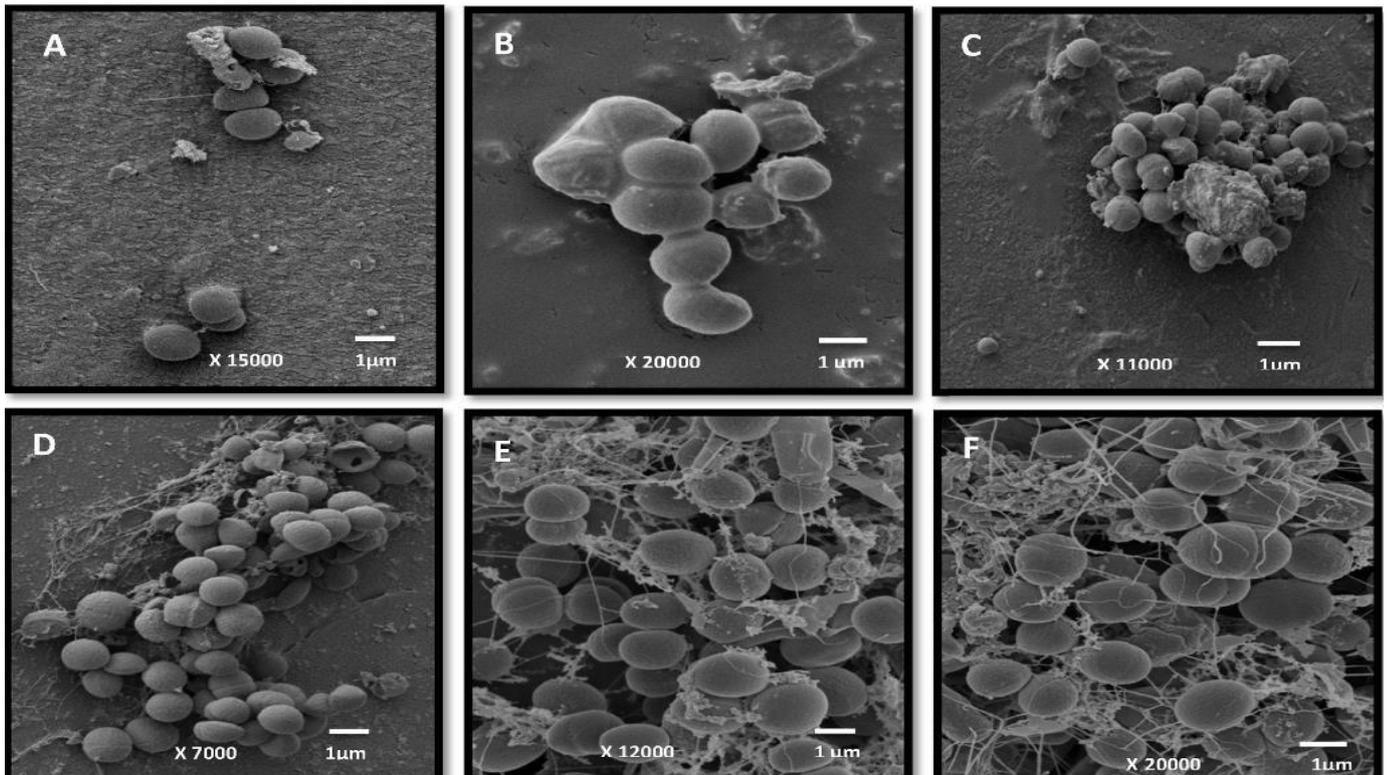


Figure N°02 : Visualisation des étapes de formation d'un biofilm de *S. aureus* sur cathéters par microscopie électronique à balayage (Rebiahi et coll., 2014)

A : adhésion des cellules. B : regroupement des cellules en structure tridimensionnelle.

C : synthèse visible de la matière polysaccharidique. D : réticulation entre les différentes

cellules par la matière polysaccharidique. E et F : maturation du biofilm

Rappelons qu'en 1993, Loë a classé les infections buccodentaires au 6^{ème} rang des complications du diabète (**Botero et coll., 2005**). Ceci avait également été évoqué, en 1997, par le *National Institute of Dental and Craniofacial Research* et par l'*American Diabete Association* en 2003. De ce fait, il est reconnu depuis longtemps dans la littérature et également sur le plan clinique qu'il existe une association entre le diabète et les infections buccodentaires (**Preshaw et coll., 2012**).

Néanmoins, les répercussions du diabète de type 1 sur la santé buccodentaire sont fréquemment sous estimées. C'est la raison pour laquelle, nous avons mené cette étude axée sur l'évaluation des altérations buccodentaires bactériennes dues à l'espèce *Staphylococcus aureus* 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

Entre février et mars 2024, vingt prélèvements buccodentaires sont effectués chez des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen âgés de 3 à 15 ans et suivis à la clinique Boudghen du Centre Hospitalo-Universitaire de Tlemcen.

Les prélèvements consistent à faire passer un écouvillon stérile sur les deux faces (dorsale et ventrale) de la langue des enfants.

Les écouvillons sont placés dans des tubes stériles contenant 2mL d'eau physiologique stérile puis agités au vortex pendant 2 minutes.

100µL de la suspension sont prélevés et introduits dans un tube contenant 900µL de bouillon nutritif. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 37°C pendant 24h.

Les enfants ou leurs parents sont préalablement soumis à un questionnaire afin de recueillir les informations relatives à la maladie, le statut nutritionnel et social, ... **(annexe).**

2. Isolement et purification des bactéries à Gram positif

Afin de rechercher les bactéries à Gram positif, des boîtes de Pétri contenant de la gélose Chapman sont ensemencées par stries, à partir des tubes présentant un trouble, puis placées dans une étuve à 37°C pendant 24 à 48 heures.

La purification des souches est réalisée par des passages successifs sur milieu Chapman. Chaque souche pure est ensemencée dans un tube contenant de la gélose nutritive inclinée puis incubée pendant 24 à 48 heures à 37°C et conservée à +4°C.

3. Identification des bactéries à Gram positif

L'identification des bactéries à Gram positif a porté sur une série de tests biochimiques.

3.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de différencier les bactéries Gram positives des Gram négatives selon leur forme (bacille ou cocci) et leur affinité pour les colorants.

3.2. Test de la catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en eau (H_2O) avec dégagement d'oxygène (O_2).

Une colonie bactérienne est prélevée puis resuspendue dans une goutte d'eau oxygénée préalablement déposée sur une lame propre et sèche. La souche est dite catalase positive lorsque des bulles de gaz (effervescence) se dégagent dans la goutte de H_2O_2 . (**Joffin et Guy, 2001**).

3.3. Test de la coagulase

Ce test permet de mettre en évidence la coagulase libérée dans le milieu extérieur par les souches appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Dans un tube à hémolyse contenant 0,5mL de plasma humain, nous ajoutons quelques colonies de *S. aureus*. Après une incubation de 1 à 4 heures à 37°C, la souche coagulase positive forme un coagulum (prise en masse) par activation du fibrinogène en fibrine (**Joffin et Guy, 2001**).

La présence de cette enzyme semble être associée à la capacité de *S. aureus* à provoquer l'infection, car elle recouvre les corps bactériens d'une coque fibrine, les protégeant de la phagocytose (**Todar, 2005**).

