

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de L'univers

Département de Biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement « LAMAABE »

THESE

Présentée par

Mme Lachachi Meryem Ep Kerzabi

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Biologie

Option : maîtrise du développement microbien

Développement du biofilm bactérien au niveau des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen

Soutenue le 20/05/2015

Devant le jury

Président	Abdelouahed D.E.	Professeur	U. de Tlemcen
Examinatrice	Boucherit Otmani Z.	Professeur	U. de Tlemcen
Examineur	Timinouni M.	Professeur	Institut Pasteur Maroc
Examineur	Djeribi R.	Professeur	U. d'Annaba
Examinatrice	Bouziane D.	Professeur	U. d'Oran
Directrice de thèse	Hassaine H.	Professeur	U. de Tlemcen

Année Universitaire : 2014-2015

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le bon Dieu le tout puissant de nous avoir accordé la puissance et la volonté pour la réalisation de ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE), Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen.

Je remercie Monsieur le Professeur Moussa Boudjemaa Boumediene à la faculté des sciences de la nature et de la vie, sciences de la terre et de l'univers, Université Abou Bekr Belkaid-Tlemcen et directeur du laboratoire LAMAABE de nous avoir permis de réaliser ce travail au sein du laboratoire.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse Professeur Hassaine Hafida, à la faculté des sciences de la nature et de la vie, science de la terre et de l'univers, université Abou Bekr Belkaid Tlemcen. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos conseils vos critiques et remarques et surtout vos connaissances scientifiques très poussées ont concouru à l'aboutissement heureux de ce travail. Vous avez géré et orienté mes travaux afin que je puisse développer mes connaissances, votre générosité et votre qualité professionnelle sont pour moi des exemples à suivre, nulle expression ne va pouvoir traduire les sentiments de considération que j'éprouve envers vous.

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur le professeur Abdelouahid Djamel Eddine de l'université Abou Bekr Blekaid Tlemcen d'avoir accepté d'être le président du jury de cette thèse.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Madame le Professeur Boucherit Otmani Zahia, de l'université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, D'avoir accepté de juger ce travail, je suis très honorée qu'elle fasse partie de ce jury.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Monsieur Timinouni Mohammed responsable du laboratoire de Bactériologie Moléculaire de l'Institut Pasteur du Maroc pour son support inestimable au niveau de la biologie moléculaire, merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au Professeur Bouziane Djamila qui a trouvé le temps de s'intéresser à mon travail et d'avoir accepté de juger cette thèse, qu'elle en soit vivement remerciée.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Djeribi Ryad, à l'université Badji Mokhtar d'Annaba de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir consacré un temps précieux. Qui me fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je remercie tout le personnel de l'institut pasteur du Maroc Casablanca, pour leur accueil chaleureux. Je voudrais particulièrement remercier Koater, Dihaj et Zineb pour leurs connaissances scientifiques et soutien technique.

Je remercie également tout le personnel de l'unité dentaire CHU de Tlemcen pour leurs compréhensions et leurs collaborations.

Dédicaces

Je dédie ce travail

A ma mère, ce travail est le fruit de tes efforts, des longues années de sacrifices auxquels tu as consentis. J'ai en mémoire la ferme volonté que t'animait de me voir réussir dans mes études. Je ne trouverai jamais assez de mots pour t'exprimer toute ma gratitude et mon affection.

A mon père, ce travail est le tien. Tu m'as aidé et encouragé à poursuivre mes études mais plus encore mes rêves et intérêts, tu as rempli ton devoir envers nous, tu nous as mis dans le droit chemin, sans ton soutien ce travail n'aurait jamais été possible.

A mon époux Raouf avec qui je me sens plus forte et plus confiante chaque jour. Merci de m'avoir changé les idées quand il le fallait, merci de ta patience, de ton encouragement, de ton soutien. Reçoit à ton tour le témoignage de mon respect et de ma reconnaissance infinie....

Merci dieu d'avoir fait entrer un jour Hind dans ma vie, les mots ne me suffiront jamais pour exprimer ce qu'elle représente pour moi que dieu la protège.

A mes sœurs Nadia et Narymen qui m'ont toujours donné de l'espoir et cru en mes capacités. Merci d'avoir toujours été là pour moi! Je vous souhaite beaucoup de bonheur et de réussite. Restons unis et solidaires.

A mes frères Hamou et Wahib en témoignage de mon affection fraternelle et ma profonde estime.

A ma belle sœur, mes nièces et neveux. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur et de longue vie.

A ma belle-famille pour leurs encouragements et leur soutien moral, que mon beau père et ma belle mère soient particulièrement remerciés.

A tous mes ami(e)s en témoignage des moments inoubliables des sentiments purs et des liens qui nous unissent. Que Samia Iméne, Ibtissem, Nabila, Nassima, Asma, Téma, Nadia, Wafaa, Khadidja soient particulièrement remerciées.

Tables des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
Première partie : Synthèse bibliographique	03
1. Les infections liées aux soins.....	03
2. Tubulures d'eau des unités dentaires	04
3. Les instruments rotatifs liés aux tubulures d'eau des unités dentaires.....	04
4. Biofilm et tubulures d'eau des unités dentaires.....	05
4.1 Surface de colonisation.....	06
4.2 Flux laminaire.....	06
4.3 Rapport surface/volume	07
5. Problèmes liés à l'eau des unités dentaires.....	09
5.1 Risques pour les patients.....	09
5.2 Risques pour l'équipe dentaire.....	09
Deuxième partie : Matériel et méthodes	11
1. Lieu d'étude.....	11
2. Prélèvements.....	11
3. Qualité microbiologique de l'eau des tubulures (méthode de filtration)	12
4. Préparation des échantillons des tubulures	12
5. Ensemencement et isolement des souches	12
6. Purification et identifications des souches	13
7. Détection de la formation du biofilm.....	13
7.1 Méthode de plaque de culture de tissus (TCP).....	13
7.2 La méthode du Rouge Congo Agar.....	14
8. Recherche des caractères de virulence des souches de Staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire.....	14
8.1 Détection du pouvoir d'adhésion.....	14
8.1.1 Extraction d'ADN bactérien.....	14
8.2 Pouvoir toxigène	17
8.2.1 Gènes toxigènes recherchés.....	17
8.2.2 Mélanges réactionnels pour les différentes PCR multiplex.....	18

8.2.3 Les amorces utilisées pour les différentes PCR multiplex.....	19
8.2.4 Programme d'amplification des différentes PCR multiplex	22
9. Essai d'étude de la contamination croisée <i>in vitro</i> lors des soins dentaires.....	22
9.1 Choix de la souche bactérienne	22
9.2 Préparation du matériel utilisé.....	23
9.3 Préparation et désinfection de la cavité buccale du mouton	23
9.4 La contamination artificielle de la cavité buccale.....	24
9.5 Réalisation des soins dentaire	25
9.6 Préparation, désinfection et réalisation des soins dentaires au niveau de la cavité buccale du 2 ^{ème} mouton.....	25
9.7 Analyse microbiologique de la cavité buccale du 2 ^{ème} mouton et de la tubulure d'eau utilisée	26
Troisième partie : Résultats et discussion.....	28
1. Prélèvements.....	28
2. Dénombrement de la flore totale des échantillons d'eau des fauteuils dentaires	29
3. Identification bactérienne.....	31
4. Répartition des bactéries sur la longueur des tubulures d'eau.....	35
5. Détection de la formation du biofilm.....	38
6. Détection des gènes <i>icaA, icaD, icaB, icaC</i>	40
7. Relation entre la présence des gènes <i>ica</i> et la formation de biofilm par les techniques TCP et RCA.....	42
8. Répartition des souches sur la longueur de la tubulure selon leur biotypes et présence du gène <i>ica</i>	45
9. La recherche des gènes toxiques chez les souches de staphylocoques isolées.....	47
10. Relation entre la présence des gènes toxiques, des gènes <i>ica</i> et la formation de biofilm.....	51
11. Contamination croisée lors des soins dentaire.....	52
Conclusion générale.....	55
Références bibliographique	57

Liste des abréviations

Ica : Inter cellular adhesion

IcaR : Inter cellular adhesion Repressor

PIA : Polysaccharide Intercellular Adhesin

PCR:Polymerase Chain Reaction

RCA : Méthode du Rouge Congo Agar

TCP : Méthode de Plaque de Culture de Tissus

CGP :Cocci à Gram Positif

BGN :Bacilles Gram Négatif

UFC :Unité Formant Colonie

SCP :Staphylocoques à Coagulase Positive

SCN :Staphylocoques à Coagulase Négative

CEUD : Circuit d'Eau des Unités Dentaires

MNT : Mycobactéries Non Tuberculeuses

EPS : Extracellular Polymeric Substances

Liste des figures

Figure1 : Canalisations d'eau et pièces à main	04
Figure 2 : Expulsion des microorganismes de la colonne d'eau des tubulures à travers le détartreur ultrasonique	05
Figure 3 : Biofilm d'une canalisation d'eau de l'unité dentaire.....	06
Figure 4 : Ecoulement de l'eau dans une tubulure dentaire	07
Figure 5 : Coupe transversale d'une tubulure d'unité dentaire démontrant la présence d'un biofilm microbien sur sa paroi	08
Figure 6 : Schéma représentant la disposition des fauteuils et le circuit d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen	11
Figure7 : Description de l'échantillonnage.....	12
Figure 8 : Emplacement d'une tubulure neuve	23
Figure 9 : Neutralisation microflore buccale et rinçage du désinfectant.....	24
Figure 10 : Contamination de la cavité buccale du 1 ^{ier} mouton	24
Figure 11 : Soins dentaires au niveau de la cavité buccale du 1 ^{ier} mouton.....	25
Figure 12 : Neutralisation de la microflore buccale du 2 ^{ème} mouton, rinçage du désinfectant et réalisation de soins dentaires	26
Figure 13 : Analyse de la cavité buccale du 2 ^{ème} mouton	26
Figure 14 : Récupération et analyse de la tubulure d'eau	27
Figure 15 : Représentation schématique de la variation de vitesse du courant entre la surface et le centre de la tubulure d'eau.....	31
Figure 16 : Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey	32
Figure 17 :Aspect des staphylocoques isolés sur milieu Chapman	33
Figure 18 : Les différentes souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen.....	35
Figure19 :Formation de biofilm par la technique TCP chez les souches de staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU de Tlemcen	39
Figure 20 : La Production de slime chez les souches de staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen	39
Figure 21 : Biosynthèse de la PIA en 3 étapes chez <i>Staphylococcus spp</i>	41
Figure 22 : Amplification des gènes <i>icaA ,icaD,icaB</i> chez quelques souches de <i>Staphylocoques spp</i>	42
Figure 23 : Révélation des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 1 chez les	

souches de <i>Staphylococcus spp</i> , gènes recherchés : <i>lukM</i> , <i>seh</i> , <i>selm</i> et <i>tst</i>	48
Figure 24 : Révélation des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 6, chez les souches de <i>Staphylococcus spp</i> : gènes recherchés, <i>edinABC</i> et <i>selk</i>	49
Figure 25 : Contamination croisée lors des soins dentaires	54

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de l'adhésion des <i>Staphylocoque spp</i>	14
Tableau 2 : Les amorces utilisées pour détection des gènes <i>ica</i> chez les souches de staphylocoque.....	15
Tableau 3 : Mélanges réactionnels pour la recherche des gènes <i>icaA, icaD, icaB, icaC</i>	16
Tableau 4 : Conditions d'amplification des gènes <i>icaA, icaB, icaC, icaD</i>	17
Tableau 5 : Les gènes toxiques recherchés	18
Tableau 6 : Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>lukM ,seh,selm</i> et <i>tst</i> dans la PCR MTX N°1.....	20
Tableau 7 : Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>etb, sed,ser,sec,eta</i> dans la PCR MTX N°2.....	20
Tableau 8 : Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>sea, luk SV-PV, hlb, selp</i> dans la PCR MTX N°3.....	20
Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>seb,selq</i> dans la PCR MTX N°4.....	21
Tableau 10: Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>etd,sell, selo</i> dans la PCR MTX N°5.....	21
Tableau 11 : Amorces utilisées pour la détection des gènes <i>edinB ,edinAC et selk</i> dans la PCR N°6.....	21
Tableau 12 : Condition d'amplification des gènes toxiques chez les souches de staphylocoques	22
Tableau 13: Prélèvements effectués (eau et tubulures)-unité dentaire CHU Tlemcen.....	29
Tableau 14 : Les résultats de dénombrement de la flore totale de l'eau des fauteuils dentaires	30
Tableau 15 : Les différents biotypes des bacilles à Gram négatif isolés des tubulures d'eau de l'unité dentaire - CHU Tlemcen	33
Tableau 16 : Les différents biotypes des <i>Staphylocoque spp</i> isolés des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen.....	34
Tableau 17 : Répartition des bactéries identifiées sur la longueur des tubulures d'eau de l'unité dentaire	37
Tableau 18 : Résultats de la production du biofilm chez <i>Staphylococcus spp</i> par la technique de microplaque 96 puits	38

Tableau 19 : Relation entre production de biofilm et la présence de l'opéron <i>ica</i>	43
Tableau 20 : La répartition des souches sur les tubulures en fonction du biotype et gène <i>ica</i>	46
Tableau 21 :Profil des gènes toxiniques chez les souches de <i>Staphylococcus warneri</i> ...	50
Tableau22 : Relation entre la production de biofilm, la présence de l'opéron <i>ica</i> et la présence des gènes toxiniques.....	51

Introduction

Introduction

Même si l'activité des chirurgiens-dentistes et des stomatologistes qui sont souvent exposés au sang ainsi qu'aux produits biologiques comprend de très nombreux actes invasifs avec utilisation d'instruments et de matériels complexes. Les infections transmises en milieu dentaire, du fait d'une part de leur rareté et d'autre part de la difficulté à les mettre en évidence chez les sujets traités en ambulatoire sont probablement sous-estimées. Le risque viral est le plus documenté, les infections bactériennes liées aux dispositifs dentaires et à l'eau des unités dentaires ont plus rarement été rapportés (**Cash, 1990**).

Les pièces à main, les seringues à air/eau et les détartreurs à ultrasons sont branchés aux unités dentaires par un réseau de fines tubulures en plastique par lesquelles l'eau et l'air circulent pour actionner ou refroidir les instruments (**Barbeau, 2000**). Les patients et les membres de l'équipe dentaire sont régulièrement exposés à l'eau des unités dentaires par ingestion, par inhalation des aérosols provenant de l'instrumentation dynamique et de la seringue air/eau, ou par contact direct avec d'éventuelles plaies chirurgicales. La qualité de cette eau a donc une grande importance (**Barsotti et al., 2001**), or plusieurs auteurs montrent que l'eau des unités dentaires est fréquemment contaminée et représente une source infectieuse potentielle [(**Stampi et al., 1996**);(**Pankhurst et al., 1998**);(**Zanetti et al., 2000**)]. Le problème principal des unités dentaires semble être la formation de biofilms à la surface interne des tubulures d'amenée d'eau (**Barbeau et Nadeau, 1997**). Les micro-organismes impliqués sont alors ceux des réseaux hydriques, mais également de l'environnement et des bactéries d'origine humaine (**Fitzgibbon et al., 1984**). Ce biofilm en lui-même ne pose pas de problème de contamination, ce sont les bactéries qui s'en échappent et qui quittent la conduite entraîne la libération dans l'eau des toxines lors de l'utilisation des pièces à main qui peut-être suffisantes pour déclencher une réaction inflammatoire.

A ce jour en Algérie aucune étude dans ce domaine n'a été publiée, c'est dans ce cadre que nous proposons cette étude et qui consiste à :

- Un contrôle bactériologique de l'eau circulant au niveau des tubulures des fauteuils de l'unité dentaire CHU Tlemcen.
- Une recherche et un isolement des bactéries à partir des tubulures d'eau liées aux pièces à mains dans cet établissement de soin dentaire.

- Etudier l'écologie d'installation des bactéries sur le long des tubulures d'eau.
- Une évaluation de la capacité de certaines souches isolées des tubulures d'eau à produire des biofilms par les techniques phénotypiques.
- La recherche des gènes impliqués dans les mécanismes de formation de biofilm chez les espèces isolées.
- La recherche des gènes codants pour la production de toxines chez ces espèces identifiées.
- Connaitre le mode de transmission des agents infectieux à travers les tubulures d'eau lors des soins dentaire.

Synthèse bibliographique

1. Les infections liées aux soins

Le problème des infections associées aux soins (IAS) constitue de nos jours une préoccupation majeure à l'échelle des hôpitaux. Elles génèrent un coût économique et humain considérable, les identifier connaître leur mode de transmission est un préalable indispensable (**Chalfine et Carlet, 2002**).

L'OMS estime qu'entre 5 et 12 % des patients hospitalisés dans le monde développent une infection associée aux soins (IAS) dont plus de 60 % sont associées à l'implantation d'un dispositif médical ou chirurgical. Tout dispositif implanté à titre provisoire ou permanent, peut devenir le site d'une éventuelle infection (sonde urinaire, canule d'intubation, valve cardiaque, cathéter veineux, dispositif intra-utérin). La physiopathologie de ces infections est liée initialement à la constitution d'un biofilm sur ces corps étrangers (**Espinasse et al., 2010**). A ce sujet des études ont déjà été publiées par notre équipe de recherche telles **Bellifa et al., (2013)**, **Kara Terki et al., (2013)** et **M'hamedi et al., (2014)**.