3.4. Test de la Désoxyribonucléase (DNase)

Il s'agit d'un test utilisé pour déterminer la capacité d'une bactérie à hydrolyser l'ADN et l'utiliser comme source de carbone et d'énergie pour sa croissance. La DNase est produite par toutes les souches de *S. aureus*, ainsi que par 5% environ des *staphylocoques* à coagulase négative.

Une boîte de Pétri contenant de la gélose DNase est ensemencée en surface par une colonie pure de la souche puis incubée à 37°C pendant 24 heures. L'hydrolyse de l'ADN qui se traduit par la formation d'un halo clair au pourtour de la strie, est observé par une clarification de la gélose après ajout de HCl 1N (**Denis et coll., 2007**) (**figure N°03**).

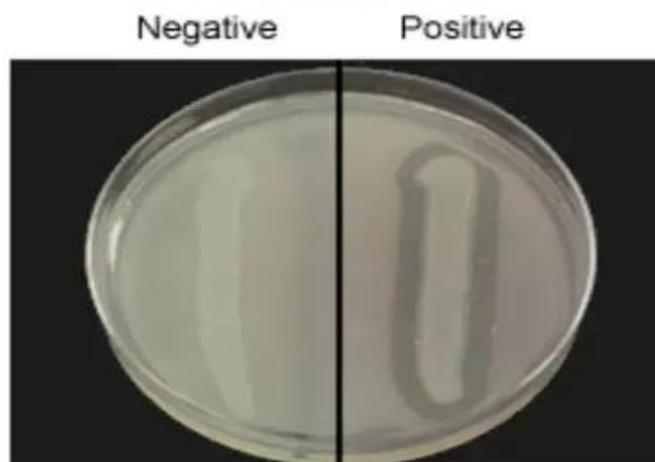


Figure N°03 : Résultat du test de la DNase

3.5. Croissance sur milieu CHROM-Agar Orientation

Le milieu CHROM-Agar™ Orientation est un milieu chromogénique sélectif et différentiel qui facilite l'isolement rapide des espèces bactériennes issues de cultures mixtes qui sont repérées par leurs couleurs.

Les espèces du genre *Staphylococcus* apparaissent sous forme de petites colonies dorées pour l'espèce *aureus* et rose pour l'espèce *saprophyticus*, vert métallique pour l'espèce *hominis*, jaune pour l'espèce *cohnii ssp*, et vert foncé pour l'espèce *Chromogones*. Les bactéries Gram positives appartenant au genre *Micrococcus* présentent une couleur vert eau (**Figure N°04**).

Des boîtes de Pétri contenant du CHROM-Agar™ Orientation sont ensemencées par stries puis placées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

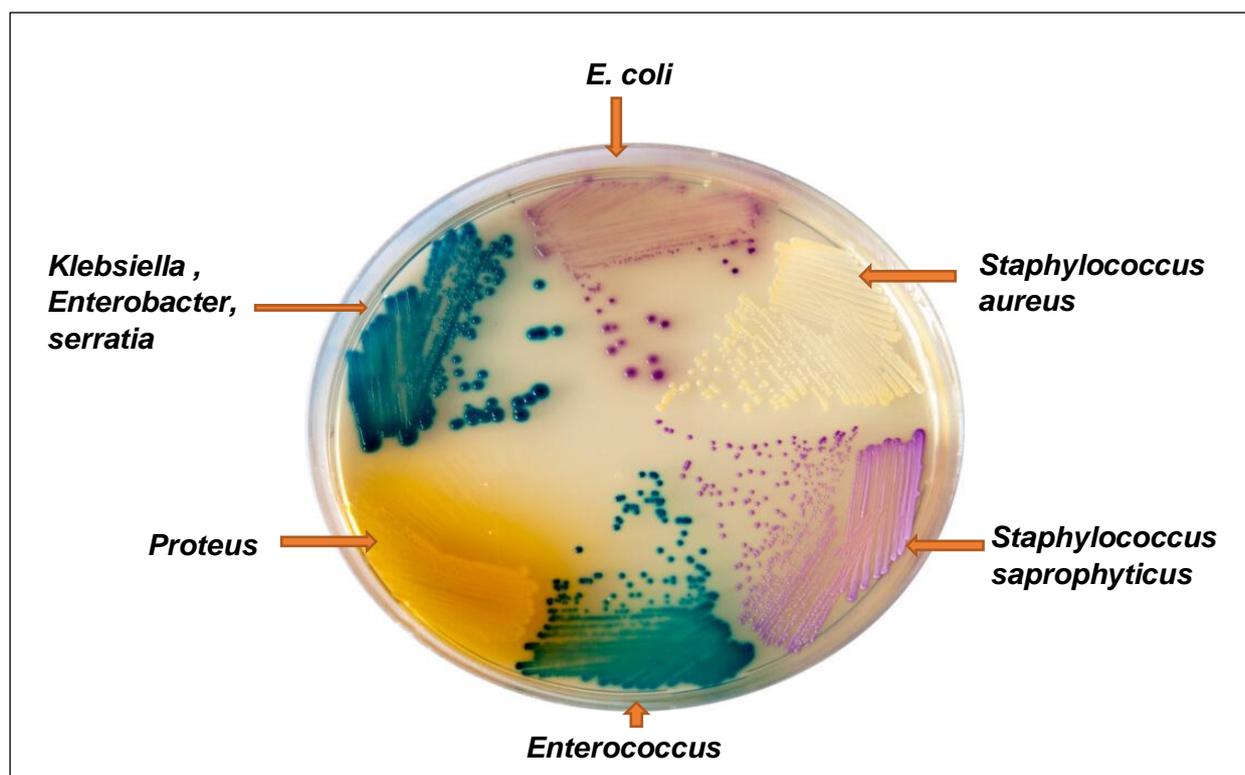


Figure N°04 : Aspect des bactéries sur le CHROM-Agar™ Orientation

3.6. Identification par galerie API-Staph

La galerie API-Staph est un système d'identification standardisé comprenant des tests biochimiques miniaturisés. Elle se présente sous forme de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés.

Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API® Staph medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau et l'identification est obtenue en se référant à un catalogue analytique ou à un logiciel d'identification.

4. Détermination du profil de résistance des souches de *S. aureus* 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 cette suspension est ajustée 0,5 McFarland 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 d'antibiotiques bien déterminées (**Tableau N°01**) sont déposés sur la surface d'une boîte de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton préalablement ensemencée par un inoculum de 10^6 UFC/mL de la souche à tester. Après incubation des boîtes de Pétri à 37°C pendant 18 à 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques sont mesurés et comparés aux valeurs critiques fixées par le **CLSI (2016)**. Les souches sont classées dans l'une des catégories : Résistant (R), Intermédiaire (I) ou Sensible (S).

Tableau N°01 : Antibiotiques utilisés pour l'antibiogramme

Familles	Antibiotiques	Abréviations	Charge du disque
B-lactamines	Pénicilline	P	1 unité
	Oxacilline	OX	1µg
	Cefoxitine	FOX	30µg
Aminosides	Gentamicine	GEN	10µg
	Tobramycine	TOB	10µg
	Amikacine	AK	30µg
Macrolides	Erythromycine	E	15µg
	Clindamycine	DA	2µg
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	CIP	5µg
Acides phosphoniques	Fosfomycine	FOS	200µg
Rifamycines	Rifampicine	RIF	5µg

4.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées

Les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de la ciprofloxacine et la vancomycine vis-à-vis des souches de *S. aureus* isolées sont déterminées par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits selon le protocole standard du **CLSI, (2016)**.

Nous avons également testé la sensibilité des souches isolées à un antibiotique, antifongique, la cycloheximide qui inhibe la synthèse des protéines par son action sur l'élongation de la traduction de l'ARNm (**Schneider-poetsch et coll., 2010**).

Les solutions mères des antibiotiques sont préparées en extemporané à une concentration de 16µg/mL. La vancomycine est solubilisée dans l'eau distillé stérile. Pour la cycloheximide, la solution mère est préparée à une concentration de 80mg/mL dans le DMSO.

50µL de la suspension bactérienne à une concentration de 10⁶cellules/mL sont introduits dans les puits de la microplaque auxquelles sont ajoutées 50µL de la solution d'antibiotique. Les concentrations finales en antibiotiques dans les puits de la microplaque varient de 0,25µg/mL à 8µg/mL pour la ciprofloxacine et la vancomycine et de 0,156µg/mL à 40mg/mL pour le cycloheximide.

Les microplaques sont ensuite scellées puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les CMIs correspondent à la concentration en antibiotique ou aucune croissance n'est visible à l'œil nu.

Pour la détermination de la Concentration Minimale Bactéricide (CMB), 20µL des deux puits contenant les concentrations d'antibiotiques strictement supérieures à la CMI sont déposés dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose Müller-Hinton. Après une incubation de 24 heures à 37°C, la CMB correspond à la boîte qui présente un nombre de colonies inférieur ou égale à 3 (**CLSI, 2016**).

5. Détermination de la biomasse des biofilms formés *in vitro* par les souches de *Staphylococcus aureus* isolées

La biomasse des biofilms formés par les souches de *S. aureus* isolées est quantifiée selon la technique de **Christensen et coll., (1985)**, basée sur la coloration au Crystal violet.

Une préculture de 24 heures de la souche à tester est centrifugée à 1000g pendant 15 minutes à +4°C. Le surnageant est éliminé et le culot lavé deux fois avec du tampon phosphate salé PBS (pH 7,4 ; 10mM).

100 µL de la suspension bactérienne à une concentration de 10⁶ cellules/mL préparée dans le milieu Trypticase de soja, sont introduits dans les puits d'une microplaque qui est ensuite scellée et placée dans une étuve à 37°C.

Après 24h d'incubation, les puits sont lavés avec du PBS stérile pour éliminer les cellules planctoniques et les biofilms formés dans les puits de la microplaque sont fixés par addition de 100µL de méthanol. La microplaque est laissée à température ambiante pendant 10 minutes, puis 100µL d'une solution de cristal violet à 1% sont ajoutés dans tous les puits de la microplaque. Après une incubation de 20 minutes à température ambiante, les puits sont lavés et 150µL de l'acide acétique à 33% sont ajoutés pour libérer le cristal violet.

Les densités optiques sont mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 570nm.

Selon la valeur de la densité optique, les souches sont classées en 3 catégories (**Mathur et coll., 2006**) (**Tableau N°02**)

Tableau N°02 : Classification des souches de *S. aureus* selon leurs potentiels à former des biofilms *in vitro* (Mathur et coll., 2006)

DO (570nm)	Potentiel de formation des biofilms
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 par les bactéries Gram positives

Sur les 20 prélèvements buccodentaires réalisés sur la face antérieure et la face postérieure de la langue d'enfants diabétiques de la ville de Tlemcen, 17 se sont révélés positifs par croissance sur milieu Chapman, soit un taux d'altération global de 85%. Ce taux est supérieur à celui trouvé à Bejaia (Algérie) par **Bensalem et Ait, (2020)** qui était de 68,75%.

1.1. Répartition des altérations par les bactéries Gram positives selon l'âge et le sexe des enfants

Les résultats de la répartition des altérations causées par les bactéries Gram positives selon l'âge et le sexe des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen sont représentés sur la **figure N°05**.

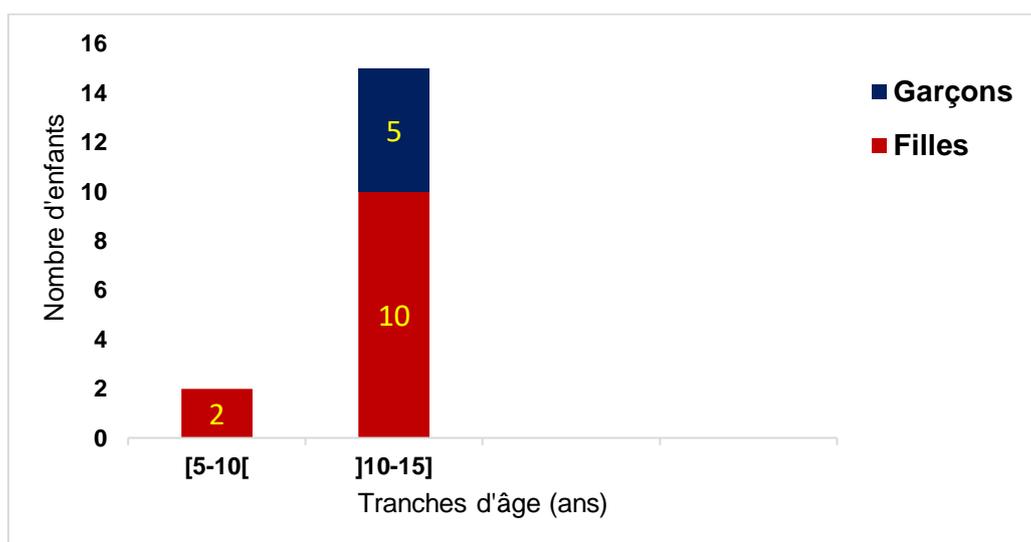


Figure N°05 : Répartition des altérations par les bactéries Gram positives selon l'âge et le sexe des enfants

Parmi les 17 prélèvements positifs nous comptons 12 filles et 5 garçons. La répartition de ces prélèvements selon l'âge des enfants montre que deux filles appartiennent à la tranche d'âge [5-10[ans et 10 à celle de]10-15] ans. Tous les garçons se situent dans la tranche d'âge]10-15] ans.

Nous remarquons que les enfants appartenant à la tranche d'âge]10-15] ans sont plus concernés par les altérations bactériennes à Gram positif avec une dominance du sexe féminin (10 versus 5).

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Bensalem et Ait, (2020)** qui ont montré que 53% des altérations bactériennes à Gram positif étaient retrouvées chez des filles âgées entre 3 et 15 ans.

Selon **Bakama et coll., (2020)**, l'altération bactérienne des cavités buccales des enfants diabétiques dépend de l'âge et du sexe des patients.

1.2. Répartition des altérations bactériennes à Gram positif en fonction de l'état de la cavité buccale des enfants diabétiques

La répartition des altérations bactériennes à Gram positif en fonction de l'état des cavités buccales des enfants diabétiques est représentée sur la **figure N°06**.