Les soins dentaires impliquent constamment l'utilisation en bouche de dispositifs médicaux qui sont tous souillés par de la salive ou par du sang. La transmission des agents infectieux est principalement liée aux instruments utilisés pendant des actes de soins qui sont souvent difficiles à nettoyer en raison de leur architecture complexe (**Richaud Morel et al., 2011**). Ces instruments reliés à l'eau des unités dentaires génèrent des bioaérosols, les bactéries, les virus, les champignons, les protozoaires ainsi que leurs métabolites (toxines) sont les principaux constituants de ces bioaérosols (**Harrel, 2004**). La cavité buccale fut très longtemps suspectée comme unique source de bioaérosols, mais depuis quelques années plusieurs chercheurs tels Barbeau et ses collaborateurs (1998) se sont intéressés à l'eau des tubulures dentaires qui démontre la présence d'une abondante population bactérienne incluant plusieurs pathogènes et pathogènes opportunistes qui peuvent être une source non négligeable de bioaérosols. La nature pathogène et immunogène des bioaérosols peut augmenter les risques d'infection au cours des soins dentaires. De plus la présence des bactéries dans l'eau des unités dentaires peut représenter un risque non seulement pour la santé des patients mais aussi pour le personnel [(**Dutil et al., 2007**);(**Pankhurst et Coulter, 2007**)].

2. Tubulures d'eau des unités dentaires

La grande majorité des unités dentaires sont directement reliées au réseau municipal de distribution d'eau, celle-ci n'est jamais exempte de microorganismes (**Zanetti et al., 2000**). Cette eau contient naturellement une grande diversité de bactéries, de virus, de protozoaires et de champignons (**Barbeau, 1998**). Les unités dentaires sont connectées aux instruments rotatifs (turbine, détarteurs à ultrason, spray à air et eau) par un réseau de petits tuyaux en plastique (**Barbeau, 1998**). Ces cordons souples multicanalaires provenant du fauteuil aussi appelé tubulure dans lesquels circulent l'air et l'eau servent à activer ou refroidir ces instruments (**Figure 1**) (**Richaud Morel et al., 2011**).

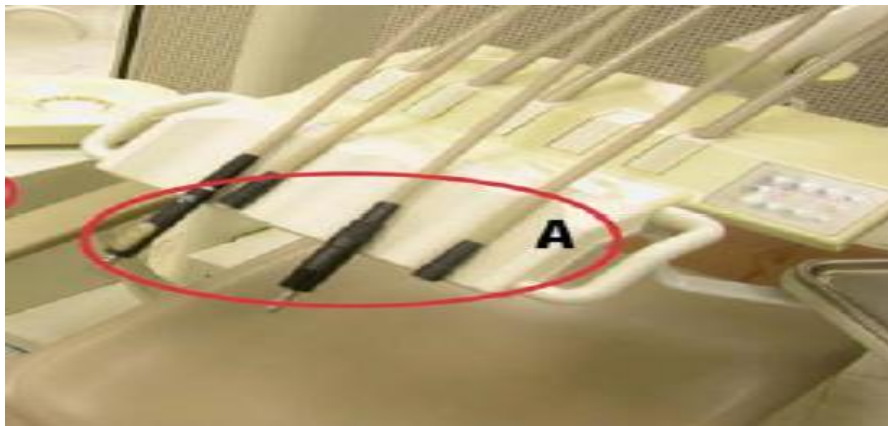


Figure 1: Canalisations d'eau et pièces à main (**Gravel, 2009**).

3. Les instruments rotatifs liés aux tubulures d'eau des unités dentaires

Les instruments rotatifs nécessitent une source d'énergie électrique ou pneumatique pour leur fonctionnement, qui permet l'entraînement du moteur et la poussée d'eau dans les tubulures pour le refroidissement afin d'éviter toute nécrose tissulaire. Cependant, ces instruments peuvent être à tout moment en contact avec du sang dilué par de la salive et de l'eau d'alimentation de l'unité (**Richaud-Morel et al., 2011**), certainement sur la face extérieure et souvent à l'intérieur de l'instrument rotatifs. La face externe peut être contaminée soit par contact direct avec les muqueuses, soit par les aérosols produits par les sprays (**Figure 2**). Alors que la contamination des conduits internes peut se faire par l'arrêt de l'air envoyé sur les rotors qui engendre une pression négative favorisant la pénétration des débris organiques pouvant conduire à une rétro-contamination des tubulures (**Checchi et al., 1998**).



Figure 2 : Expulsion des microorganismes de la colonne d'eau des tubulures à travers le détartreur ultrasonique (**Barbeau, 2007a**).

4. Biofilm et tubulures d'eau des unités dentaires

Les tubulures d'eau sont constamment en contact avec l'eau qui provient généralement du réseau d'aqueduc municipal. Les microorganismes présents dans l'eau potable entrent en contact avec la paroi des conduites d'eau des unités dentaires, amorcent une série d'événements conduisant à la prolifération et à la formation d'un biofilm tenace et adhérent (**Figure 3**) (**Barbeau, 1998**). Ainsi, un biofilm est défini comme étant une communauté structurée de microorganismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réunis au sein d'une matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice qu'ils secrètent (**Costerton et al., 1999**).

Les microorganismes représentent 2 à 15% du matériel du biofilm selon l'espèce impliquée alors que la matrice extracellulaire (EPS, *extracellular polymeric substances*), représente 50 à 90% de la masse organique carbonée du biofilm. L'eau demeure le principal composant du biofilm [(**Costerton et al., 1999**);(**Sutherland, 2001**);(**Donlan, 2002**)]. Son important degré d'hydratation, due à sa capacité à fixer un grand nombre de molécules d'eau par des liaisons hydrogène, permet de lutter contre la dessiccation de certains biofilms dans le milieu naturel.

Les biofilms sont traversés par une multitude de pores et de canaux aqueux permettant d'une part de maintenir une pression en oxygène et des concentrations de nutriments significatives dans les régions profondes du biofilm (**Donlan et Costerton, 2002**).

Les propriétés physico-chimiques de l'EPS sont variables d'un biofilm à un autre, mais un biofilm est initialement constitué de polysaccharides. La quantité des EPS produites varie en fonction du micro-organisme, et augmente avec l'âge du biofilm. La matrice du biofilm peut aussi être composée d'ions métalliques, de cations divalents, de macromolécules (protéines,

ADN, lipides, phospholipides)[(Sutherland, 2001);(Donlan, 2002);(Hall-Stoodley *et al.*, 2012)].

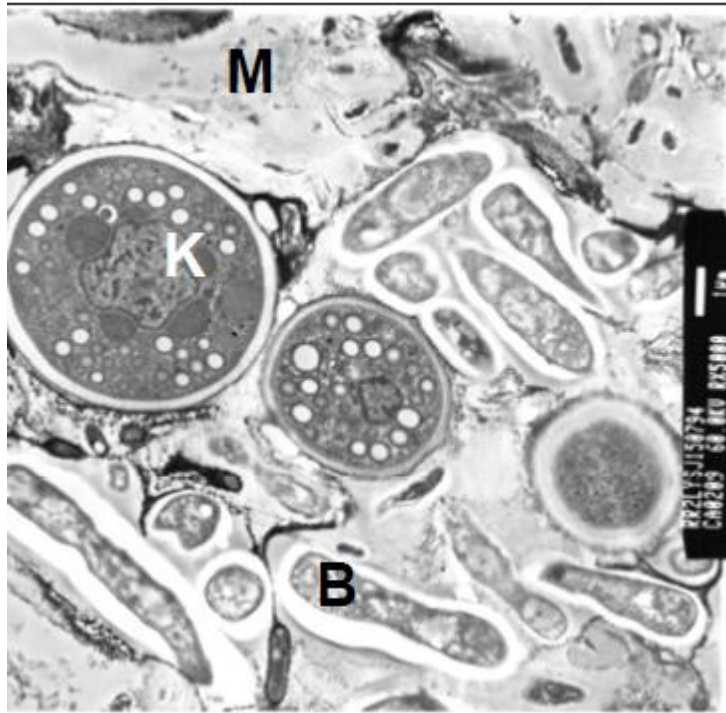


Figure 3 : Biofilm d'une canalisation d'eau de l'unité dentaire

K : kyste d'amibe ;B : bactérie ; M : matrice d'EPS (MET, 5000X) (Gravel, 2009).

La formation d'un biofilm dans la tubulure des unités est favorisée par 3 principaux facteurs: une surface de colonisation adéquate, un flux laminaire et un rapport surface/volume élevé (Mills, 2000).

4.1 Surface de colonisation

Les matériaux communément utilisés (plastique PVC) pour la distribution de l'eau aux pièces à mains procurent un excellent support pour l'attachement initial des bactéries et la prolifération subséquente du biofilm (Mills, 2000).

4.2 Flux laminaire

Au niveau de la paroi interne des tubulures, l'eau circule de façon laminaire. Ainsi, la colonne d'eau s'écoule de façon rapide et linéaire au centre de la tubulure alors que le flot est lent près des parois, créant un environnement favorable à l'attachement des bactéries et ainsi à la formation d'un biofilm. Il devient alors aisé de comprendre que le biofilm n'est que

faiblement « léché » par le courant et que les microorganismes attachés au biofilm traînent le long des parois visqueuses (**Figure 4**) (**Barbeau, 2007a**). Même la purge des unités dentaires permet d'éliminer efficacement les microorganismes en suspension (planctoniques) mais difficilement les microorganismes près de la surface et attachés au biofilm (**Mills, 2000**).



Figure 4 : Ecoulement de l'eau dans une tubulure dentaire (**Barbeau, 2007a**).

Dans une petite tubulure de 2mm, le flot d'eau se déplace rapidement dans le centre (V_{max}), en contrepartie il traîne ($v=0$) le long des parois où est précisément localisé le biofilm (**Barbeau, 2007a**).

4.3 Rapport surface/volume

À volume égal, plus le diamètre d'un cylindre telle de la tubulure de l'unité dentaire est petit, plus la surface de colonisation disponible est grande (**Mills, 2000**). Alors qu'une tubulure de 2 millimètre de diamètre et de 2 mètres de long contient environ une demi-tasse d'eau, il faudra entre 20 et 30 minutes pour vidanger toute l'eau stagnante qu'elle retient (**Barbeau, 2007a**). La température adéquate ($\sim 20^{\circ}\text{C}$), la stagnation prolongée (fin de semaine et nuits non utilisées) ainsi que le faible taux de chlore résiduel de l'eau des unités dentaires sont des conditions qui favorise grandement la prolifération bactérienne et l'établissement d'un biofilm sur les parois internes des tubulures (**Figure 5**)[(**Pankhurst et Philpott-Howard, 1993**);(**Barbeau, 1998**)].

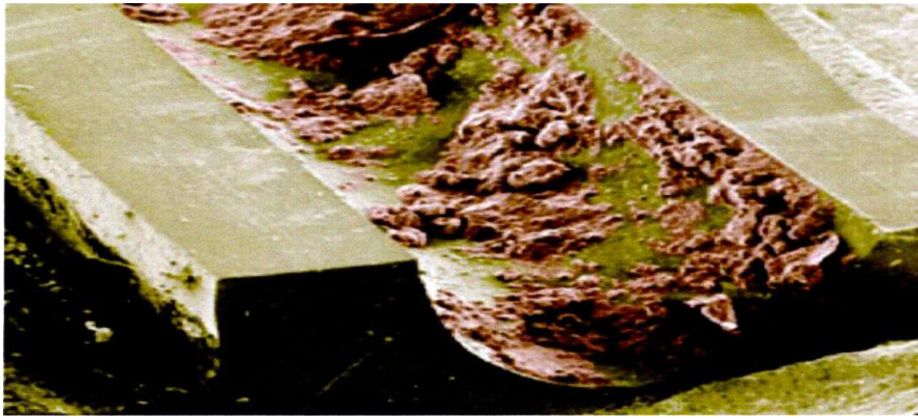


Figure 5: Coupe transversale d'une tubulure d'unité dentaire démontrant la présence d'un biofilm microbien sur sa paroi interne (**Dutil et al., 2007**).

Ainsi, à chaque point de la longue tubulure, le biofilm baigne dans un fluide pouvant être chargé de plus de 1 million de microorganismes par millilitre (l'équivalent de la concentration bactérienne de la salive) (**Barbeau, 2007a**). Dans certaines des unités dentaires qui sont en service depuis plusieurs années, on peut voir à l'œil nu un film biologique qui obstrue les tubulures fines et donne à l'eau une odeur nauséabonde (**Barbeau, 2000**).

Des études menées dans 7 pays européens (Grande-Bretagne, Irlande, Grèce, l'Espagne, l'Allemagne, le Danemark et les Pays-Bas) ont montré que les circuits d'eau des unités dentaires contiennent entre autres, la flore de la cavité buccale (**Walker et al., 2004**). **Panagakos et al., (2001)** ont démontré que les microorganismes formant les biofilms peuvent venir à la fois du réseau d'aqueduc municipal de l'unité dentaire, ainsi qu'à partir des liquides aspirés depuis la cavité buccale des patients. Ces bactéries rejoignent les colonies adhérentes à la paroi interne des conduites, une couche visqueuse se forme protégeant tous les microorganismes contre le brassage mécanique et les différents procédés de traitement (**Georges et Rozencweig, 2006**). Une couche de biofilm peut aller jusqu'à 50 μm d'épaisseur, ce qui permet à des bactéries, des champignons et protozoaires à augmenter leur biomasse (**Jatzwauk et Reitemeier, 2002**). Toute la surface interne d'une canalisation d'unité dentaire se recouvre d'un épais biofilm en seulement 180 jours (**De paola et al., 2002**), ensuite le simple fait de manipuler un tuyau souple ou de rincer le circuit, entraîne la libération dans le flux d'eau de petits fragments (**Georges et Rozencweig, 2006**). Ces fragments de biofilm chargés de microorganismes qui se sont décollée de la surface interne des tubulures (**Pankhurst et al., 1998**) peuvent entraîner la libération dans l'eau des toxines

à des quantités détectables qui peuvent être suffisantes pour déclencher une réaction inflammatoire [(Putnins *et al.*, 2001);(Coleman *et al.*, 2009)]. Une fois hors de la tubulure, les bactéries sont tirées de leur environnement naturel deviennent vulnérables et peuvent être remises dans un autre écosystème telle que la bouche (Barbeau, 2007a).

5. Problèmes liés à l'eau des unités dentaires

5.1 Risques pour les patients

La contamination des tubulures d'eau des unités dentaires pourrait représenter un problème de santé publique chez les sujets aux défenses immunitaires diminuées et qui représentent une population à fort risque infectieux (ADA, 1999).

En effet, l'eau peut servir à irriguer une plaie lors d'une chirurgie, mais peut aussi être aérosolisée par l'action des turbines, du détartreur ultrasonique et du pistolet air/eau. Les bioaérosols microscopiques de 0,65 à 5 µm de diamètre peuvent alors être inhalés ou projetés dans la gorge [(Dutil *et al.*, 2007);(Pankhurst et Coulter, 2007);(Szymanska et Dutkiewicz, 2008) ; (Dutil *et al.*, 2009)].

Il y a au moins quatre façons par lesquelles les microorganismes d'origine hydrique peuvent provoquer une infection chez le patient subissant une intervention dentaire :

La diffusion hématogène pendant l'intervention chirurgicale, le contact (buccal ou conjonctival) avec la muqueuse locale, l'ingestion et l'inhalation (Renaud *et al.*, 2009).

Les publications sur ce sujet s'appuient sur un rapport de 1987 publié dans le British Dental Journal faisant état de deux études de cas où des patients immunodéprimés avaient été infectés par *P. aeruginosa* retrouvé dans les conduites d'eau des unités dentaires.

Des amibes provenant de l'eau des unités dentaires pourraient être à l'origine de kératites chez les sujets porteurs de lentilles de contact (Pankhurst *et al.*, 1998). En effet une poursuite judiciaire a été lancée contre un dentiste pour une infection oculaire grave possiblement liée à l'eau de la turbine a été publiée par Barbeau, (2007b).

5.2 Risques pour l'équipe dentaire

Le personnel dentaire est continuellement exposé aux microorganismes d'origine hydrique (Barbeau, 2000). Il est vraisemblable qu'une partie de ces microorganismes en exil, expulsée violemment à travers la turbine, la seringue air-eau ou le détartreur sera aérosolisée en même temps que les bactéries buccales du patient. A ce sujet Dutil *et al.*, (2007) ont montré qu'une nuée invisible pouvant atteindre 200 êtres microscopiques par litre d'air se forme dans une

zone localisée à environ 1 mètre autour de la tête du patient. Désespérément à la recherche d'un nouvel habitat auquel s'accrocher, ou d'une nouvelle niche à coloniser, ces microorganismes se lanceraient à l'assaut de nos voies respiratoires si le masque n'y faisait écran. Nos poumons, qui se gonflent de 0,5 L d'air à chaque inspiration, soit jusqu'à 225 Litres en 30 minutes, pourraient théoriquement se voir bombarder d'environ 70 000 bactéries aéroportées lors d'un traitement d'une demi-heure. Bien que les mécanismes de défense des voies respiratoires supérieures parviennent à éliminer la grande majorité des aérosols, les petits aérosols (< 5 µm) peuvent plus facilement atteindre l'arbre respiratoire. En fonction de leur nature, de leur concentration et de leur diamètre aérodynamique [(**Araujo et Andreana, 2002**);(**Harrel, 2004**)]. L'exposition à ces bioaérosols et aux toxines qu'ils véhiculent, pourrait sensibiliser les poumons et représenter des risques pour la santé d'individus susceptibles (**De paola et al., 2002**).