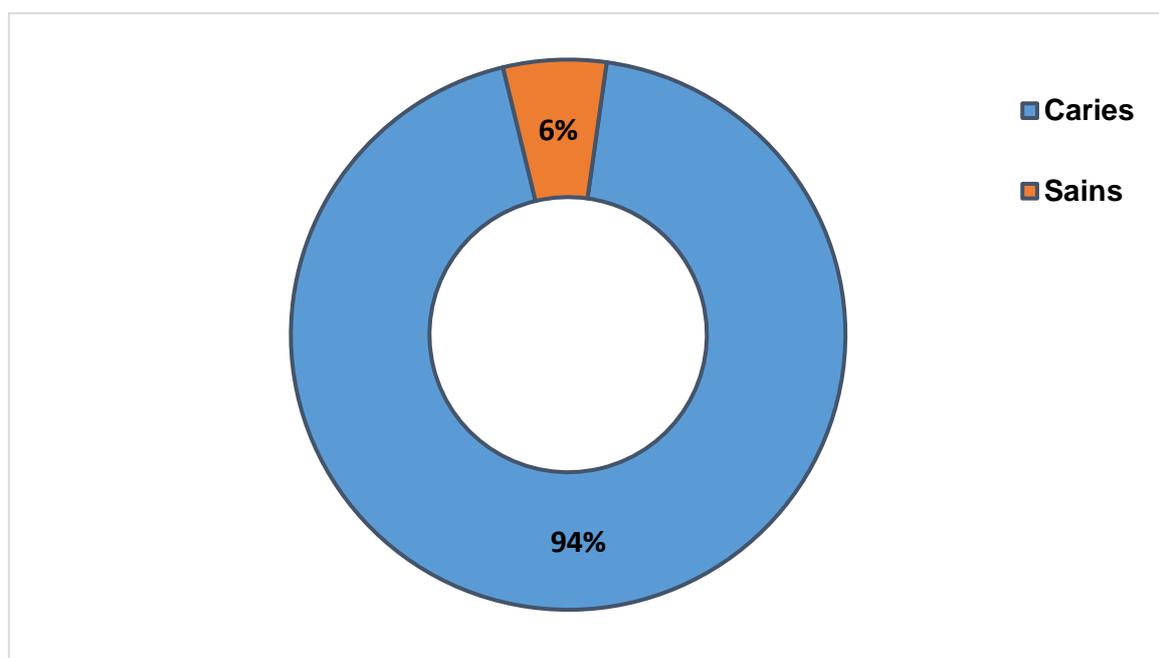


Figure N°06 : Répartition des altérations bactériennes à Gram positif en fonction de l'état général des cavités buccales des enfants inclus dans cette étude

Il ressort de cette figure que 94% des enfants présentent des caries dentaires liées essentiellement à une mauvaise hygiène buccodentaire et une consommation

excessive de sucre. Ce résultat est en accord avec les données de l'organisation mondiale de la santé qui place la carie dentaire au 3^{ème} rang des fléaux mondiaux (OMS, 2014).

De même, une étude menée par Ştirb et Petrus-Vancea, (2021) a montré que la carie dentaire affecte plus de 80% de la population mondiale avec une dominance des enfants d'âge scolaire. Aussi, Manuel et coll., (2012) ont révélé que la prévalence de la carie dentaire chez les enfants diabétiques au Togo était de 78,7%.

2. Identification des bactéries Gram positives isolées

A partir des 17 prélèvements buccodentaires positifs, 24 bactéries Gram positives sont isolées. Elles possèdent toutes une catalase positive ce qui oriente vers des bactéries du genre *Staphylococcus*.

Douze de ces bactéries présentent une coagulase et une DNase positives, tests qui permettent de distinguer les *Staphylococcus aureus* des *Staphylococcus* à coagulase négative.

L'identification des souches isolées par croissance sur milieu Chrom-Agar Orientation et par galerie API-Staph a montré que 20 souches appartiennent au genre *Staphylococcus* soit un taux de 83% et 4 au genre *Micrococcus* (17%). Les résultats de l'identification sont présentés sur la **figure N°07**.

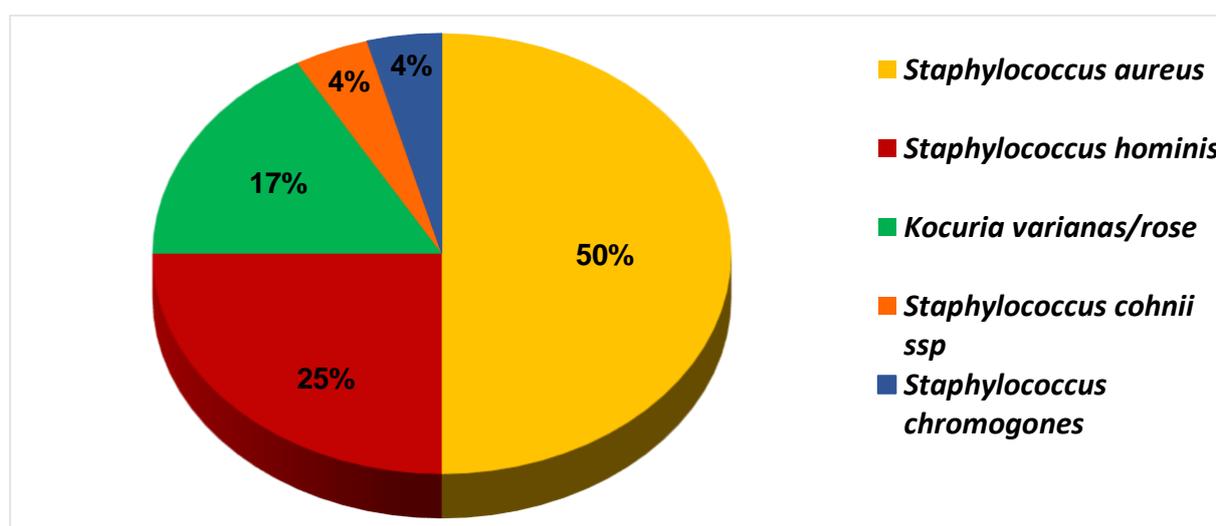


Figure N°07 : Identification des bactéries Gram positives isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Nous constatons que l'espèce *Staphylococcus aureus* est dominante dans nos isolats avec un taux de 50% (12 souches), suivie de *Staphylococcus hominis* avec un taux de 25% (6 souches), *Staphylococcus chromogenes* et *Staphylococcus cohnii* avec un taux de 4% chacune (1 souche).

Les quatre souches du genre *Micrococcus* isolées, appartiennent toutes à l'espèce *kocuria varianas/rosea*.

Ce résultat va dans le même sens que celui de **Bensalem et Aït, (2020)** qui ont révélé une prédominance de *Staphylococcus aureus* dans la cavité buccale des enfants avec un taux de 69%,

La dominance de *Staphylococcus aureus* est probablement due au fait que près de 94% des enfants inclus dans ce travail présentent des cavités buccales avec des dents cariées, des gencives enflammées et n'ont pas une bonne hygiène buccodentaire.

3. Profil de résistance des souches de *Staphylococcus aureus* isolées

3.1. Antibiogramme

Les résultats de l'antibiogramme des souches de *Staphylococcus aureus* isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen sont regroupés sur le **tableau N°03**.

Nous constatons que toutes les souches de *S. aureus* isolées sont résistantes à la pénicilline et à l'oxacilline. Les souches Sa8 et Sa9 et les souches Sa4 et Sa5 sont résistantes à la céfoxitine et à la tobramicine respectivement. La résistance des souches de *S. aureus* isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques à ces antibiotiques a déjà été rapportée en Tunisie (**Mastouri et coll., 2004**) ainsi qu'en Mauritanie dans la région de Nouakchott (**Salem et coll., 2016**).

En revanche, toutes les souches sont sensibles à la gentamicine, l'amikacine, la ciprofloxacine, la fosfomycine, la clindamycine et l'érythromycine. Ces résultats sont en accord avec ceux de **Mooehouse et coll., (1996)** ; **Elamzaoui et coll., (2009)** ; **Mahoub, (2016)** et **kerbouci et coll., (2022)** qui ont montré que des souches de *S. aureus* sont sensibles à l'amikacine, la fosfomycine, l'érythromycine et la ciprofloxacine avec des taux respectifs de 100% ; 93,5% ; 85% et 93%.

Tableau N°03 : Antibiogramme des souches de *S. aureus* isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

ATB Souches	P	OX	FOX	CN	AK	TOB	CIP	E	DA	FOS
	≤28≥29	≤21≥22	≤21≥22	≤12≥15	≤14≥17	<12≥15	≤15≥21	≤13≥23	≤14≥21	≤23
Sa1	06 (R)	06 (R)	37 (S)	30 (S)	27 (S)	25 (S)	40 (S)	30 (S)	33 (S)	26 (S)
Sa2	07 (R)	06 (R)	26 (S)	30 (S)	25 (S)	27 (S)	33 (S)	39 (S)	42 (S)	27 (S)
Sa3	10 (R)	06 (R)	31 (S)	30 (S)	25 (S)	25 (S)	35 (S)	31 (S)	33 (S)	45 (S)
Sa4	06 (R)	06 (R)	28 (S)	30 (S)	22 (S)	6 (R)	40 (S)	30 (S)	35 (S)	30 (S)
Sa5	06 (R)	06 (R)	25 (S)	30 (S)	21 (S)	6 (R)	37 (S)	34 (S)	34 (S)	27 (S)
Sa6	06 (R)	06 (R)	28 (S)	30 (S)	23 (S)	26 (S)	30 (S)	34 (S)	33 (S)	33 (S)
Sa7	06 (R)	06 (R)	27 (S)	30 (S)	21 (S)	23 (S)	32 (S)	37 (S)	38 (S)	27 (S)
Sa8	06 (R)	06 (R)	19 (R)	30 (S)	25 (S)	25 (S)	36 (S)	34 (S)	35 (S)	24 (S)
Sa9	06 (R)	06 (R)	19 (R)	30 (S)	25 (S)	25 (S)	40 (S)	23 (S)	30 (S)	30 (S)
Sa10	06 (R)	06 (R)	32 (S)	30 (S)	25 (S)	23 (S)	38 (S)	30 (S)	34 (S)	29 (S)
Sa11	06 (R)	06 (R)	30 (S)	30 (S)	21 (S)	25 (S)	33 (S)	27 (S)	26 (S)	30 (S)
Sa12	06 (R)	06 (R)	33 (S)	30 (S)	23 (S)	23 (S)	41 (S)	29 (S)	33 (S)	27 (S)

P : Pénicilline, OX : Oxacilline, FOX : Céfoxitine, CN : Gentamicine, AK : Amikacine,
 TOB : Tobramicyne, CIP : Ciprofloxacine, E : Erythromycine, DA : Clindamycine,
 FOS : Fosfomycine

3.2. Concentrations minimales inhibitrices des antibiotiques vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées

Les CMI de la ciprofloxacine, la vancomycine et le cycloheximide vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen par la technique de microdilution sur microplaque 96 puits sont regroupées sur la **figure N°09**.

Les niveaux des CMI des antibiotiques testés vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* varient de 0,25 à 1µg/mL pour la ciprofloxacine, de 0,5 à 2µg/mL pour la vancomycine et de 0,156mg/mL à 40mg/mL pour la cycloheximide.

Selon le **CLSI 2016**, les seuils de sensibilité sont ≤ 2 µg/mL pour la vancomycine et ≤ 1 µg/mL pour la ciprofloxacine. De ce fait, les souches de *Staphylococcus aureus* sont sensibles à la ciprofloxacine ce qui confirme les résultats de l'antibiogramme. Aussi, toutes les souches isolées sont sensibles à la vancomycine.

Ces résultats sont en accord avec ceux de **Akoulas et coll., (2004)** qui ont rapporté une efficacité thérapeutique de la vancomycine dans 56% des cas de bactériémies à *S. aureus* avec des CMI inférieures à 1,5µg/mL. De même **John et coll., (2021)** ont montré que des souches de *S. aureus* sont sensibles à la ciprofloxacine avec une CMI de 0,5µg/mL.

Par ailleurs, les CMI de la cycloheximide vis-à-vis des souches de *S. aureus* isolées sont de 0,156mg/mL pour Sa1 ; 5mg/mL pour Sa11 ; 10mg/mL pour Sa6 et 20mg/mL pour Sa2, Sa3 et Sa6. Cependant, pour les souches pour Sa4, Sa5, Sa8, Sa9, Sa10 et Sa12, aucune inhibition n'est observée jusqu'à des concentrations en cycloheximide égales à 40mg/mL .