Matériel et méthodes

1. Lieu d'étude

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire au biomédical et à l'environnement (LAMAABE) de l'Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen.

2. Prélèvements

De Février 2011 à Mars 2012 et après un consentement du médecin chef de la clinique dentaire et la collaboration du technicien responsable, nous avons pu retirer des tubulures d'eau accordées aux fauteuils de l'unité dentaire CHU de Tlemcen, que nous avons placé tout de suite dans des flacons en verre stérile et transporté immédiatement au laboratoire pour être tout de suite analysés.

Parallèlement avant leur retraits et afin d'évaluer la qualité microbiologique de l'eau qui circule dans ces tubulures, des échantillons d'eau « sans purge » d'une quantité de 200 mL ont été recueillies des pistolets air-eau de différent fauteuils dentaires (**Figure 6**) mis dans des flacons stériles et transportés dans une glacière au laboratoire (L.A.M.A.A.B.E) pour être analyser.

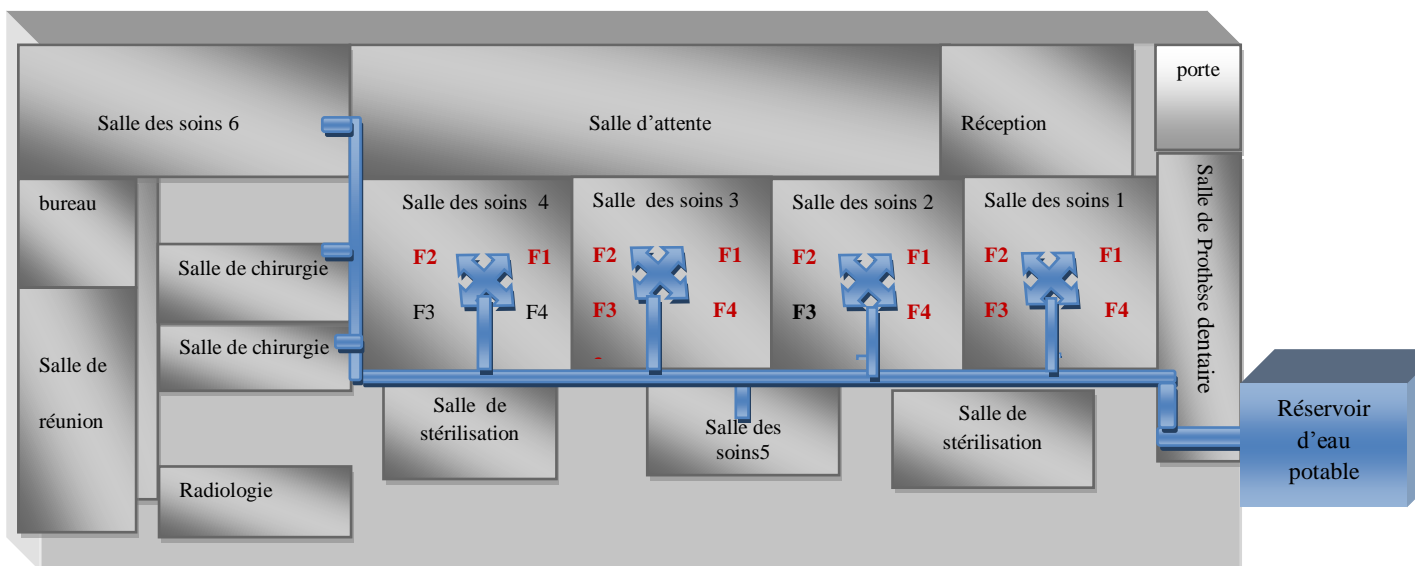


Figure 6: Schéma représentant la disposition des fauteuils et le circuit d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen (Schéma personnel).

F : fauteuil dentaire

F en rouge : les sites des prélèvements d'eau et des tubulures.

3. Qualité microbiologique de l'eau des tubulures (méthode de filtration)

100mL de chaque échantillon d'eau recueilli ont été filtrés sur une membrane stérile d'acétate de cellulose 0,22µm Millipore (Molsheim France), cette dernière est ensuite déposée sur une gélose nutritive puis incubée pendant 24 heures à 37°C pour le dénombrement de la flore totale (Rodier, 2009).

4. Préparation des échantillons des tubulures

Après une désinfection de la surface externe de chaque tubulure (longueur de 2m et d'un diamètre de 2mm) avec l'eau de Javel et un rinçage avec l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace résiduelle du désinfectant. Chaque tubulure était ensuite sectionnée délicatement à l'aide d'un bistouri en 3 parties (échantillons) dans les conditions stérile (Figure 7).

- Un 1^{ier} échantillon constitué des 10 premiers centimètres de la partie de la tubulure connectée aux circuits d'eau du fauteuil dentaire.
- Un 2^{ème} échantillon constitué des 10 centimètres du milieu de la tubulure.
- Un 3^{ème} échantillon constitué des 10 derniers centimètres de la partie de la tubulure connectée aux pièces à main.

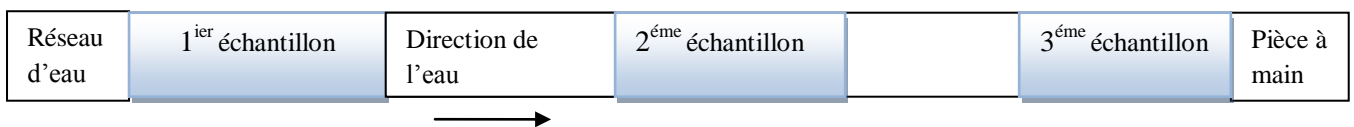


Figure 7: Description de l'échantillonnage.

5. Ensemencement et isolement des souches

Chacune des 3 parties sélectionnées de chaque tubulure est immergée dans un tube contenant 10 mL d'eau physiologique stérile. Celui-ci est brièvement soumis à des ultrasons de basse fréquence et de faible intensité afin de détacher les microorganismes sans que leurs structures cellulaires ne soient détruites (Calligaris-Maibach, 2011). A partir du liquide de sonication un volume de 20µL a été ensemencé sur un milieu Chapman pour l'isolement des cocci à Gram positif (CGP) et sur milieu Mac Conkey pour l'isolement des bacilles Gram négatif (BGN). Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

6. Purification et identifications des souches

La purification des bactéries est réalisée par l'ensemencement d'une seule colonie sur une autre boîte de milieu gélosé jusqu'à l'obtention de souches pures qui seront identifiées par :

- l'étude des caractères macroscopiques (l'aspect des colonies sur milieux gélosés).
- l'étude des caractères microscopiques (forme des colonies, coloration de Gram).
- Test de la catalase, et coagulase pour l'identification des staphylocoques.
- L'étude des caractères biochimique (Api Staph et Api 20E).

7. Détection de la formation du biofilm

Vu la diversité bactérienne retrouvée dans les tubulures d'eau des fauteuils dentaire, seules les souches de staphylocoques seront retenues pour la suite de notre étude.

7.1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)

La détermination quantitative de la formation de biofilm dans les microplaques à 96 puits a été réalisée selon les recommandations de **Christensen *et al.*, (1985)**. Les bactéries ont été cultivées en milieu BHIB et incubées 24h à 37°C. Chaque culture jeune est ajustée pour l'obtention de 10^8 UFC/mL et diluée au $1/100^{\text{ème}}$ dans le même milieu (BHIB). Chaque puits de la plaque contient 150 μ L du milieu BHIB supplémenté de 2% de saccharose ensuite rempli avec 20 μ L de cette dilution. Les microplaques sont recouvertes, scellées stérilement et incubées pendant 24h à 37°C.

Après incubation, les puits des microplaques sont vidés, rincés 3 fois avec de 200 μ L d'eau distillée, séchées en position inversée et colorées avec 200 μ L de cristal violet à 0,5%. Après 30min d'incubation, l'excès du cristal violet est éliminé par 5 lavages successifs avec 200 μ L d'eau distillée stérile. Le colorant incorporé par les cellules ayant adhéré ou ayant formé un biofilm est solubilisé avec 200 μ L d'éthanol à 95% . La quantité de cristal violet solubilisé est mesurée par la lecture de la DO à 570nm dans un lecteur ELISA AutoReader. Les souches ont été classées selon les valeurs de la DO (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification de l'adhésion des *Staphylocoque spp* selon **Mathur et al., (2006)**.

Valeur DO	Formation de biofilm
<0,120	Faible
0,120-0,240	Modéré
>0,240	Forte

7.2. La méthode du Rouge Congo Agar (RCA)

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats staphylococciques sur le milieu RCA. Cette technique proposée par **Freeman et al., (1989)** requiert l'utilisation d'un milieu solide préparé d'un bouillon cœur cervelle (BHIB) additionné de 5% de saccharose et de rouge Congo.

Le milieu est composé de BHIB (37 g/L) de saccharose (50 g/L) d'agar agar (10 g/L) et de rouge Congo (0,8 g/L).

Le rouge Congo a été préparé séparément en solution aqueuse concentrée et autoclavée à 121°C pendant 15 minutes. Cette solution est ajoutée ensuite aux autres constituants du milieu (en surfusion à 55°C).

Le milieu ainsi préparé est ensuiteensemencé avec une anse d'une suspension de la souche bactérienne et incubé à 37°C pendant 24 heures.

Le rouge Congo interagit directement avec certains polysaccharides bactériens formant un slime et donnant des colonies noires sur milieu CRA contrairement aux colonies non productrices qui restent rouge (**Nasr et al., 2012**).

8. Recherche des caractères de virulence des souches de Staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire

Les techniques moléculaires ont été réalisées au niveau du laboratoire de bactériologie moléculaire de l'institut pasteur de Casablanca (Maroc).

8.1. Détection du pouvoir d'adhésion

8.1.1. Extraction d'ADN bactérien

L'extraction de l'ADN bactérien a été faite par la technique de choc thermique. A partir d'une culture fraîche de 18 à 24 heures à 37°C sur gélose ordinaire, quelques colonies sont mises en suspension dans 500 µL d'eau ultra-pure et portées à l'ébullition (100°C)

pendant 10 min puis transférées directement dans la glace (0°C) pendant 5 min. 300µL du surnageant sont ensuite récupéré après une centrifugation de 14500trs/min pendant 10 min. Celui ci contenant l'ADN a été conservé à -20 °C.

Après extraction de l'ADN, les réactions de PCR ont été réalisées avec les amorces sens et antisens reprises dans le **tableau 2**. Chaque réaction de PCR en fonction du gène recherché est donnée dans le **tableau 3**.

Tableau 2 : Les amorces utilisées pour la détection des gènes *ica* chez les souches de staphylocoque

Gènes	Amorces	Fragment
<i>icaA</i>	S,5'- TCTCTTGCAGGAGCAATCAA AS: 5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA	188 bp
<i>icaB</i>	S: 5'-ATGGCTTAAAGCACACGACGC AS: 5'-TATCGGCATCTGGTGTGACAG	526 bp
<i>icaC</i>	S:5'-ATAAACTTGAATTAGTGTATT AS:5'-ATATATAAACTCTCTTAACA	989 bp
<i>icaD</i>	S:5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG AS :5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198 bp

S: sens; AS: antisens; pb: paire de base.

Tableau 3: Mélanges réactionnels pour la recherche des gènes *icaA*, *icaD*, *icaB*, *icaC*.

Gènes recherchés	Mélanges réactionnels	volume final
<i>icaA</i>	13,8 µL d'eau ultra pure 2,5 µL de Tampon 10X 1,25 µL de MgCl ₂ 50mM 0,25 µL de dNTP 10mM 2,5 µL d'amorce sens et anti sens 20mM 0,2 µL d'enzyme (Taq) 5u/ µL 2 µl d'ADN bactérien	25 µL
<i>icaD</i>	13,8 µl d'eau ultra pure 2,5 µl de Tampon 10X 1,25 µl de MgCl ₂ 50mM 0,25 µL de dNTP 10mM 2,5 µL d'amorce sens et anti sens 20mM 0,2 µL d'enzyme (Taq) 5u/ µL 2 µl d'ADN bactérien	25µL
<i>icaB</i>	16,05 µL d'eau ultra pure 2,5 µL de Tampon 10X 1,5 µL de MgCl ₂ 50mM 0,25 µL de dNTP 10mM 1,25 µL d'amorce sens et anti sens 20mM 0,2 µL d'enzyme (Taq) 5u/ µL 2 µl d'ADN bactérien	25µL
<i>icaC</i>	16,05 µL d'eau ultra pure 2,5 µL de Tampon 10X 1,5 µL de MgCl ₂ 50mM 0,25 µL de dNTP 10mM 1,25 µL d'amorce sens et anti sens 20mM 0,2 µL d'enzyme (Taq) 5u/ µL . 2 µl d'ADN bactérien.	25µL

Les séquences ont été amplifiées dans un thermocycler (Applied Biosystems de system2700 PCR) en utilisant le programme établi (**Tableau 4**), 10 µL des produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (**Paluch-Oles et al., 2011**).

Tableau 4 : Conditions d'amplification des gènes *icaA*, *icaB*, *icaC*, *icaD*.

		<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>
Dénaturation	Temps	30s	60s	60s	30s
	Température	94°C	94°C	94°C	94°C
Hybridation	Temps	30s	60s	60s	30s
	Température	55.5°C	59°C	59°C	55.5°C
Elongation	Temps	30s	2.5min	2.5min	30s
	Température	72°C	72°C	72°C	72°C
Nombre de cycles		30	30	30	30

8.2. Pouvoir toxigène

8.2.1 Gènes toxiques recherchés

Les gènes des entérotoxines staphylococciques (SE) A, B, C, D, H et R (sea, seb, sec, sed, seh, et selr), des entérotoxines staphylococciques like (SIE) K, L, M, O, P, et Q (selk, sell, selm, selo, selp et selq), de la toxine TSST-1 (tst), des toxines inhibitrices de la différenciation des cellules épidermiques (EDIN) (edin ABC), des exfoliatines ou épidermolysines A, B et C (eta, atb et etd), des leucotoxine M et de Panton-Valentine (lukM et lukPV) et de l'hémolysine bêta (hly) ont été recherchés par des PCR multiplex.

La détermination du profil des gènes toxiques des souches de *Staphylocoque spp* a été effectuée suite à six réactions de PCR multiplex (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Les gènes toxiques recherchés.

N°multiplex PCR	Genes recherchés	Témoin positif	Volume Final
Multiplex PCR n°1	<i>lukM/seh/selm/ tst</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés	40 µL
Multiplex PCR n°2	<i>etb/sed/selr/sec/eta</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés	50 µL
Multiplex PCR n°3	<i>sea/lukPV/hlb/ selp</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés	50 µL
Multiplex PCR n°4	<i>seb/etvI/selq</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés	50 µL
Multiplex PCR n°5	<i>etd/sell/selo</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés	40 µL
Multiplex PCR n°6	<i>edinAC/edinB/ selk</i>	ADN des souches de <i>S. aureus</i> du laboratoire de bactériologie positives pour les gènes recherchés.	40 µL

8.2.2. Mélanges réactionnels pour les différentes PCR multiplex

Le mélange d'amplification est spécifique pour chacune des six PCR multiplex. La concentration des différents constituants était variable d'une PCR à l'autre :

Pour les PCR multiplex N°1, N°5 et N°6, les mélanges réactionnels ont été réalisés dans un volume final de 40 µL. Mais en concentration finale les réactifs nécessaires étaient différents :

- 17,1 µL d'eau ultra pure, 4 µL de tampon, 4 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 4 gènes recherchés, 0,4 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°1.

-17,2 µL d'eau ultra pure, 8 µL de tampon, 3 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 3 gènes recherchés, 0,3 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°5.

-16,1 µL d'eau ultra pure, 8 µL de tampon, 4 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 3 gènes recherchés, 0,4 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°6.

Alors que pour les PCR N°2, N°3 et N°4, les mélanges réactionnels ont été réalisés dans un volume final de 50 µL. Mais en concentration finale, les différents réactifs étaient différents :

- 21,97 µL d'eau ultra pure, 5 µL de tampon, 5 µL de MgCl₂, 0,85 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 5 gènes recherchés, 0,4 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°2.

- 21,1 µL d'eau ultra pure, 10 µL de tampon, 4 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 4 gènes recherchés, 0,4 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°3.

-25,1 µL d'eau ultra pure, 10 µL de tampon, 3 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1,5 µL de chaque amorce sens et anti sens pour les 3 gènes recherchés, 0,4 µL d'enzyme (Taq) et 2 µL d'ADN bactérien extrait par choc thermique, pour la PCR multiplex N°4.