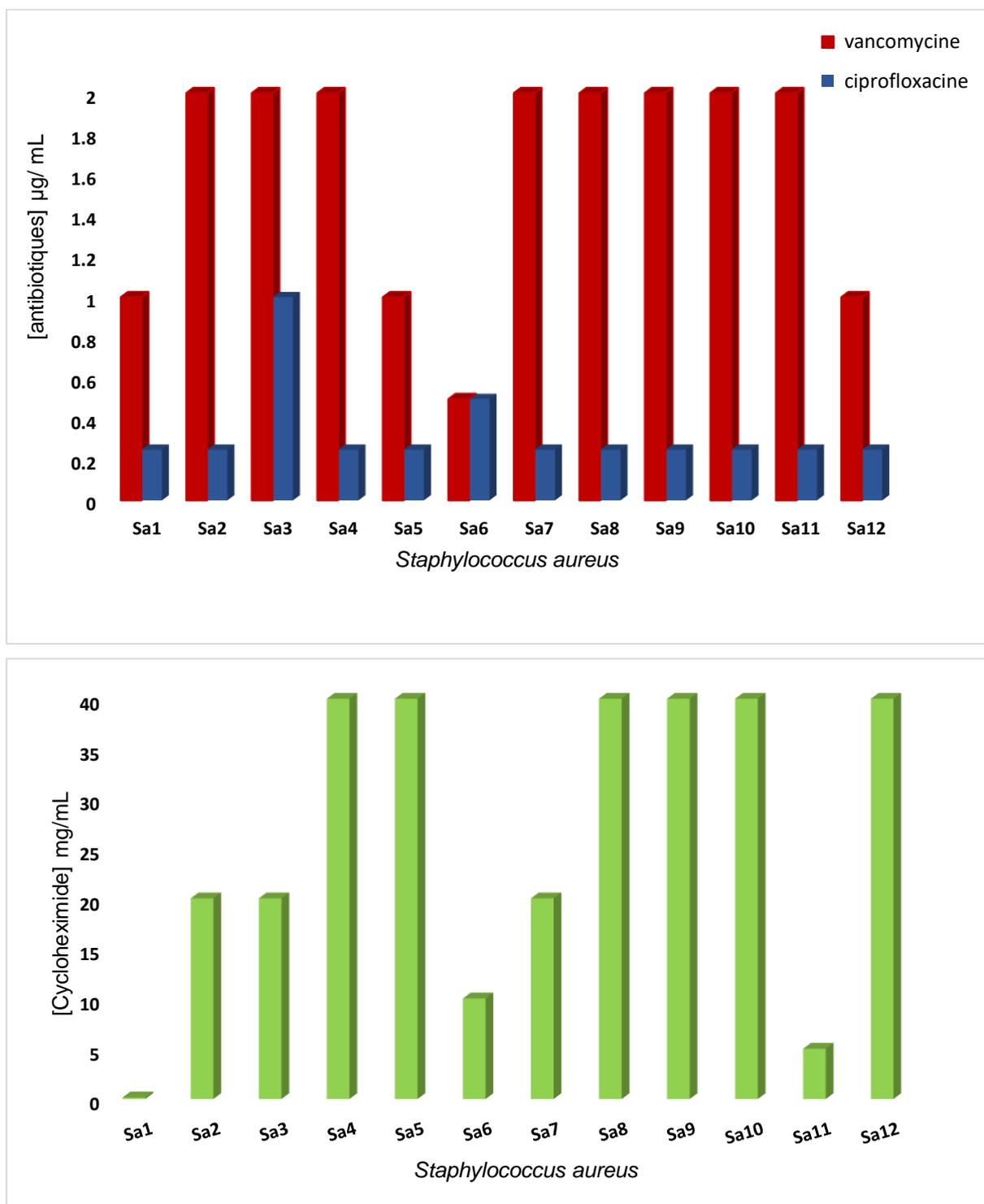


Figure N°09 : CMI's de la ciprofloxacine, de la vancomycine et de la cycloheximide vis-à-vis des souches de *S. aureus*

3.3. Concentrations minimales bactéricides des antibiotiques vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées

Les résultats des concentrations minimales bactéricides de la ciprofloxacine et de la vancomycine vis-à-vis des souches de *Staphylococcus aureus* isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen sont représentés sur la **figure N°10**.

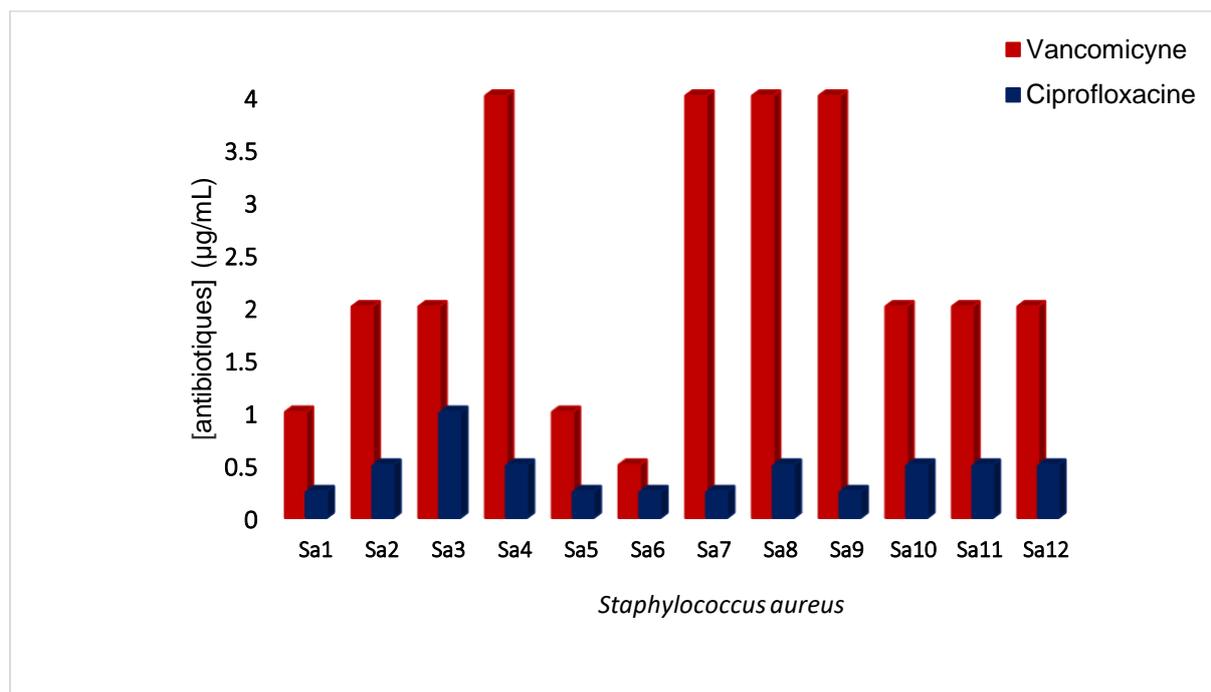


Figure N°10 : CMBs de la ciprofloxacine et de la vancomycine vis-à-vis des souches de *S. aureus*

Nous remarquons que les CMBs de la ciprofloxacine sont de 0,25µg/mL pour Sa1, Sa5, Sa6, Sa7 et Sa9 ; 0,5µg/mL pour Sa2, Sa4, Sa8, Sa10, Sa11 et Sa12 et de 1µg/mL pour Sa3. Par ailleurs, pour la vancomycine, les CMBs sont de 0,5 pour Sa6 ; 1µg/mL pour Sa1 et Sa5 ; 2µg/mL pour Sa2, Sa3, Sa10, Sa11 et Sa12 et de 4µg/mL pour Sa4, Sa7, Sa8 et Sa9.

4. Biomasses des biofilms formés *in vitro* par *Staphylococcus aureus*

Les biomasses des biofilms formés *in vitro* par les 12 souches de *staphylococcus aureus* sont représentées sur la figure N°08.

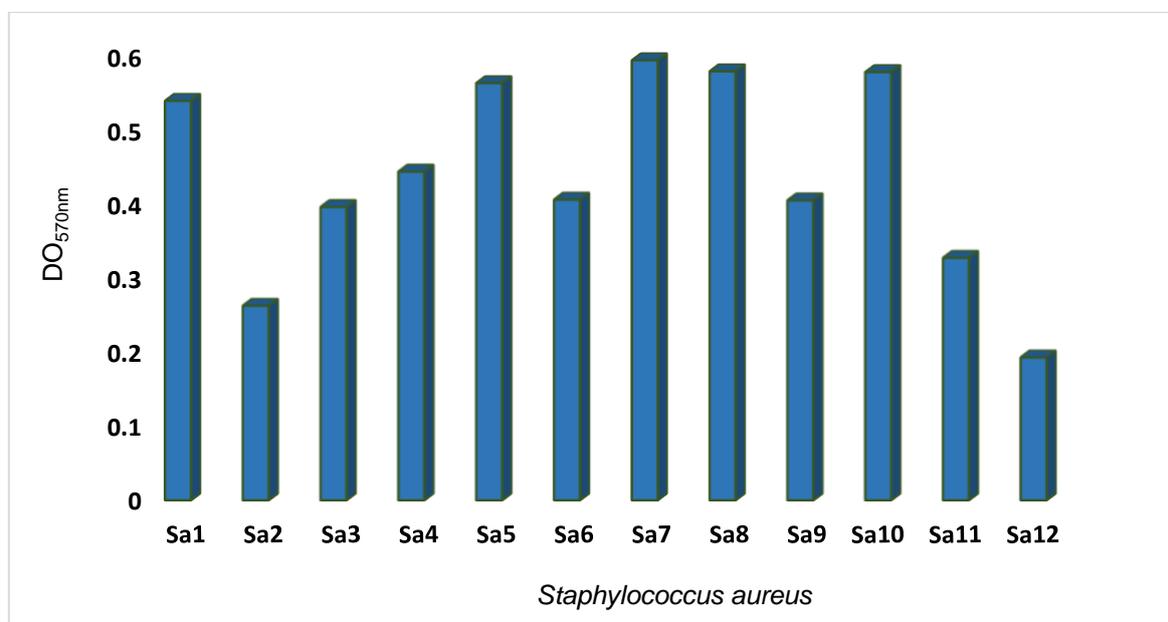


Figure N°08 : Biomasses des biofilms formés *in vitro* par les souches de *S. aureus* isolées des cavités buccales des enfants diabétiques de la ville de Tlemcen

Toutes les souches présentent des densités optiques supérieures à 0,120, par conséquent, elles sont toutes formatrices de biofilms (**Mathur et coll. 2006**).

Selon les intervalles fixés par ces mêmes auteurs, la souche Sa12 est modérément formatrice de biofilms (DO=0,192), alors que toutes les autres souches sont fortement formatrices de biofilms avec des densités optiques allant de 0,262 à 0,595.

En raison des modifications qualitatives et quantitatives de la salive, provoquées par un diabète de type1 mal équilibré, une mauvaise hygiène buccodentaire et la présence des caries et de parodontopathies, les souches isolées de la cavité buccale des enfants diabétiques présentent un potentiel élevé de formation de biofilms (**Arrieta-Blanco et coll., 2003**).

Quatrième partie

Conclusion générale

Cette étude a porté sur la recherche des altérations bactériennes liées à l'espèce *Staphylococcus aureus* dans les cavités buccales des enfants diabétiques de type 1 de la ville de Tlemcen.

Il ressort de ce travail :

- Sur les 20 prélèvements effectués, 17 sont altérés par les bactéries à Gram positif soit un taux global de 85%.
- Ces altérations sont réparties entre 12 filles (70,5%) et 5 garçons (29,5%). De plus, 88% de ces enfants présentant une altération appartiennent tous à la tranche d'âge]10-15] ans et 94% ont une cavité buccale avec des dents cariées, des gingivites et une plaque dentaire.
- A partir des 17 prélèvements positifs, 24 souches sont isolées et identifiées parmi lesquelles 20 appartiennent au genre *Staphylococcus* et 4 au genre *Micrococcus*. L'identification de ces bactéries par galeries API-Staph a montré que 12 souches appartiennent à l'espèce *Staphylococcus aureus* (50%), 6 à l'espèce *Staphylococcus hominis* (25%), une souche à l'espèce *Staphylococcus chromogenes* et une à l'espèce *Staphylococcus cohnii* ssp avec un taux de 4% chacune. Les quatre bactéries du genre *Micrococcus* sont toutes assignées à l'espèce *Kocuria varianans/rose* (17%). *Staphylococcus aureus* est l'espèce prédominante dans nos prélèvements. Les quatre bactéries du genre *Micrococcus* sont toutes assignées à l'espèce *Kocuria varianans/rose* (17%).
- Toutes les souches sont sensibles à la gentamicine, l'amikacine, la ciprofloxacine, la fosfomycine, la clindamycine et l'érythromycine. En revanche, toutes les souches sont résistantes à la pénicilline et l'oxacilline ; deux souches (Sa8 et Sa9) sont résistantes à la céfoxitine et deux souches (Sa4 et Sa5) sont résistantes à la tobramycine.
- Les CMI des antibiotiques utilisés sont comprises entre 0,25 et 1µg/mL pour la ciprofloxacine et entre 0,5 et 2µg/mL pour la vancomycine. Quant aux CMBs, elles varient de 0,25 à 1µg/mL pour la ciprofloxacine et de 0,5 à 4µg/mL pour la vancomycine. Pour ce qui est de la cycloheximide, les CMI vont de 0,156 à 20mg/mL pour les souches Sa1, Sa2, Sa3, Sa6, Sa7 et Sa11. Aucune inhibition pour les autres souches n'est observée.
- Les douze souches de *Staphylococcus aureus* isolées sont formatrices de biofilms *in vitro*. La quantification des biomasses de ces biofilms a montré que la souche Sa12

est classée dans la catégorie « modérément formatrices de biofilms », alors que toutes les autres, appartiennent à la catégorie « fortement formatrices de biofilms ».

Pour continuer ce travail, il serait intéressant de :

- Faire une étude épidémiologique sur les altérations buccodentaires chez les enfants diabétiques de toute la wilaya de Tlemcen
- Rechercher les autres bactéries à Gram positif responsables des altérations buccodentaires des enfants diabétiques

Cinquième partie

Références bibliographiques

1. Aas J.A., Paster B.J., Stokes L.N., Olsen I., and Dewhirst F.E. (2005): Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5721–5732.
2. Akoulas G., Michalopoulos A., Liolios E., Poulikakos P., Samonis G., Koskina K., et Giamarellou, H. (2004). Efficacité comparée du traitement à la vancomycine selon la sensibilité in vitro à cet antibiotique dans les bactériémies à *Staphylococcus aureus*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 34(1), 35-41.
3. Arrieta-Blanco J. J., Bartolomé-Villar B., Jiménez-Martínez E., Saavedra-Vallejo P., et Arrieta-Blanco F. J. (2003). Bucco-dental pathology in children with type 1 diabetes in Madrid (Spain). An epidemiological study. *Medicina Oral*, 8(3), 184-191.
4. Bakama L., Dilu F., Lelo P., Kowe N., Bakambana G., et Songo F. (2020) Manifestation buccales chez les enfants et adolescents infectés par le VIH à Kinshasa (RDC) et facteurs associées. *Rev Mali Infect Microbiol*, 15(1), 34-43.
5. Bensalem S. et Ait Z.S. (2020). Caractérisation moléculaire de la résistance de *Staphylococcus aureus* isolés de la cavité buccale des enfants, aux antibiotiques. *Université A. MIRA –Bejaia, Algérie*
6. Bezoui M. (2016). Étude de l'adhésion de *Listeria monocytogenes* sur des surfaces inertes alimentaires. *Thèse de doctorat, Université de Bourgogne Franche-Comté*.
7. Botero J. E., Contreras A., Lafaurie G., Jaramillo A., Betancourt M., et Arce R. M. (2005). Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *Journal of Periodontology*, 86(2), 283-290.
8. Bon J.P., Wescombe P.A., Moore C.J. et al. (2006). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* ; 72 : 3050.
9. Calbria, A. (2022). Type 1 Diabetes in Children and Adolescents. In *Diabetes Mellitus in Children and Adolescents* (pp. 73-89).
10. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M. (2006): Microbiologie en odontostomatologie. *Paris : Maloine*.
11. Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., et Lappin-Scott H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.
12. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M. et 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. Davey M. E., et O'Toole G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.
 15. Denis F., Bourrel A. S., Brisou,B., Cattoir V., Concordet D., Del Giudice P., Dorche C., Drieux L., Dufour B., Fosse T., Goetschel A., Hames C., Hibon,F., Labbé V., Lecaplain D, Lelièvre H., Lemozy J., Leneveu M. C., Matruedhat A.,Salauze D. (2007). Bactériologie médicale : *Techniques usuelles (3e éd.)*. Editions ESKA..
 16. Devals .(2003).Le conseil du pharmacien d'officine dans le domaine buccodentaire. *Thèse de Docteur en Pharmacie. Université Paul Sabatier, .Toulouse.*
 17. Dewhirst F.E., Chen T., Izard J., Paster B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., and Wade, W.G. (2010). The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology* 192, 5002–5017.
 18. Dinges M. M., Orwin P. M., Schlievert P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical microbiology reviews*, 13, 1, 16-34.
 19. Elamzaoui A., Bouaddi M., Hassani S., Larouni M. A., et Hamouchi A. (2009). Étude de la sensibilité de *Staphylococcus aureus* aux antibiotiques au niveau de la région de Ouazzane. *Les Technologies de Laboratoire*, 4(16), 25-28
 20. Fédération Internationale du Diabète (2017). Atlas du Diabète de la FID (8ème édition). Bruxelles, Belgique.
 21. Høiby N. (2011). Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Medicine*, 9(1), 1-7.
 22. Hogo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dent. Res.* 2009;88 (11):982–990.
 23. Joffin J. N., et Guy L. (2001). Bactériologie médicale : Techniques usuelles (2e éd.). Editions scientifiques et médicales Elsevier SAS.
 24. John N. H., Oluwasegun A., et Olonitola O. S. (2021). Antibiotic resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates from clinical specimens in Ekiti State, Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 22(1), 69-77.
 25. Kerbouci A., Kacimi G., Hassaine H., et Nayme, K. (2022). Profil de résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* isolés de différents services de l'hôpital de Boufarik, Algérie. *Antibiotiques*, 24(1), 19-24.