8.2.3. Les amorces utilisées pour les différentes PCR multiplex

Les amorces utilisées ont été déjà décrites par **Holtfreter et al., (2007)**. Elles sont également utilisées par le centre national de référence (CNR) de Lyon en France.

Les tableaux 6 à 11 montrent respectivement les amorces utilisées dans les PCR MTX1, PCR MTX2, PCR MTX3, PCR MTX4, PCR MTX5 et la PCR MTX6. Le nom des gènes et les toxines recherchées ainsi que la taille des amplifiants sont aussi indiqués.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour la détection des gènes *lukM*, *seh*, *selm* et *tst* dans la PCR MTX N°1.

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
LukM	<i>lukM</i>	luk-M 1	TGGATGTTACCTATGCAACCTAC	23n	780
		luk-M2	GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	27n	
SEH	<i>seh</i>	seh 1	CAATCACATCATATGCGAAAGCAG	24n	376
		seh 2	CATCTACCCAAACATTAGGACC	22n	
SEIM	<i>selm</i>	selm1	CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC	27n	300
		selm 2	TTCAGTTTCGACAGTTTTGTGTCAT	26n	
TSST -1	<i>tst</i>	tst 1	TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT	30n	180
		tst2	TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	30n	

Tableau 7 : Amorces utilisées pour la détection des gènes *etb*, *sed*, *ser*, *sec*, *eta* dans la PCR MTX N°2.

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
ETB	<i>etb</i>	etb-1	CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC	23n	612
		etb-2	AGTGAACCTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	31n	
SED	<i>sed</i>	sed-1	GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG	30n	492
		sed-2	GCTGTATTTTTCTCCGAGAGT	22n	
SER	<i>ser</i>	ser-1	AGCGGTAATAGCAGAAAATG	20n	363
		ser-2	TCTTGTACCGTAACCGTTTT	20n	
SEC	<i>sec</i>	sec1	CTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACATG	30n	275
		sec-2	CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	26n	
ETA	<i>eta</i>	eta-1	ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT	23n	190
		eta-2	TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTTCATCAAC	30n	

Tableau 8 : Amorces utilisées pour la détection des gènes *sea*, *luk SV-PV*, *hlb*, *selp* dans la PCR MTX N°3.

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
SEA	<i>sea</i>	sea-1	GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA	26n	560
		sea-2	CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTT	28n	
PVL	<i>lukSV-PV</i>	pvl-1	ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA	31n	433
		pvl-2	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAGC	27n	
HLB	<i>hlb</i>	hlb-1	GTGCACTTACTGACAATAGTGC	22n	309
		hlb-2	GTTGATGAGTAGCTACCTCAGT	23n	
SELP	<i>selp</i>	selp-1	GAATTGCAGGGAAGTCTGCT	18n	182
		selp-2	GGCGGTGTCTTTTGAAC	17n	

Tableau 9 : Amorces utilisées pour la détection des gènes *seb*, *selq* dans la PCR MTX N°4.

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
SEB	<i>seb</i>	seb-1	ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA	27n	404
		seb-2	ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	21n	
SEIQ	<i>selq</i>	selq-1	ACCTGAAAAGCTTCAAGGA	19n	204
		selq-2	CGCCAACGTAATTCCAC	17n	

Tableau 10 : Amorces utilisées pour la détection des gènes *etd*, *sell*, *selo* dans la PCR MTX N°5.

Toxines	Gènes	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
ETD	<i>etd</i>	etd-1	CAAACATATCATGTATCAAGGATGG	24n	358
		etd-2	CCAGAATTTCCCGACTCAG	19n	
SEIL	<i>sell</i>	sell-1	GCGATGTGTAGGTCCAGGAAAC	20n	235
		sell-2	CATATATAGTACGAGAGTTAGAACCATA	28n	
SEIO	<i>selo</i>	selo-1	AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA	26n	180
		selo-2	ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC	31n	

Tableau 11: Amorces utilisées pour la détection des gènes *edinB*, *edinAC* et *selk* dans la PCR MTX N°6.

Toxine	Gène	Nom amorce	Séquence (5' → 3')	Taille amorce	Taille fragment (pb)
EDIN	<i>edinB</i>	edinB-1	GACTTAGTTGAAGCTACTAAATGGGG	26n	560
		edinB-2	CAGCATATTCTGTCCCTCTAGG	22n	
	<i>edinA/C</i>	edinA/B-1	GATTAGATGAGGCAACTAAATGGGG	28n	
		edinA/B-2	CAGCGTATTCTGTGCCTCTAGG	22n	
SEIK	<i>selk</i>	selk1	ATGCCAGCGCTCAAGGC	17n	134
		selk-2	AGATTCATTTGAAAATTGTAGTTGATTAGCT	31n	

Pour chaque réaction de PCR multiplex, l'ADN des souches de contrôle est inclus comme témoin positif. Pour les témoins négatifs, l'ADN est remplacé par l'eau ultra pure.

8.2.4. Programme d'amplification des différentes PCR multiplex

Le programme de PCR était le même pour les six PCR multiplex. Les conditions d'amplification sont résumées dans le **tableau 12**.

Tableau 12: Condition d'amplification des gènes toxiques chez les souches de staphylocoques.

N° PCR multiplex	Nombre de cycle	Température en °C	Durée
PCR MTX1 PCRMTX2 PCRMTX3 PCRMTX4 PCRMTX5 PCRMTX6	1	94	5min
	25	94	30sec
		55	30sec
		72	1min
	1	72	10min

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% avec du bromure d'éthidium (0,5µg/ml). Le voltage de la migration était de 120V/45min. Les photos des gels ont été prises sous UV par l'appareil (Gel Doc).

9. Essai d'étude de la contamination croisée *in vitro* lors des soins dentaires

L'aérosol produit lors de l'utilisation d'instruments rotatifs est susceptible de transmettre au personnel soignant et aux différents patients diverses infections bactériennes ou virales. Il nous a semblé important de vérifier cette hypothèse et de voir si une contamination croisée entre patient - patient était possible par l'intermédiaire des tubulures d'eau. A cet effet un protocole expérimental a été mis au point en collaboration avec un dentiste du centre hospitalier universitaire de Tlemcen.

Pour des raisons de sécurité et de faisabilité, la cavité buccale du patient est remplacée par une cavité buccale de mouton, ce choix est justifié par le fait que cette cavité buccale de substitution présente des similitudes structurales avec celle de l'homme (**Djeribi et Zaghez, 2004**).

9.1. Choix de la souche bactérienne

Nous rappelons que seules les souches de staphylocoques ont été retenues tout le long de cette étude, et pour cette expérience notre choix s'est porté sur l'espèce *Staphylococcus warneri*.

9.2. Préparation du matériel utilisé

La première étape de cette expérience était non seulement de remplacer la tubulure d'eau existante dans le fauteuil choisi par une autre neuve et stérile de même type (PVC) et référence (23474) (**Figure 8**), mais également de faire circuler l'eau distillée stérile dans la tubulure et de s'assurer de la stérilisation de tous les instruments dentaires qui seront utilisés lors de cette expérience.



Figure 8: Emplacement d'une tubulure neuve.

9.3. Préparation et désinfection de la cavité buccale du mouton

Après un lavage abondant à l'eau distillée stérile, une désinfection de la cavité buccale du mouton a été réalisée à l'aide d'une solution antiseptique commerciale (Bétadine) dans le but de neutraliser la microflore buccale naturelle de l'animal. Après un temps de contact avec l'agent chimique (2 à 3 min), une série de rinçage des mâchoires à l'eau distillée stérile a été réalisée afin d'éliminer toute trace du désinfectant (**Figure 9**). Cette étape est suivie par un contrôle microbien de la cavité buccale par un écouvillonnage de toute la mâchoire du mouton et d'un ensemencement sur gélose nutritive et sur gélose Chapman afin de s'assurer de la neutralisation de la cavité buccale (**Djeribi et Zaghez, 2004**).



Figure 9: Neutralisation microflore buccale et rinçage du désinfectant (bétadine).

9.4. La contamination artificielle de la cavité buccale

La contamination des différents composants tissulaires et dentaires de la cavité buccale de l'animal (gencives, dents et muqueuses) a été réalisée à l'aide d'un écouvillon inhibé par une suspension bactérienne de *Staphylococcus warneri* à une densité optique de 0,08 lue à 570nm (**Figure 10**).



Figure 10 : Contamination de la cavité buccale du 1^{ier} mouton (considéré comme 1^{ier} patient).

9.5. Réalisation des soins dentaire

Pour la réalisation de cette expérimentation, il a été demandé au praticien dentiste de stimuler dans les conditions identiques à celles réalisées en pratique courante sur des patients des soins sur la dentition de l'animal, par l'utilisation d'une turbine stérile équipée d'un dispositif de refroidissement à eau (**Figure 11**).



Figure 11 : Soins dentaires au niveau de la cavité buccale du 1^{ier} mouton (considéré comme 1^{ier} patient).

9.6. Préparation, désinfection et réalisation des soins dentaires au niveau de la cavité buccale du 2^{ème} mouton

Après la réalisation des soins par le dentiste et après stérilisation de la turbine utilisée par le praticien pour des soins du 1^{ier} mouton considéré dans notre essai comme un premier patient. Une autre cavité buccale d'un autre mouton considérée comme un 2^{ème} patient a été préparée de la même manière (désinfection, rinçage, contrôle microbien).

Des soins dentaires sont alors réalisés par le même praticien sur toute sa dentition en utilisant la turbine stérile connectée à la même tubulure d'eau utilisée par le premier patient (**Figure12**).



Figure 12: Neutralisation de la microflore buccale du 2^{ème} mouton, rinçage du désinfectant et réalisation des soins dentaires (considéré comme 2^{ème} patient).

9.7. Analyse microbiologique de la cavité buccale du 2^{ème} mouton et de la tubulure d'eau utilisée

A la fin des soins chez le 2^{ème} patient, un prélèvement a été effectué au niveau de sa cavité buccale par la technique d'écouvillonnage à partir des différents composants tissulaires et dentaires de la mâchoire du mouton (gencives, dents et muqueuses)(**Figure 13**). Puis acheminé au laboratoire pour être incubés 48 heures à 37C° sur milieu Chapman.

De même la tubulure est retirée par le technicien de l'unité dentaire et placée immédiatement dans un flacon en verre stérile puis acheminée au laboratoire pour être analysée (**Figure14**).



Figure 13 : Analyse de la cavité buccale du 2^{ème} mouton (2^{ème} patient).



Figure 14 : Récupération et analyse de la tubulure d'eau.

Résultats et discussion

La clinique dentaire de Tlemcen représente l'unique établissement hospitalo-universitaire de la wilaya, elle est composée de 6 salles de soins dentaires, dont 4 sont destinées aux soins des patients et à la formation médicale dentaire, 2 salles de chirurgie dentaire, 2 salles pour le personnel, 2 salles pour la stérilisation du matériel et une salle destinée aux prothèses dentaires. Cette clinique dentaire est ouverte de 8 à 16 heures (5 jours sur 7), elle est composée de 21 fauteuils dentaires accueillant environ 60 patients par jour (les données du service). L'unité dentaire est alimentée en eau municipale qui une fois collectée dans un réservoir passe directement dans les fauteuils dentaire.

1. Prélèvements

De Février 2011 à Mars 2012, des échantillons d'eau d'un volume de 200 mL ont été récupérés directement des pistolets air/eau de 13 fauteuils dentaires situés dans les 4 salles de soins. De ces mêmes fauteuils et avec la collaboration et la disponibilité du technicien responsable, 13 tubulures d'eau (branchées aux pièces à main) nous ont été retirées pour analyse microbiologique. Nous faisons remarqué que le retrait des tubulures d'eau était un acte très contraignant pour le technicien vu que celles-ci n'ont jamais étaient changées depuis leurs installations en 2008 (**Tableau 13**).

Tableau 13: Prélèvements effectués (eau et tubulures)- unité dentaire CHU Tlemcen.

Tubulures liées aux pièces à main	Echantillons d'eau (mL)	Salles des soins/fauteuil dentaire	Année d'installation des tubulures	Date des prélèvements eau et tubulures
T1	200	1 ^{ère} salle/ 2 ^{ème} fauteuil	2008	08/02/2011
T2	200	3 ^{ème} salle/2 ^{ème} fauteuil	2008	23/02/2011
T3	200	1 ^{ère} salle/ 4 ^{ème} fauteuil	2008	02/03/2011
T4	200	2 ^{ème} salle/ 1 ^{ier} fauteuil	2008	14/03/2011
T5	200	1 ^{ère} salle/3 ^{ème} fauteuil	2008	28/03/2011
T6	200	3 ^{ème} salle/4 ^{ème} fauteuil	2008	06/04/2011
T7	200	1 ^{ère} salle/1 ^{ier} fauteuil	2008	25/04/2011
T8	200	2 ^{ème} salle/2 ^{ème} fauteuil	2008	25/05/2011
T9	200	4 ^{ème} salle/2 ^{ème} fauteuil	2008	15/11/2011
T10	200	3 ^{ème} salle/3 ^{ème} fauteuil	2008	07/12/2011
T11	200	4 ^{ème} salle/1 ^{ier} fauteuil	2008	25/01/2012
T12	200	2 ^{ème} salle/ 4 ^{ème} fauteuil	2008	22/02/2012
T13	200	3 ^{ème} salle/1 ^{ier} fauteuil	2008	25/03/2012

2. Dénombrement de la flore totale des échantillons d'eau des fauteuils dentaires

La technique de filtration des 13 échantillons d'eau récupérés directement et sans purge des pistolets air/eau nous a permis de constater que la concentration bactérienne de tous ces échantillons variait entre $3,15.10^2$ à $6,5.10^7$ UFC/mL, voire indénombrable dans certains fauteuils (tubulure 6, 10 et 12) (**Tableau 14**).

Tableau 14: Les résultats de dénombrement de la flore totale de l'eau des fauteuils dentaires.

Eau des tubulures	Dénombrement de la flore totale (UFC/mL)
Tubulure N°1	4,2.10 ³
Tubulure N°2	5,2.10 ⁶
Tubulure N°3	3,4.10 ⁴
Tubulure N°4	3,2.10 ⁷
Tubulure N°5	6,3.10 ⁶
Tubulure N°6	Indénombrable
Tubulure N°7	2,7.10 ⁴
Tubulure N°8	3,15.10 ²
Tubulure N°9	6,5.10 ⁴
Tubulure N°10	Indénombrable
Tubulure N°11	6,5.10 ⁷
Tubulure N°12	Indénombrable
Tubulure N°13	5,7.10 ⁷

Comparativement à la concentration bactérienne de l'eau potable qui doit être maintenue à moins de 500 UFC/mL [(Geldreich, 1996);(Barbeau, 2000)], nos taux sont largement supérieurs.

Dans son étude **Barbeau *et al.*, (1996)** ont montré que la concentration bactérienne dans l'eau des unités dentaires variait entre 1 000 et 1 million d'UFC/mL, alors que dans les études de **Pankhurst *et al.*, (1998)** et **Walker *et al.*, (2000)**, celle ci variait de 10⁴ à 10⁸ UFC/mL. Selon ces mêmes auteurs des numérations bactériennes totales supérieures à 500 UFC/mL peuvent masquer la présence de certains agents pathogènes dans un échantillon d'eau dentaire.

Dans ce sens en 1999, l'American Dental Association (ADA) a proposé que l'eau en provenance des unités dentaires ait une concentration bactérienne inférieure à 200 UFC/mL, norme que les pays de l'union européenne souhaitent adopter (**Walker *et al.*, 2004**).

Nos résultats (**Tableau 14**) montrent bien que l'eau qui circule dans les tubulures des pièces à main dentaires est de très mauvaise qualité bactériologique vu qu'elle ne respecte pas les normes de l'eau potable et sa numération microbienne est de loin supérieure.

Effectivement nous avons remarqué lors de cette étude que tous les fauteuils de la clinique dentaire de Tlemcen étaient liés directement à des conduites d'eau provenant des réservoirs sans aucune filtration ou contrôle bactériologique préalable et ne présentaient aucune sorte de sécurité tels les clapets, ce qui pourrait expliquer et confirmer les dénombrements alarmants retrouvés dans l'eau qui circule dans les tubulures des pièces à main.

A ce sujet les explications que donnent **Donlan et Costerton (2002)**, **Georges et Rozenzweig (2006)** dans leurs études peuvent être sûrement les causes plausibles : telle une stagnation prolongée dans les conduits lors des périodes d'inutilisation des appareils (la nuit et les weekends). Effectivement cette condition favorise non seulement la prolifération bactérienne, mais de plus l'adhésion d'une flore (biofilm) qui dans ce cas n'est pas soumise à des forces de cisaillement suffisantes pour l'expulser, ceci est du essentiellement au très petit diamètre (2 mm) de la tubulure ou l'eau dû à l'écoulement laminaire est virtuellement stagnante sur les parois et en mouvement plus rapide au centre (**Figure 15**).

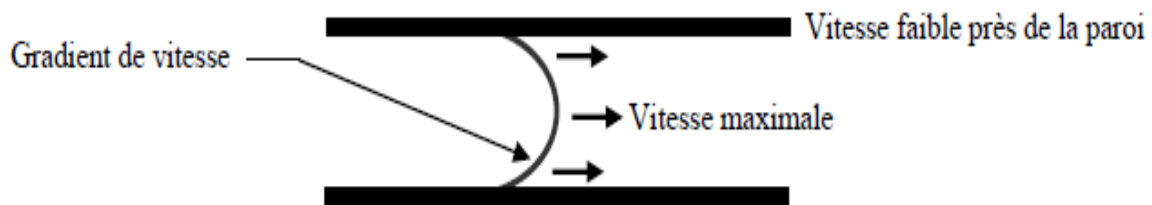


Figure 15 : Représentation schématique de la variation de vitesse du courant entre la surface et le centre de la tubulure d'eau.

De même la nature de la surface des tuyaux (PVC) et la température de l'eau dans les tubulures qui en général se situe entre 20 et 25°C (vu que les pièces à main sont presque toute la journée en marche dégageant ainsi une chaleur) sont des conditions qui favorisent amplement la multiplication bactérienne [(Mathieu *et al.*, 1998);(Donlan et Costerton, 2002)].

3-Identification bactérienne

Après une légère sonication et détachement des bactéries des parties sélectionnées des 13 tubulures dans de l'eau distillée et un ensemencement immédiat sur deux milieux sélectifs (milieu Mac Conkey et milieu de Chapman), un total de 87 souches bactériennes était isolé et identifié.

L'aspect des colonies sur milieu Mac Conkey (**Figure 16**), la coloration de Gram et la galerie biochimique API 20E nous ont permis d'identifier 56 bacilles à Gram négatif (BGN) avec des profils numériques différents (**Tableau 15**) se répartissant comme suit : 18/56 (32,14%) souches d'*Acinetobacter baumannii*, 11/56 (19,64%) de *Klebsiella pneumoniae*, 9/56 (16,07%) souches de *Pseudomonas putida*, 8/56 (14,28%) souches d' *Escherichia coli*, 7/56 (12,5%) souches d'*Enterobacter cloacae*, et 3/56 (5,35%) souches d'*Aeromonas hydrophila*.

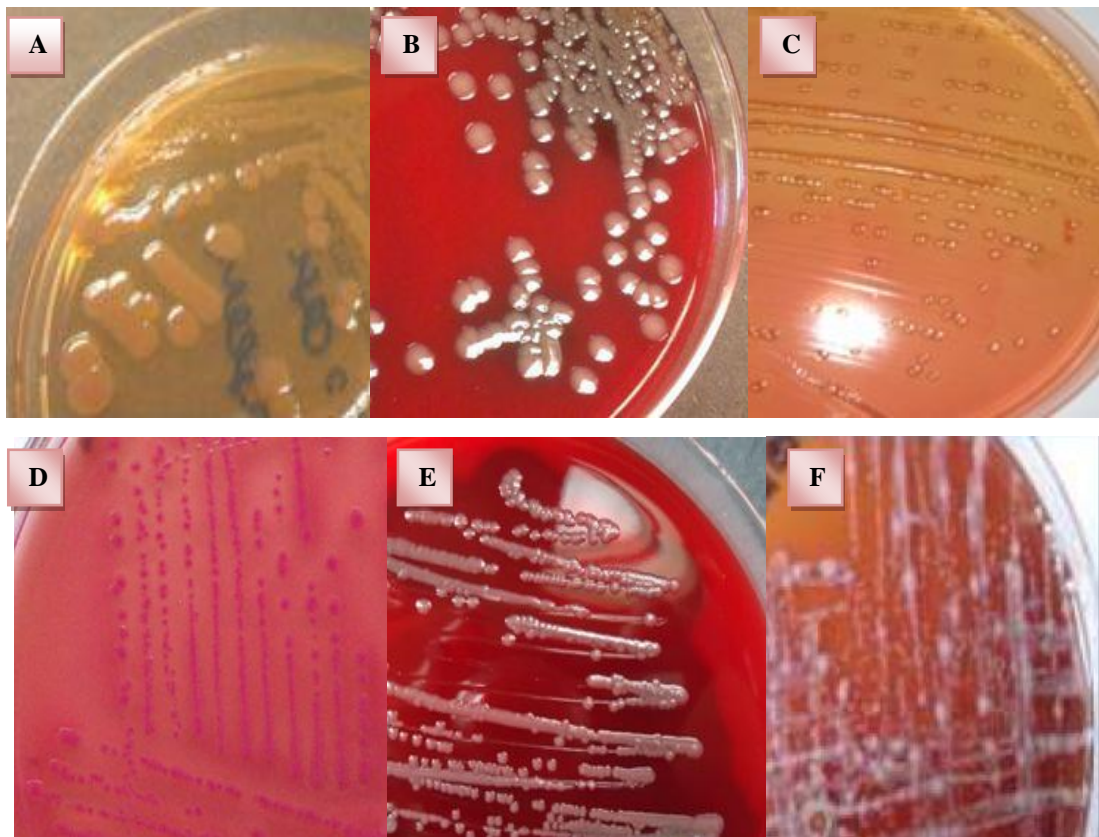


Figure 16 : Aspect des colonies sur milieu Mac Conkey.

A : *Acinetobacter baumannii*, **B** : *Klebsiella pneumoniae*, **C** : *Pseudomonas putida*,
D : *Escherichia coli*, **E** : *Enterobacter cloacae*, **F** : *Aeromonas hydrophila*.

Tableau 15 : Les différents biotypes des bacilles à Gram négatif isolés des tubulures d'eau de l'unité dentaire - CHU Tlemcen.

Souches	Nombre de souches	Biotype
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	0216053
	7	0214053
	3	0216043
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	5215773
	4	5205773
	1	5214773
<i>Pseudomonas putida</i>	5	2311200
	4	2311202
<i>Escherichia coli</i>	4	5144552
	4	5144572
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	3305573
	2	3305773
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	7054123
	1	7014123

En se basant sur l'aspect des colonies sur milieu Chapman (**Figure 17**), la coloration de Gram, la production de la catalase et surtout le test de la coagulase, 31 des 87 souches isolées de toutes les tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen, appartiennent au genre *Staphylococcus*.

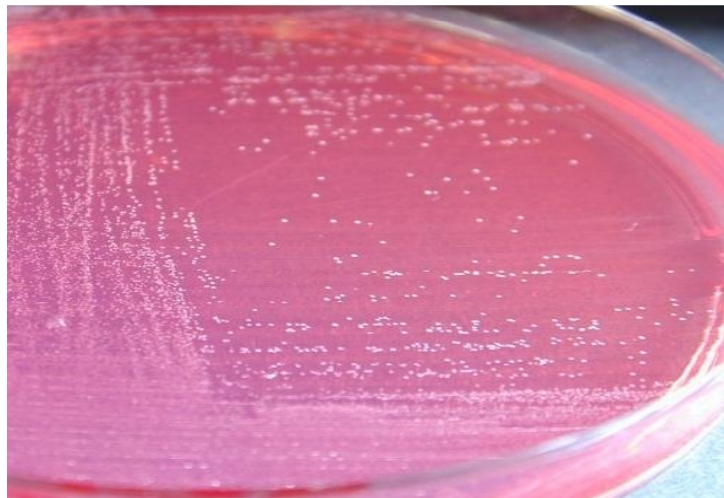


Figure 17: Aspect des Staphylocoques à coagulase négative isolés sur milieu Chapman.

L'identification par la galerie API Staph nous a permis de constater que le type le plus fréquemment isolé des tubulures d'eau est *Staphylococcus warneri* (26/31) avec prédominance du biotype 6232113 suivi par *Staphylococcus hominis* (4/31) et *Staphylococcus saprophyticus* (1/31) (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Les différents biotypes des *Staphylocoque spp* isolés des tubulures d'eau de l'unité dentaire - CHU Tlemcen.

Espèces	Nombre de souches	Biotype
<i>S.warneri</i>	10	6232113
	9	6232123
	7	6232133
<i>S.hominis</i>	2	6212153
	1	6212053
	1	6212113
<i>S.saprophyticus</i>	1	6630113

Après identification de l'ensemble des souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire du CHU Tlemcen, nous constatons que les staphylocoques occupent une place importante, suivis des souches d'*Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas putida*, les coliformes tels les *E coli* et *Enterobacter cloacae* restent moins fréquents (**Figure 18**). Plusieurs auteurs signalent que ces mêmes microorganismes étaient les plus fréquemment retrouvés dans l'eau des unités dentaires [(**Pankhurst et al., 1998**);(**Al Shorman et al., 2001**) ;(**Barbot et al., 2012**)].

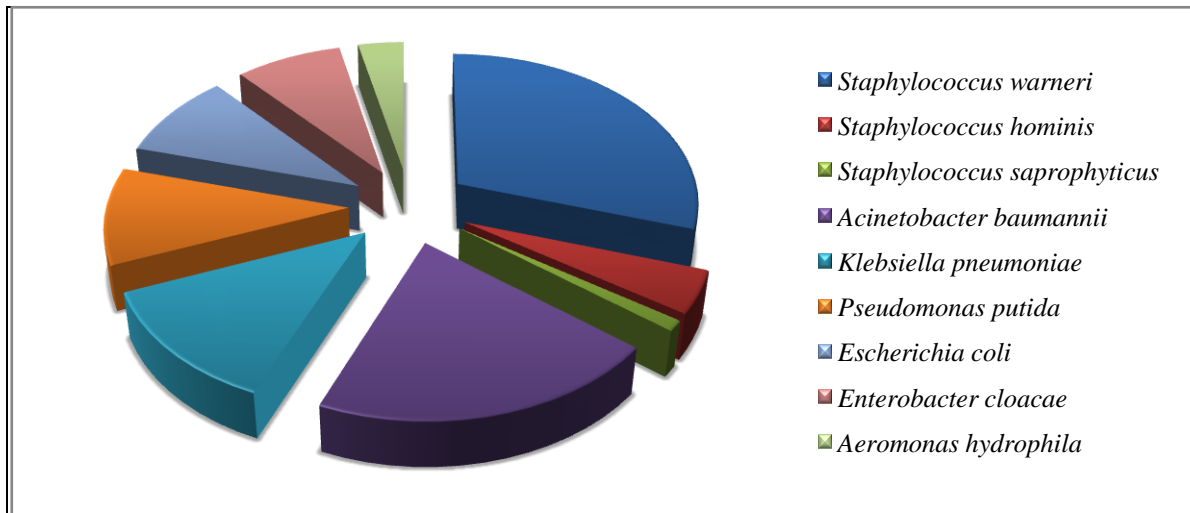


Figure 18 : Les différentes souches isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire du CHU Tlemcen.

4. Répartition des bactéries sur la longueur des tubulures d'eau

Quant à la répartition des espèces bactériennes identifiées sur les tubulures, celle-ci semble présenter des variations, selon le tableau 17 nous constatons que l'isolement des bacilles à gram négatif telle que *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Aeromonas hydrophila* était plutôt observée dans la partie de tubulure connectée et liée au circuit d'eau. Effectivement selon plusieurs auteurs tels **Miller (1996)** et **Pankhurst et al., (1998)**, ces microorganismes impliqués dans la contamination des surfaces internes des tubulures sont souvent ceux des réseaux hydriques et sont essentiellement constitués par des espèces de la famille des Pseudomonadaceae et beaucoup d'autres bacilles à Gram négatif. Toutefois *Pseudomonas putida* est une bactérie qui se trouve habituellement dans les eaux usées putrides riches en matières organiques (**Manizan et al., 2009**), sa présence dans la tubulure peut nous indiquer que l'eau dans cette partie, soit a trop stagné soit que cette bactérie a trouvé des conditions favorables comme une augmentation de la température de l'eau améliorant ainsi les caractéristiques de croissance: raccourcissement de la phase de latence; augmentation du facteur du taux de croissance et le rendement. Contrairement aux espèces *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* qui se retrouvent plutôt dans le milieu et les parties de la tubulure connectée aux pièces à main (**Tableau 17**). A ce propos **Fitzgibbon et al., (1984)** expliquent que ce genre de contamination pourrait avoir une origine environnemental et humaine vu que les deux espèces (*Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*) sont très souvent considérées comme des bactéries ubiquistes de

l'environnement naturel et hospitalier et peuvent former une partie de la flore de la peau ainsi que des flores commensales de l'homme [(**Bagley et al., 1978**);(**Towner, 2009**)].

A travers ce même tableau nous constatons que dans certaines tubulures les mêmes biotypes d'espèces de *Klebsiella pneumoniae* (T2 et T3), et d' *Acinetobacter baumannii* (T1, T2, T3, T6) ont été identifiés, ceci pourrait être la cause d'une même source de contamination dans ces tubulures.

Quant aux staphylocoques à Gram (+) souvent considérés comme flore orale [(**Martin, 1998**);(**Nagase et al., 2002**)]. On remarque qu'ils sont présents dans la partie en contact des pièces à mains de toutes les tubulures étudiées et qui traînent également le long des parois internes de la majorité des tubulures puisqu'ils se retrouvent et colonisent les 3 parties (le milieu et les 2 extrémités) de l'ensemble des tubulures des différents fauteuils. Cette présence quasi permanente des staphylocoques sur tout le long des tubulures et plus précisément du côté des pièces à mains selon **Martin (1998)**, **Pankhurst et al., (1998)** pourrait être la conséquence de la remontée de ces germes par le phénomène de réaspiration qui se produit par les instruments rotatifs et lorsque le praticien cesse de les utiliser.

Prevost et al., (1995), **Barbeau et al., (1998)**, **Walker et al., (2004)** ont montré que la flore microbienne retrouvée dans les tubulures d'eau des unités dentaire peut aussi provenir des fluides oraux des patients et qui est principalement constituée par les staphylocoques, les streptocoques et les *Candida spp.* En effet, 95% des bactéries orales seront éliminées sous forme de microgouttelettes $\leq 5\mu\text{m}$ pouvant conduire à une rétro-contamination des tubulures (**Fitzgibbon et al., 1984**).

Tableau 17:Répartition des bactéries sur la longueur des tubulures d'eau de l'unité dentaire.

Tubulures des fauteuils dentaires	1 ^{er} échantillon tubulure liée aux circuits d'eau		2 ^{ème} échantillon milieu de tubulure		3 ^{ème} échantillon tubulure liée aux pièces à main	
	CGP	BGN	CGP	BGN	CGP	BGN
T1		<i>A.hydrophila</i> 7054123 <i>E.cloacae</i> 3305573 <i>E.coli</i> 5144552		<i>A.baumannii</i> 0216053	<i>S.warneri</i> 6232123	<i>A.baumannii</i> 0216053 <i>K.pneumoniae</i> 5205773
T2	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>p.putida</i> 2311202 <i>E.coli</i> 5144572	<i>S.hominis</i> 6212153	<i>A.baumannii</i> 0214053 <i>K.pneumoniae</i> 5215773	<i>S.warneri</i> 6232133	<i>A.baumannii</i> 0214053 <i>K.pneumoniae</i> 5215773
T3		<i>E.coli</i> 5144552 <i>P.putida</i> 2311202	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>A.baumannii</i> 0216053 <i>K.pneumoniae</i> 5215773	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>A.baumannii</i> 0216053 <i>K.pneumoniae</i> 5215773
T4	<i>S.warneri</i> 6232123	<i>P.putida</i> 2311200	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>A.baumannii</i> 0216053	<i>S.warneri</i> 6232133	<i>A.baumannii</i> 0214053
T5	<i>S.saprophyticus</i> 6630113	<i>P.putida</i> 2311200 <i>E.cloacae</i> 3305573			<i>S.warneri</i> 6232133	<i>K.pneumoniae</i> 5215773
T6	<i>S.hominis</i> 6212153	<i>A.hydrophila</i> 7014123 <i>E.coli</i> 5144552	<i>S.hominis</i> 6212113	<i>A.baumannii</i> 0216053	<i>S.warneri</i> 6232123	<i>A.baumannii</i> 0216053 <i>K.pneumoniae</i> 5214773
T7		<i>E.coli</i> 5144572 <i>p.putida</i> 2311202	<i>A.baumannii</i> 0214053		<i>S.warneri</i> 6232133	<i>A.baumannii</i> 0214053
T8		<i>p.putida</i> 2311200 <i>E.coli</i> 5144572			<i>S.warneri</i> 6232123	<i>K.pneumoniae</i> 5215773 <i>A.baumannii</i> 0216043
T9		<i>p.putida</i> 2311202 <i>E.cloacae</i> 3305773	<i>S.warneri</i> 6232113		<i>S.warneri</i> 6232113	<i>A.baumannii</i> 0214053
T10	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>E.coli</i> 5144552 <i>E.cloacae</i> 3305573	<i>S.warneri</i> 6232123		<i>S.warneri</i> 6232123	<i>K.pneumoniae</i> 5205773 <i>A.baumannii</i> 0216043
T11	<i>S.warneri</i> 6232123	<i>E.cloacae</i> 3305773 <i>p.putida</i> 2311200	<i>S.warneri</i> 6232123		<i>S.warneri</i> 6232123	<i>K.pneumoniae</i> 5205773 <i>A.baumannii</i> 0216043
T12	<i>S.warneri</i> 6232113	<i>E.cloacae</i> 3305573 <i>E.coli</i> 5144572 <i>P.putida</i> 2311200	<i>S.warneri</i> 6232133		<i>S.warneri</i> 6232113	<i>A.baumannii</i> 0214053
T13	<i>S.warneri</i> 6232133	<i>E.cloacae</i> 3305573 <i>A.hydrophila</i> 7054123	<i>S.warneri</i> 6232113		<i>S.warneri</i> 6232133	<i>K.pneumoniae</i> 5205773 <i>A.baumannii</i> 0216053

Suite à cette identification, à la variété et au nombre très important des souches isolées de ces tubulures, seules les espèces de staphylocoques ont été retenues pour la suite cette étude du fait de leur dominance et présence sur tout le long des tubulures.