26. Kolter R. (2008). Capitán de navío: inner space and outer proteinaceous surfaces in biology. *Molecular Microbiology*, 71(4), 751–757.
27. Mahboubi M., Bidgoli F. G., et Farzaneh H. (2016). *In vitro* synergistic efficacy of combination of amphotericin B with silver nanoparticles against clinical isolates of *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei*. *Journal of Mycologie Medicale*, 26(4), 355-361.
28. Manuel M., Ramata B., Kolomdou K., Kofi AN., Emilienne., Koffi BA., Daniel D. (2012). Diabète de type I chez l'enfant : gestion clinique des pathologies bucco-dentaires. *Med Buccale Chir Buccale*.18 :187-192
29. 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.
30. Mastouri M., Nour M., Nejma M. B., Bouallegue O., Hammami M., et Khedher M. (2006). Résistance aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline: détection des premières souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides en Tunisie. *Pathologie Biologie*, 54(1), 33-36.
31. Moorhouse E., Fenelo, L., Hone R., Smyth E., McGahon J., Dillo, M., et Keane C. T. (1996). *Staphylococcus aureus* sensitivity to various antibiotics-a national survey in Ireland 1993. *Irish Journal of Medical Science*, 165(1), 40-43.
32. Munusamy M., Joseph S. W., et Venkatakrisnan S. S.(2020). Phylogenomic analyses of the *Staphylococcaceae* family suggest the reclassification of five species within the genus *Staphylococcus* as heterotypic synonyms, the promotion of five subspecies to novel species, the taxonomic reassignment of five *Staphylococcus* species to *Mammaliococcus* gen. nov., and the formal assignment of *Nosocomiicoccus* to the family *Staphylococcaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* ;70:5926–5936.
33. Lai S., Cagetti MG., Cocco F., Cossellu D., Meloni G., Campus G., et al.(2017) Evaluation of the difference in caries experience in diabetic and non-diabetic children-A case control study. *PloS One* ; 12(11):0188451.
34. Landgraf M., Destro MT. 2013. Intoxication alimentaire staphylococcique. Dans *Infections et Intoxications d'Origine Alimentaire*, Presse académique, pp. 389-400.
35. Loe H.(1993). Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 16(1):329-34.
36. OMS (Organisation mondiale de la santé). (2014). Santé bucco-dentaire-Aide- mémoire 2012. Genève.

37. Pande S., Shitut S., Freund L., Westermann M., Bertels F., Colesie C., Bischoffs I.S., Kost C. (2015). Metabolic cross-feeding promotes co-existence in mixed-species bacterial communities. *PLoS ONE*, 10(3), e0121205.
38. Peacock S. J., De Silva I., et Lowy F. D. (2001). What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*. *Trends in microbiology*, 9(12), 605-610.
39. Philip D., Marsh., Michael V., Martin. (2009). Oral Microbiology, Fifth edition. S.I.: Churchill Livingstone Elsevier, Elsevier limited.
40. Preshaw P. M., Alba A. L., Herrera D., Jepsen S., Konstantinidis A., Makrilakis K., et Taylor R. (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia*, 55(1), 21-31.
41. Rebiahi S. A., Abdelouahid D. E., Rahmoun M., Abdelali S., et Azzaoui, H. (2014). Emergence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria). *Médecine et Maladies Infectieuses*, 44(11-12), 525-528.
42. Roberts S., Chambers S. (2005). Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infections of the skin and soft tissue. *Internal Medicine Journal*. 35, 2, 97–105.
43. Salem M. L., Ghaber S. M., Baba S. E., et Maouloud M.M. (2016). Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires dans la région de Nouakchott (Mauritanie) Antibiotic susceptibility of community-acquired strains of *Staphylococcus aureus* in Nouakchott Region (Mauritania). *The Pan African medical journal*, 24, 276.
44. Salvi GE., Kandylaki M., Troendle A., Persson GR., Lang NP (2005). Experimental gingivitis in type 1 diabetics: a controlled clinical and microbiological study. *J Clin Periodontol*. 32(3):310-6.
45. Sauer K., Stoodley P., et Høiby N. (2022). Biofilm formation and its role in the pathogenesis of chronic infections. In M. Manefield (Ed.), *Biofilm Control and Antimicrobial Agents* (pp. 1-18). *Caister Academic Press*.
46. Schneider-Poetsch T., Ju J., Elyer D. E., Dang Y., Bhat S., Merrick W. C., et Liu, J. O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature chemical biology*, 6(3), 209-217..
47. Smith A. J., Jackson M. S. and Bagg J. (2001). The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *Journal of medical microbiology*, 50(11), 940-946

- 48.Ştirb L. et Petrus-Vancea A. (2021). Etude préliminaire sur l'optimisation des connaissances, des attitudes et des compétences pratiques saines en santé bucco-dentaire, chez les collégiens des zones rurales. *Acta Didactica Napocensia*,14(2).
- 49.Todar K. (2005). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcal* Disease. Todar's Online Textbook of Bacteriology
- 50.Tong S. Y. C., Davis J. S., Eichenberger E., Holland T. L., Fowler V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*. 28, 3.
- 51.Turner N. A, Sharma-Kuinkel B. K, Maskarinec S. A, Eichenberger E. M, Shah. P. P, Carugati. M et al. (2020). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research *Nature Review Microbiology*. 17, 4, 203–218.