Dans cette deuxième partie il nous a paru intéressant de voir et comprendre par quel mécanisme ces staphylocoques se sont retrouvés tout au long des tubulures et ceci par la détermination de leur capacité à former des biofilms, par la recherche des gènes responsable de cette formation et de savoir également s'ils possèdent des pouvoirs toxiques en recherchant les gènes responsables.

5. Détection de la formation du biofilm

La surface d'adhésion des organismes sessiles peut être abiotique (les matériaux inertes) ou biotique (les tissus ou les cellules vivantes) (Dunne, 2002). Toute surface naturelle ou artificielle peut être le siège d'une colonisation bactérienne avec formation d'un biofilm. Le passage d'un mode de vie planctonique à un mode de biofilm est un processus dynamique et complexe, régulé par de nombreux facteurs exogènes et endogènes. Il est caractérisé par un changement radical de phénotype et par l'acquisition de propriétés spécifiques aux biofilms.

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilm *in vitro* ont été établies, telles que la méthode de la microplaque et la méthode de rouge congo [(Freeman *et al.*, 1989);(Mathur *et al.*, 2006)].

La technique de microplaque 96 puits (TCP) a révélé que sur les 31 souches des *Staphylocoque spp* isolées des tubulures d'eau de différents fauteuils dentaire, 16 étaient de bonnes formatrices de biofilm, 10 étaient modérées et 5 souches étaient de faible formatrices (Tableau 18, Figure 19).

Tableau 18 : Résultats de la production du biofilm chez *Staphylococcus spp* par la technique de microplaque 96 puits.

Souches de staphylocoque étudiées	TCP		
	Fort	Modérée	Faible
<i>Staphylococcus warneri</i>	15	7	4
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	3	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	0	0
Total	16	10	5

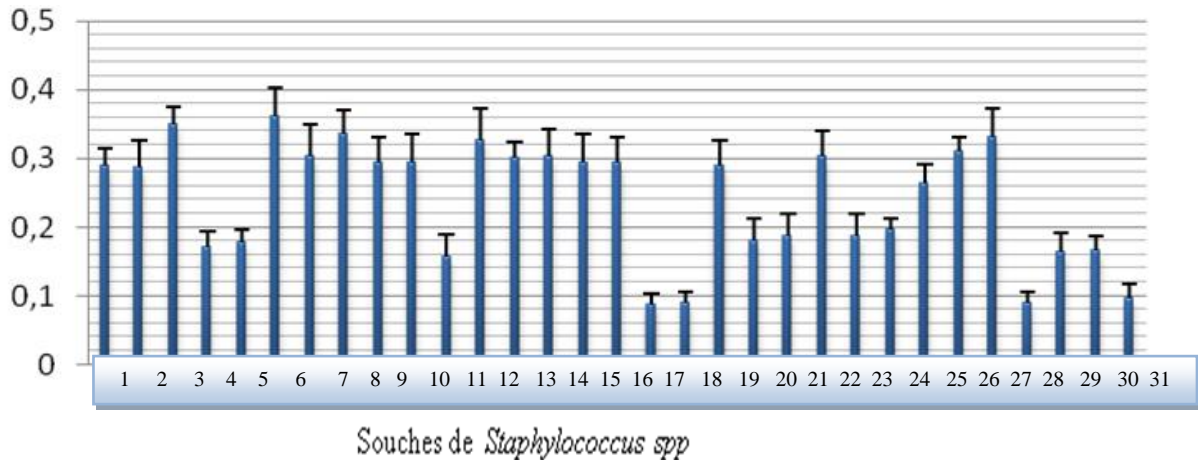


Figure 19: Formation de biofilm par la technique TCP chez les souches de staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU de Tlemcen.

La méthode du Rouge Congo Agar (CRA) considérée souvent comme quantitative, montre que seuls 20/31 isolats de staphylocoques sont producteurs d'un slime (**Figure 20**).

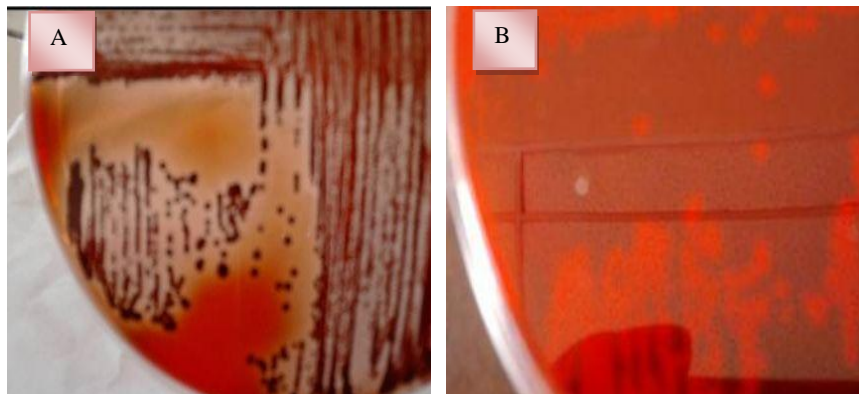


Figure 20 : La Production de slime chez les souches de staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen.

(**A** : formatrice de slime, **B** : non formatrice de slime).

La technique TCP reste très largement utilisée et considérée comme un test standard pour la détection de la formation de biofilm [(Mathur *et al*, 2006);(Gad *et al*, 2009)]. Ce procédé a été rapportée comme étant la méthode de criblage la plus sensible, précise et reproductible pour la détermination de la production de biofilm par des isolats cliniques de staphylocoques et a l'avantage d'être un outil quantitatif pour comparer l'adhésion de différentes souches [(Christensen *et al.*, 1985);(Mathur *et al.*, 2006)]. Cette technique pourra faire une

distinction précise entre les fortes productrices, moyennement productrices et les faible productrices, avec une capacité d'examiner un grand nombre d'isolats simultanément, c'est la raison de son utilisation dans notre étude.

La production de biofilm était détectée chez 26/31 des isolats par la méthode TCP et 20/31 isolats par la méthode rouge congo agar (CRA). L'étude de **Cafiso et al., (2004)** montre que tous les staphylocoques positif par la méthode CRA étaient également positifs par la méthode TCP, dans une étude de **Mathur et al., (2006)**, 8/150 souches étaient positif par la méthode CRA et (82) des isolats cliniques de staphylocoques étaient productrices de biofilm par la méthode TCP et aucune relation n'a été observée entre la méthode CRA et TCP. Ces observations sont contradictoires à celles rapportées par **Freeman et al., (1989)**.

La méthode CRA est plus facile et plus rapide à réaliser que d'autres méthodes phénotypiques mais pourrait probablement identifier que les fortes producteurs de biofilm, elle est imprécise dans l'identification des biofilms modérés (**Sharvari et Chitra, 2012**).

Mathur et al., (2006) ont conclu que cette méthode ne peut pas être recommandée pour la détection de la formation de biofilm par les isolats cliniques des Staphylocoques. Néanmoins afin de confirmer la formation de biofilm d'autres méthodes plus fiables seront utilisées telle l'analyse par PCR pour détecter le gène *ica* qui est un marqueur de biofilm (**Sharvari et Chitra, 2012**).

6. Détection des gènes *icaA, icaD, icaB, icaC*

La molécule principalement responsable de l'adhésion intercellulaire chez les staphylocoques est le PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesion), aussi appelée poly-N-acétylglucosamine (PGNA). Ce polymère forme avec les autres polymères tels que les acides teichoïques et les protéines: le slime, la matrice extracellulaire des staphylocoques formant ainsi le biofilm (**Götz, 2002**).

La biosynthèse du PIA est effectuée par les produits de gènes codés par l'opéron *icaADBC* qui comprend une N-acétylglucosamine transférase (*icaA* et *icaD*), une PIA déacétylase (*icaB*) et un exportateur potentiel du PIA (*icaC*) (**Vuong et al., 2004**). Elle s'effectue en trois étapes (**Figure 21**)

- *IcaA* ajoute à la chaîne de PIA en croissance, les résidus N-acétylglucosamine provenant d'UDP-GlcNac. La transférase *IcaA* nécessite la présence d'*IcaD* pour une pleine activité.

L'activité N-acétylglucosamine transférase conduit à l'obtention d'oligomères de N-acétylglucosamine d'environ 20 résidus.

- La chaîne de PIA en croissance est ensuite exportée à travers la membrane par le gène *IcaC* qui est aussi nécessaire à l'allongement de la chaîne;
- Après son exportation, la PIA est déacétylée par une protéine attachée à la surface *IcaB*, afin d'introduire des charges positives, cruciales pour son emplacement en surface et pour son activité biologique.

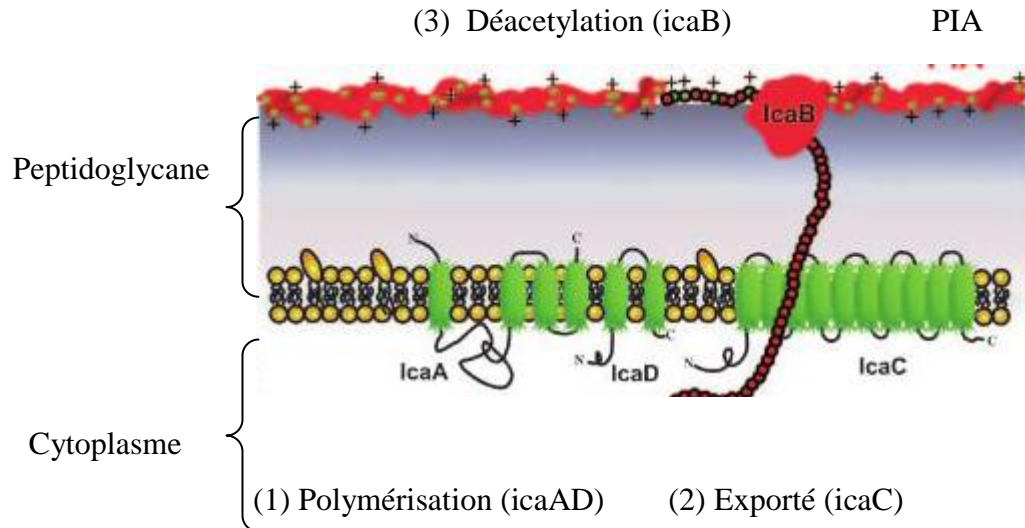


Figure 21: Biosynthèse de la PIA en 3 étapes chez *Staphylococcus spp* (Vuong *et al.*, 2004).

Les gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* et *icaC* ont été recherchés par la technique de PCR chez les 31 souches de staphylocoques isolées des tubulures d'eau de l'unité dentaire, l'opéron *ica* était détecté chez 14 (12 *S.warneri* et 2 *S.hominis*) souches, 10 parmi elles étaient positifs pour le gène *icaD*, 2 souches étaient positifs pour le gène *icaB*, une souche portait simultanément le gène *icaBD* et enfin une souche portait ensemble les gènes *icaADB*. Aucune des souches étudiées ne présentaient le gène *icaC* (Figure 22).

Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par Cafiso *et al.*, (2004), Paluch-Oles *et al.*, (2011) et Kara Terki *et al.*, (2013) qui ont révélé dans leurs études que certains isolats portaient les gènes *icaA icaD icaB icaC* ensemble contrairement à d'autres qui ne portaient qu'un seul gène.

Une étude récente a démontré que la synthèse du PIA pourrait s'accumuler en absence de *icaC*, la perte de cette protéine par mutation semble conférer un avantage de survie pour les autres gènes *icaADB* dans les conditions pauvres en éléments nutritifs par rapport à la perte de l'ensemble de l'opéron, d'autres travaux sont en cours visant à déterminer avec certitude si

les protéines *icaA*, *icaD* et *icaB* fonctionnent dans une certaine mesure, en plus de la synthèse du PIA (Brooks et Jefferson, 2014).

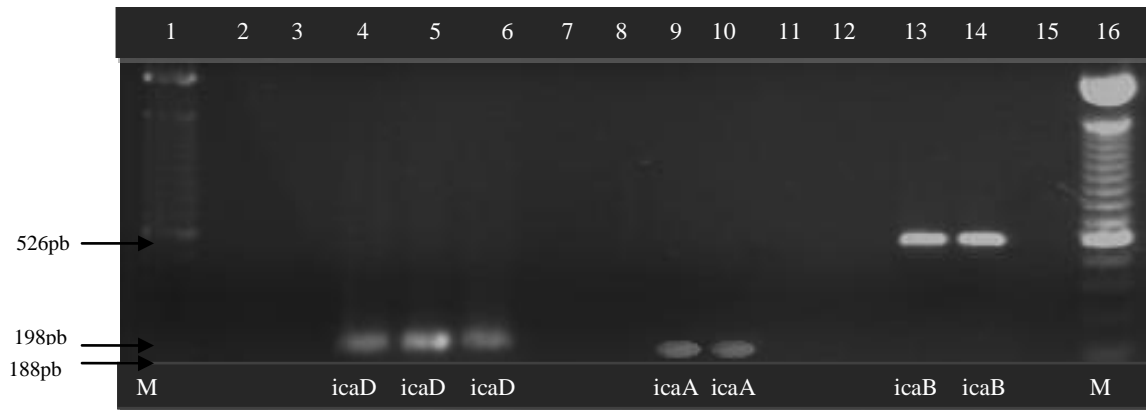


Figure 22: Amplification des gènes *icaA*, *icaD*, *icaB* chez quelques souches de *Staphylocoques spp.*

Puits1: Marqueur de poids moléculaire 100pb, **Puits4:** témoin positives *IcaD*, **Puits 5-6:** exemples de souches positives pour *IcaD*, **Puits9:** témoin positive pour *IcaA*, **Puits 10:** exemple de souche positives pour *IcaA*, **Puit13:**témoin positive pour *IcaB*, **Puits 14:** exemple de souches positive pour *IcaB*, dernier puits : Marqueur de poids moléculaire 100pb.

7 - Relation entre la présence des gènes *ica* et la formation de biofilm par les techniques TCP et RCA

La formation du biofilm implique la production d'un polysaccharide extracellulaire ou PIA responsable de l'établissement du contact inter bactérien et de l'accumulation de ces bactéries en couches superposées. La synthèse de ce polysaccharide dépend de l'expression de l'opéron chromosomique *ica* (Rachid *et al.*, 2000).

Dans cette partie nous avons essayé de discuter la relation entre l'expression des gènes *ica* et la formation de biofilm par TCP et la production de slime bactérien.

Selon le **tableau 19**, nous constatons que parmi les 14 souches de staphylocoque à l'opéron *ica* +, 13 souches formaient un biofilm par la technique TCP et 10 étaient productrices de slime par la méthode RCA.

Tableau 19: Relation entre production de biofilm et la présence de l'opéron *ica*.

Souches N= 31	Production de Slime	Production biofilm TCP	<i>ica</i> operon			
			<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>
<i>S1 S. hominis</i>	+	+++	-	-	-	+
<i>S2 S.warneri</i>	+	+++	-	-	-	+
<i>S3 S.warneri</i>	+	+++	-	+	-	+
<i>S4 S. hominis</i>	-	++	-	-	-	-
<i>S5 S.warneri</i>	-	++	-	-	-	-
<i>S6 S. warneri</i>	+	+++	-	+	-	-
<i>S7 S.warneri</i>	-	+++	-	-	-	+
<i>S8 S. warneri</i>	+	+++	-	+	-	-
<i>S9 S. warneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S10 S. warneri</i>	-	+++	-	-	-	+
<i>S11 S.saprophyticus</i>	-	++	-	-	-	-
<i>S12 S.warneri</i>	+	+++	-	-	-	-
<i>S13 S. hominis</i>	+	+++	+	+	-	+
<i>S14 S.hominis</i>	-	+++	-	-	-	-
<i>S15 S.warneri</i>	-	+++	-	-	-	+
<i>S16 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	-
<i>S17 S. warneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S18 S.warneri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S19 S.warneri</i>	+	+++	-	-	-	-
<i>S20 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	-
<i>S21 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	+
<i>S22 S.warneri</i>	+	+++	-	-	-	+
<i>S23 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	-
<i>S24 S.warneri</i>	-	++	-	-	-	-
<i>S25 S. warneri</i>	-	+++	-	-	-	-
<i>S26 S. warneri</i>	+	+++	-	-	-	-
<i>S27 S.warneri</i>	+	+++	-	-	-	+
<i>S28 S.warneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S29 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	+
<i>S30 S.warneri</i>	+	++	-	-	-	-
<i>S31 S.warneri</i>	-	-	-	-	-	+

A travers les résultats que nous avons obtenus, 4 souches slime (-) portaient l'opéron *ica*. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par **Chaieb et al., (2005)**, **Arciola et al., (2006)** et **Oliveira et Cunha, (2010)** qui confirment l'absence de production de biofilm dans certains isolats de staphylocoques, malgré la présence de l'opéron *ica* (slime négatif/*ica* positif), ceci pourrait être dû à plusieurs raisons telle que l'insertion d'un élément de séquence 1332 paires de bases, appelé IS256 dans *icaA* provoquant son inactivation [(**Ziebuhr et al., 1997**); (**Cho et al., 2002**);(**Kiem et al., 2004**)].

Ziebuhr et al., (1999) et **Cafiso et al., (2004)** ont également proposé l'action du *icaR*, un gène régulateur qui fonctionne comme un répresseur de transcription de l'opéron *ica*, l'expression de l'opéron *ica* et donc la formation de biofilm semble être très variable selon les Staphylocoques [(**Mempel et al., 1994**)];(**Ziebuhr et al., 1997**)].

Chaieb et al., (2005) ont signalé que la co-expression de *icaA* avec *icaD* augmente l'enzyme responsable de l'activité de la N-acétylglucosaminyl transférase considérablement et par la suite l'expression phénotypique du polysaccharide capsulaire alors que les 4 souches (S7, S10, S15, S31) slime (-) portaient seulement *icaD*.

Contrairement à l'ensemble des souches étudiées, 10 étaient capables de produire le slime malgré l'absence de l'opéron *ica* (biofilm positif/*ica* négatif) de tels résultats ont été également constaté dans les études de **Chaieb et al., (2005)**, **Qin et al., (2007)**, **Hadir et al., (2009)** ainsi que celle de **Kara Terki et al., (2013)**.

Selon nos résultats 13/31 souches de staphylocoques étaient TCP positif avec absence de l'opéron *ica*, effectivement certains auteurs [(**Arciola et al., 2006**);(**Oliveira et Cunha, 2010**);(**Nasr et al., 2012**)] ont confirmé qu'un phénotype positif n'est pas toujours trouvé associé à la présence de gènes *ica* .

Selon les résultats trouvés dans la littérature, l'absence du locus *ica* chez certaines souches de staphylocoques formatrices de biofilms peut être expliqué par la présence des gènes AAP (**Protéine Associée à l'Accumulation** et BAP (**Biofilm Associated Protein**) codant pour la synthèse des protéines conduisant à un phénotype positif (**Rohde et al., 2005**). Ces découvertes pourrait démontrer la nécessité d'étudier l'expression des gènes évalués par l'ARNm afin de détecter toutes les souches de génotype positifs (**Arciola et al., 2006**) .

L'expression de l'opéron *ica* dépend aussi des conditions environnementales, celle ci est induite par des facteurs tels que la température, la présence d'oxygène, l'osmolarité et la composition du milieu de croissance [(**Barnes et al., 1999**);(**Rachid et al., 2000**)];

(**Stepanovic et al., 2001**), le calcium et le magnésium augmente fortement l'expression de biofilm (**Chaieb et al., 2005**).

8. Répartition de *S. warneri* sur la longueur de la tubulure selon le biotype et la présence du gène *ica*

Staphylococcus warneri est une bactérie commensal de la peau, qui se trouve chez 50% de la population (**Legius et al., 2012**) et le plus souvent isolée de la flore buccale (**Nagase et al., 2002**). Celle-ci était retrouvée sur toute la longueur de toutes les tubulures d'eau étudiées. De plus, la moitié des espèces de *Staphylococcus warneri* isolées (15/31) étaient formatrices de biofilm (TCP+, slime+) c'est ainsi qu'il nous a semblé intéressant de savoir si cette souche était responsable de la contamination de toute la tubulure en direction des pièces à main vers le circuit d'eau, puisque celles-ci colonisaient tous les échantillons de tubulures reliés aux pièces à mains.

Selon le **tableau 20** nous remarquons effectivement que certaines souches (S21, S22) et (S29, S31) avaient le même biotype et présentaient le gène *ica*, d'autres (S23, S24, S25) portaient le même biotype et étaient présentes simultanément dans Les 3 sections de la tubulure (T 11), ceci est probablement dû à la progression du biofilm à l'intérieur de cette tubulure. Cette formation serait d'autant plus active vu les conditions favorables telles que le faible diamètre (2 mm), la stagnation de l'eau sur les parois qui font qu'en seulement 180 jours toute la surface interne d'une tubulure d'eau se recouvre d'un épais biofilm (**Donlan et Costerton, 2002**).

Toutefois et tenant compte de l'identification faite précédemment, une même tubulure peut héberger plusieurs bactéries (*Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*) capables de former un biofilm mixte avec cette même espèce de staphylocoque engendrant ainsi la formation d'agrégats sur toute la longueur de la tubulure.

Tableau 20: La répartition des souches sur les tubulures en fonction du biotype et gène *ica*.

Tubulure	1 ^{er} échantillon liée aux circuits d'eau		2 ^{ème} échantillon milieu tubulure		3 ^{ème} échantillon liée aux pièces à main	
T1	S1 (<i>S.hominis</i>)				S2 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6212053			Biotype	6232123
	<i>ica</i> opéron	<i>icaD</i>			<i>ica</i> opéron	<i>IcaD</i>
T2	S3 (<i>S.warneri</i>)		S4 (<i>S.hominis</i>)		S5 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232113	Biotype	6212153	biotype	6232133
	<i>ica</i> opéron	<i>icaBD</i>	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	Absence
T3			S6 (<i>S.warneri</i>)		S7 (<i>S.warneri</i>)	
			Biotype	6232113	Biotype	6232113
			<i>ica</i> opéron	<i>icaB</i>	<i>ica</i> opéron	<i>IcaD</i>
T4	S8 (<i>S.warneri</i>)		S9 (<i>S.warneri</i>)		S10 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232123	Biotype	6232113	Biotype	6232133
	<i>ica</i> opéron	<i>icaB</i>	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	<i>IcaD</i>
T5	S11(<i>S.saprophyticus</i>)				S12 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6630113			Biotype	6232133
	<i>ica</i> opéron	Absence			<i>ica</i> opéron	Absence
T6	S13(<i>S.hominis</i>)		S14 (<i>S.hominis</i>)		S15 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6212153	Biotype	6212113	Biotype	6232123
	<i>ica</i> opéron	<i>icaABD</i>	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	<i>IcaD</i>
T7					S16 (<i>S.warneri</i>)	
					Biotype	6232133
					<i>ica</i> opéron	Absence
T8					S17 (<i>S.warneri</i>)	
					Biotype	6232123
					<i>ica</i> opéron	Absence
T9			S18 (<i>S.warneri</i>)		S19 (<i>S.warneri</i>)	
			Biotype	6232113	Biotype	6232113
			<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	Absence
T10	S20(<i>S.warneri</i>)		S21 (<i>S.warneri</i>)		S22 (<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232113	Biotype	6232123	Biotype	6232123
	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	<i>icaD</i>	<i>ica</i> opéron	<i>IcaD</i>
T11	S23 (<i>S.warneri</i>)		S24(<i>S.warneri</i>)		S25(<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232123	Biotype	6232123	Biotype	6232123
	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	Absence
T12	S26 (<i>S.warneri</i>)		S27(<i>S.warneri</i>)		S28(<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232113	Biotype	6232133		6232113
	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	<i>icaD</i>	<i>ica</i> opéron	Absence
T13	S29(<i>S.warneri</i>)		S30(<i>S.warneri</i>)		S31(<i>S.warneri</i>)	
	Biotype	6232133	Biotype	6232113	Biotype	6232133
	<i>ica</i> opéron	<i>icaD</i>	<i>ica</i> opéron	Absence	<i>ica</i> opéron	<i>icaD</i>

9. La recherche des gènes toxiques chez les souches de staphylocoques isolées

La capacité des staphylocoques à coloniser les tissus de l'hôte, à proliférer et à contourner son système de défense immunitaire se fait grâce à des facteurs de virulence spécifiques tels que les facteurs d'adhésion et de production de toxines (Lowy, 1998).

Les staphylocoques ont la capacité de lyser les cellules et les tissus de l'hôte grâce à la mise en jeu d'un grand nombre de toxines (Dinges et al., 2000). De ce fait, l'alpha-toxine (ou hémolysine-alpha), la bêta-toxine, la delta-toxine la gamma-toxine (leucocidine *lukE-D* et *M*) et la leucocidine de Panton Valentine (PVL) sont des hémolysines qui forment des pores dans la membrane des cellules endothéliales, des plaquettes, des monocytes et des hétérocytes. Ces pores conduisent à la lyse cellulaire entraînant une libération massive de médiateurs et d'enzyme de dégradation, qui sont à l'origine de lésions nécrotiques des tissus.

Les toxines superantigéniques staphylococciques sont impliquées dans l'envahissement tissulaire, elles sont capables de provoquer une activation polyclonale des lymphocytes T. Vingt-et-une exotoxines superantigéniques staphylococciques ont été individualisées à ce jour [(Dinges et al., 2000);(Holtfreter et al., 2007);(Thomas et al., 2007)].

Il s'agit de la toxine responsable du syndrome de choc toxique staphylococcique "*toxic shock syndrome toxin-1*" (TSST-1 codée par le gène *tst*) et de 20 entérotoxines (*Staphylococcal Enterotoxin* [SE] ou *Staphylococcal Enterotoxin-like* [SEI]) (Thomas et al., 2007).

Quant aux exfoliatines, ce sont des sérines protéases épidermolytiques impliquées dans certaines pathologies cutanées spécifiques (Ladhani, 2001). Il existe trois exfoliatines : l'exfoliatine A (*ETA*), l'exfoliatine B (*ETB*) et l'exfoliatine D (*ETD*).

D'autres toxines staphylococciques ont été également décrites notamment, des toxines inhibitrices de la différenciation des cellules épidermiques (*edinABC*) (Vincenot et al., 2008).

Compte tenu du nombre important de staphylocoques, de leur capacité à produire des biofilms dans ces tubulures et de la violence de la symptomatologie associée à la production de toxines, il nous a paru très intéressant de rechercher certains gènes toxiques chez ces *Staphylocoques spp* isolée des tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU de Tlemcen.

Les six PCR multiplex ont révélé la présence de 4 gènes toxiques parmi les 20 recherchés sur les 31 souches de *Staphylocoques spp*, Il s'agit des gènes des entérotoxines

staphylococciques (*seh*) des gènes des entérotoxines staphylococciques like (*selm*) et du gène codant des leucotoxines M (*lukM*), des gènes codant des toxines inhibitrices de la différenciation des cellules épidermiques (*edinABC*).

Les **figures 23 et 24** montrent le profil de migration sur gel d'agarose des différents gènes amplifiés chez les souches de *Staphylococcus spp* de notre étude par PCR multiplex 1 et 6.

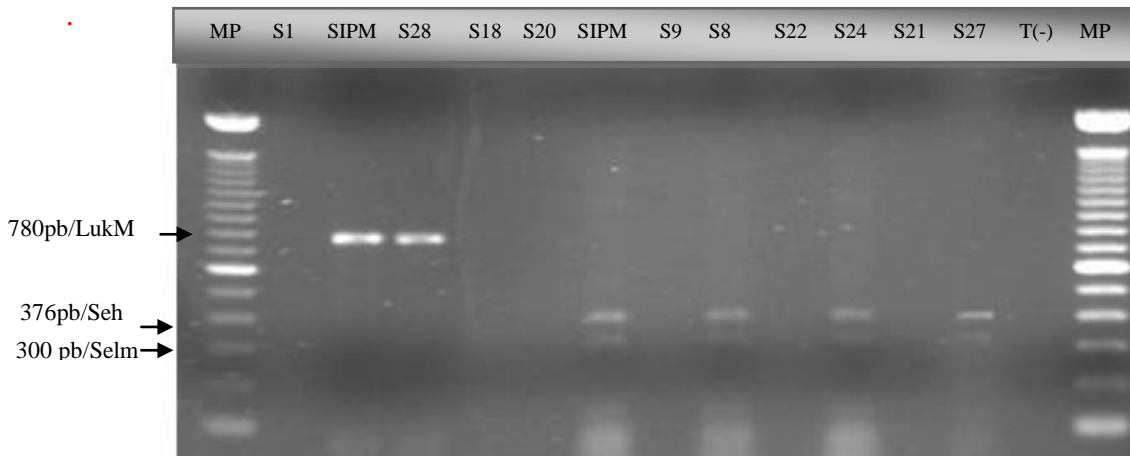


Figure 23 : Révélation des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 1 chez les souches de *Staphylococcus spp*, gènes recherchés : *lukM*, *seh*, *selm* et *tst*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder)

SIPM : ADN d'une souche positive pour le gène *lukM*. : souches d'institut pasteur du Maroc

S28 : souche positive pour le gène *lukM*

SIPM : ADN d'une souche positives pour les gènes *seh*, *selm*. Contrôle positif

S8, S24, S27 : souches positives pour les gènes *seh*, *selm*

T(-) : contrôle négatif.

La PCR multiplex 1 révèle la présence des 3 gènes parmi les 4 recherchés. Il s'agit du gène *seh*, *selm*, ils étaient portés respectivement par les souches S8, S24, S27 et du gène *lukM* porté par la souche S28.

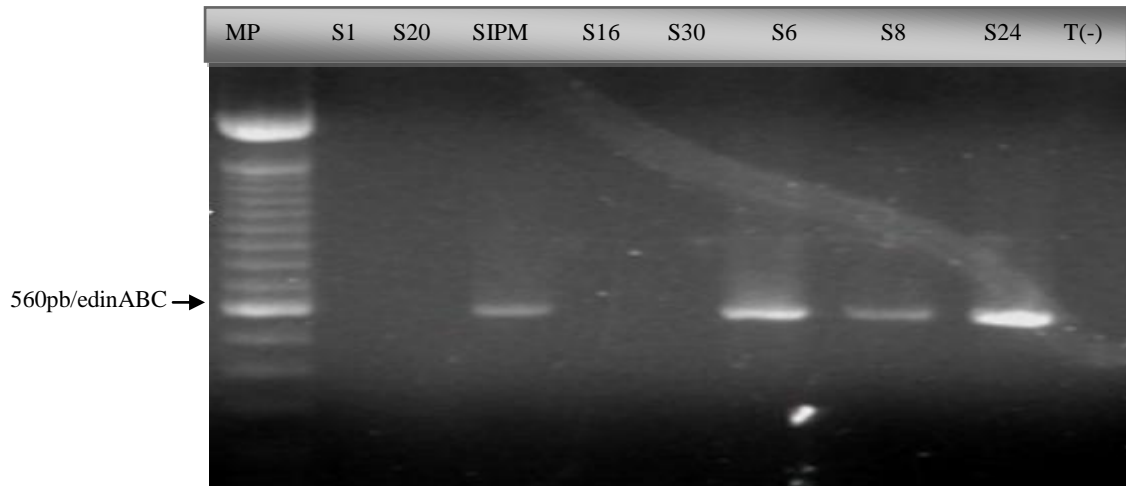


Figure 24: Révélation des gènes toxiques amplifiés par PCR multiplex 6, chez les souches de *Staphylococcus spp.*, gènes recherchés : *edinABC* et *selk*.

MP : Marqueur de poids moléculaire (100 pb DNA ladder, Invitrogen)

SIPM: ADN d'une souche positive pour le gène *edinABC* : souches d'institut pasteur du Maroc

S6, S8, S24 : Souches positives pour le gène *edinABC*

T(-) : contrôle négatif

La PCR multiplex 6 révèle la présence d'un seul gène parmi les 2 recherchés. Il s'agit du gène *edinABC* porté par les souches S6, S8, S24 retrouvées sur milieu des tubulures et coté circuit d'eau (T3, T4, T11). Par contre les PCR multiplex N°2, 3, 4, 5 ne révèle aucun des gènes recherchés chez les 31 souches de *Staphylococcus spp.*

La présence des gènes toxiques étaient portés uniquement par cinq souches de *Staphylococcus warneri* (S6, S8, S24, S27, S28). Par ailleurs chacune des cinq souches véhicule un à trois gènes toxiques comme le montre le **Tableau 21**. Par comparaison avec *Staphylococcus aureus*, les staphylocoques à coagulase négative expriment moins de facteurs de virulence, mais sa capacité à former des biofilms permet de devenir des pathogènes opportunistes (Fey et Olson, 2010).

Tableau 21: Profil des gènes toxiques chez les souches de *Staphylococcus warneri* étudiées.

Souches de <i>S.warneri</i>	Gènes toxiques
S6	<i>EdinABC.</i>
S8	<i>Seh, Selm, edinABC</i>
S24	<i>Seh, Selm, edinABC</i>
S27	<i>Seh, Selm.</i>
S28	<i>LukM.</i>

Les gènes toxiques *Seh, Selm, edinABC, LukM* étaient les seuls retrouvés chez les souches de *Staphylocoque*, 3 des 5 souches qui véhiculaient les gènes toxiques portaient le gène *selm*. Les études de **Holtfreter et al., (2007)** et de **Elazhari et al., (2011)** ont montré que *selm* étaient parmi les gènes les plus fréquents.

Quant au gène *seh*, nous avons constaté que sa présence était associée au gène *selm* chez 3 souches, nous supposons qu'il est localisé sur une région chromosomique mobile (**Elazhari et al., 2011**), car les gènes codant pour les exotoxines superantigéniques sont tous localisés sur des éléments génétiques mobiles, ils peuvent être portés par des plasmides (*seb, sed, sej, ser, ses, set*), par des phages (*sea, see*), par des îlots de pathogénicité (*seb, sec, seg, seh, sei, sek, sel, sem, sen, seo, sep* et *seq*) [(**Holtfreter et Borker, 2005**);(**Holtfreter et al., 2007**)].

Le gène *edinABC* était isolé chez trois souches dont deux possèdent en plus les gènes *Seh, Sem*. D'autre part le gène *lukM*, une leucocidine à activité synergohyménotrope était isolée chez une souche, or dans la littérature, le gène *lukM* est d'origine bovine et il est porté par un élément génétique mobile (**Kaneko et al., 1997**). Sa présence chez la souche S28 de la tubulure 12 isolée de l'échantillon liée aux pièces à main peut être expliquée par le fait qu'elle soit réaspirée à partir de la cavité buccale d'un patient lors des soins dentaire.

Enfin, aucune de nos souches n'a hébergé l'un des gènes des exfoliatines, des épidermolysines, de la leucocidine de panton et valentine ni de toxine du syndrome de choc toxique staphylococcique.

A la lumière de toutes ces données, et en tenant compte des infections associées à l'eau des tubulures utilisée lors des soins dentaires comme étant un facteur de risque important pour un

patient ou un praticien, d'être infecté par des staphylocoques et aux toxines qu'elles étaient capables de produire .

10. Relation entre la présence des gènes toxiques, des gènes *ica* et la formation de biofilm

Parmi les trente et une souches de *Staphylococcus spp* testés par PCR multiplex , un total de cinq des isolats étaient positifs pour un ou plusieurs gènes de toxine. Parmi ces cinq souches, deux possédaient le gène *icaB* et une était positif pour *icaD*, quatre d'entres elles étaient productrices du biofilm par TCP et le slime par l'ARC et une seule souche (S28) était biofilm (-), *ica* operon (-) avec présence du gène toxinique (**Tableau 22**).

9/31 souches de Staphylocoque étaient capables de produire un biofilm (TCP+, slime+) portaient l'opéron *ica* et ne produisait pas de toxines. Des résultats similaires ont été déjà retrouvés dans l'étude de **Camargo et al., (2014)** où des souches de staphylocoques à coagulase négatif présentaient une faible production de toxines, bien que 35% d'entre elles étaient formatrices de biofilm et portaient le gène *icaAD*, ces deux facteurs n'ont pas été associés.

Par contre **Caiazza et O'Toole, (2003)** ont signalé que la sécrétion des toxines peut jouer un rôle dans la formation de biofilm, ils ont démontré un rôle de l'alpha- hémolysine dans la formation de biofilm chez *Staphylococcus aureus*, où cette toxine semble être nécessaire pour l'interaction entre les cellules, ils ont constaté que la toxine sécrétée a un impact dramatique sur la formation de biofilm.

Tableau 22 : Relation entre la formation de biofilm, la présence de l'opéron *ica* et les gènes toxiques.

Souches <i>S.warneri</i>	formation de biofilm		L'opéron <i>ica</i>				gènes toxiques
	RCA (slime)	TCP	<i>icaA</i>	<i>icaB</i>	<i>icaC</i>	<i>icaD</i>	
S6	+	+	-	+	-	-	<i>EdinABC</i>
S8	+	+	-	+	-	-	<i>Seh,,Selm,EdinABC</i>
S24	+	+	-	-	-	-	<i>Seh,Slem ,EdinABC</i>
S27	+	+	-	-	-	+	<i>Seh,Selm</i>
S28	-	-	-	-	-	-	<i>LukM</i>

11. Contamination croisée lors des soins dentaires

En plus de la présence quasi permanente des *Staphylococcus warneri* sur la longueur de la tubulure et essentiellement du côté des pièces à mains, plusieurs auteurs signalent que les staphylocoques d'origine buccale peuvent être très souvent responsables d'infections [(Martin, 1998);(Pankhurst *et al.*, 1998);(Nagase *et al.*, 2002)], ce qui nous a conduit à réfléchir et à dresser un protocole expérimental *in-vitro* pour essayer de confirmer l'hypothèse de la contamination croisée lors des soins dentaires par cette espèce bactérienne .

Après les stimulations de soins sur des cavités buccales de moutons, la tubulure mise en place pour cette expérience était retirée et analysée de la même manière citée précédemment.

Au bout de 48 heures d'incubation à 37 °C, nous avons constaté l'apparition de colonies blanches diffuses non seulement sur les 2 boîtes ensemencées à partir des deux échantillons de la tubulure (la bordure branchée aux pièces à main et milieu de la tubulure), mais également à partir du prélèvement effectué dans la cavité du 2^{ème} mouton qui supposée exempte de *Staphylococcus warneri*.

De même des examens microscopiques et biochimiques (API Staph) réalisés sur toutes ces cultures bactériennes ont confirmé la présence de la même espèce de *Staphylococcus warneri* initialement inoculée dans la cavité buccale du premier mouton (patient).

Cette présence est sûrement due à une contamination lors des soins dentaires ou la souche de *Staphylococcus warneri* initialement inoculée dans la cavité buccale du premier patient était aspirée à l'intérieur du conduit d'eau (tubulure) de la turbine suite à l'arrêt de l'action de celle-ci et qui s'est retrouvée chez le deuxième patient lors de ses soins par l'intermédiaire des jets d'eau utilisés (**Figure 25**). De plus cette même bactérie s'est retrouvée également dans les deux sections de la tubulure, du côté pièces à main et milieu.

L'absence de croissance des staphylocoques sur la 3^{ème} boîte ensemencée à partir du 3^{ème} échantillon signifie que la bactérie n'a pas eu le temps de diffuser le long de la tubulure d'eau pour atteindre sa dernière partie connectée au circuit d'eau. Ceci est probablement dû à l'utilisation très courte de la tubulure lors de notre protocole contrairement aux échantillons de notre étude qui étaient installés depuis plusieurs années et qui n'ont jamais été changés depuis leurs installations.

Cette expérience démontre bien que les tubulures d'eau utilisées en soins dentaires peuvent être à l'origine de dissémination d'agents pathogènes provenant des cavités buccales de patients et qui pourraient le transmettre à d'autres patients à travers celle-ci. Le phénomène

physique responsable du transfert des particules bactériennes de la cavité buccale vers la tubulure est exclusivement associé aux aérosols chargés de débris tissulaires, de salive dispersées hors de la cavité buccale du patient et se déposent sur les instruments et peuvent être aspirés à l'intérieur du conduit d'eau de la turbine suite à l'arrêt de l'action de celle-ci **(Bohne et Pouëzat, 1998)**.

Diverses études expérimentales ont montré le refoulement des liquides biologiques vers les canaux internes des tubulures **(Lewis et Arens, 1995)**. **Lewis et Boe, (1992)** ont pu démontrer le passage d'une solution colorée dans les circuits d'eau après seulement 25 secondes de fonctionnement d'une turbine avec plusieurs arrêts. De la même manière, les purges réalisées régulièrement peuvent se révéler insuffisantes pour éliminer les éléments aspirés au cours de l'intervention. L'exercice de l'art dentaire fait largement appel à l'irrigation sous forme de jet ou de spray. Ces manœuvres précipitent dans l'atmosphère un grand nombre de microorganismes, dont une partie s'insinue dans les tubulures survenant lorsque les instruments rotatifs s'arrêtent, entraîne une réaspiration de l'air et des fluides buccaux puis à l'ouverture de l'écoulement les remous de l'eau détachent des particules qui se disséminent et vont contaminer la cavité buccale des patients suivants.

Le système d'aspiration est une source potentielle de contamination croisée au cabinet dentaire. En effet, l'aspiration permet l'évacuation des fluides buccaux du sang du pus des débris cellulaires et il se développe à l'intérieur des conduits du système d'aspiration un biofilm composé de pathogènes potentiels telle que les Staphylocoques **(Barbeau et al., 1998)**.

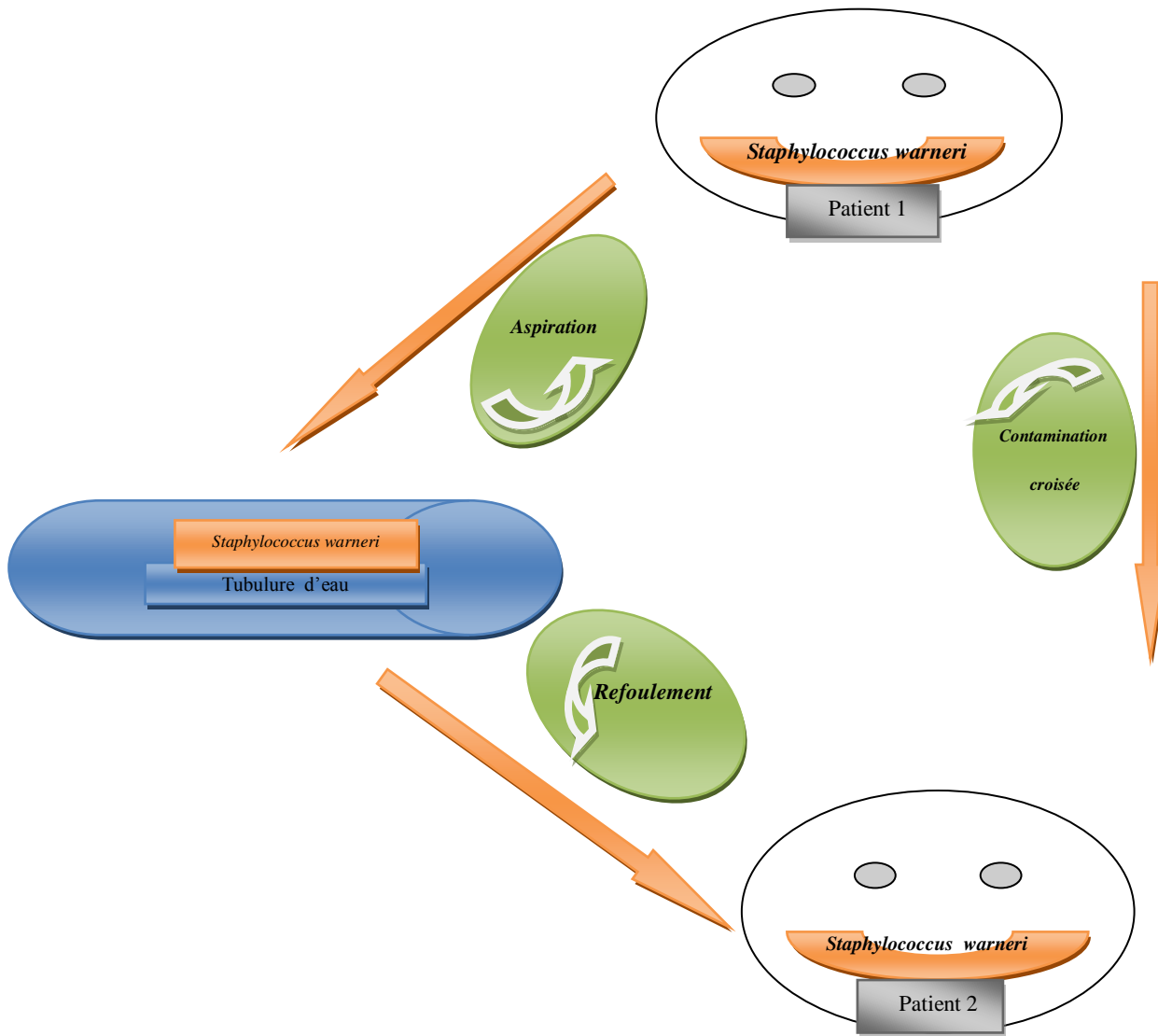


Figure 25 : Contamination croisée lors des soins dentaires.

Conclusion générale

Il semble aujourd'hui évident, au vu de ces résultats et de la synthèse des publications scientifiques sur le sujet, que la colonisation bactérienne des tubulures d'eau dentaire est un phénomène qui reste inévitable. Il est important de rappeler que la contamination microbiologique d'origine buccale et hydrique de celles-ci peut être à l'origine d'infections chez le patient ou le personnel. Cette contamination microbiologique est entretenue et amplifiée par le développement de biofilms.

Après analyse bactériologiques de l'eau circulant dans les tubulures, nous avons pu observer qu'elle est de très mauvaise qualité impropre à son utilisation avec des seuils atteignant les $6,5.10^7$ UFC/mL voire indécomptable dans certains échantillons.

Cette étude révèle la présence d'un bon nombre de microorganismes dans les tubulures d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen avec dominance des Staphylocoque a coagulase négatif dont la plupart sont capables de former un biofilm (26/31) avec la présence de l'opéron *ica* chez la moitié d'entre elles (14/31), dont quelques-unes abritaient au moins un gène toxinique. A travers nos résultats on a conclu et confirmer qu'il existe un phénomène d'aspiration par les pièces à main conduisant à la remontée des germes des cavités buccales de patients vers la tubulure d'eau et qui pourra être à son tour source d'une contamination secondaire chez d'autre patients, ce qui nous laisse supposer que les souches de staphylocoque retrouvée dans les tubulures d'eau sont probablement ceux de la flore buccale des patients ayant subi des soins dentaires.

L'exposition à long terme aux bactéries provenant de l'eau des tubulures des unités (CEUD) et aux toxines qu'elles portent pourrait sensibiliser les poumons et présenté un risque pour des les patients et le personnel dentaire, les dentistes croient à tort que l'utilisation d'eau distillée ou stérile dans les unités dentaires a pour effet de minimiser le problème. Il est important de rappeler que la tubulure renferme probablement déjà des films biologiques provenant de la réaspiration des particules biologiques qui contamineront l'eau distillée ou stérile. Le recours à l'eau distillée ou stérile n'est donc pas justifié et probablement inutile (**Barbeau, 2000**).

Les dentistes peuvent prendre des mesures pour réduire la présence de microorganismes dans l'eau provenant de l'unité dentaire en effectuant les opérations d'entretien suivantes :

-Chaque matin, purger chacune des conduites en faisant circuler l'eau, après avoir enlevé les pièces à main. La diminution du nombre de bactéries associée à cette purge a été confirmée par l'étude de **Whitehouse et al., (1991)** et celle de **Barbeau et al., (1996)**.

-Faire fonctionner les pièces à main, à haute vitesse pendant 20 à 30 secondes après chaque patient, de manière à en purger tout l'air et l'eau.

-les canalisations d'arrivée d'eau au fauteuil doivent être équipées de valves anti-retour afin de limiter le passage des bactéries orales et donc le risque de transmission de patient à patient.

-Les instruments rotatifs doivent être stérilisés après chaque utilisation au même titre que les autres instruments dentaires entrant en contact avec les sécrétions du patient, l'insuffisance de la désinfection de la cavité buccale nous conduit à réfléchir sur la nécessité du nettoyage de celle-ci afin de réduire la charge bactérienne buccale.

Pour aider à contrôler ce problème il est nécessaire de désinfecter l'intérieure des tubulures par un certain nombre de produits telle que l'Oxygenal, biocide couramment utilisé en continu dans les CEUDs et le nouveau procédé Pronetron, combinaison séquentielle d'enzymes et de détergent ayant comme propriété de décrocher la biomasse adhérente (**Amoussou *et al.*, 2005**).

- la tubulure d'eau devrait être considérée comme un dispositif médical, l'action corrective la plus efficace serait un changement régulier des tubulures. Car à notre niveau et à notre connaissance aucune unité n'est actuellement conçue pour un renouvellement régulier de celles-ci et aucun fabricant ne les propose en usage unitaire ou du moins à durée d'utilisation limitée.

En perspectives de ce travail, il serait très intéressant de pouvoir trouver un désinfectant à base de substance naturelle efficace qui permettra d'obtenir une eau « non contaminée » de qualité satisfaisante pour l'usage dentaire. Toutefois, un suivi serait nécessaire pour contrôler le phénomène d'accumulation et la formation du biofilm bactérien à l'intérieur des tubulures afin de signaler et de limiter la durée d'utilisation des tubulures et de rendre le procédé applicable aux unités dentaires.

Références bibliographiques

- ADA Council on Scientific Affairs. (1999).** Dental unit waterlines: Approaching the year 2000. *Journal of the American Dental Association* .130: 1653-1664.
- Amoussou Y., Barsotti O., Décoret D., Marion K., Lagneau C., Renaud F., Morrier J.J. (2005).**Contamination des circuits d'eau des unités dentaires : développement de modèles dynamiques “bioréacteurs” de formation de biofilms. *Association Dentaire Française*. 18-19.
- Al Shorman H., Nabaa L.A., Coulter W.A., Pankhurst C.L., Lynch E. (2001).** Management of dental unit water lines. *Dental Update*. 29:292-298.
- Araujo M.W, Andreana S. (2001).** Risk and prévention of transmission of infectious diseases in dentistry. *Quintessence International*. 33:376-382.
- Arciola C.R., Campoccia D., Baldassarri L., Donati M.E., Pirini V., Gamberini S.(2006).** Detection of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* from implant infections. Comparison of a PCR-method that recognizes the presence of ica genes with two classic phenotypic methods. *Journal of Biomedical Materials Research*.76 (2):425–430.
- Bagley ST., Seidler RJ., Talbot HW., Morrow JE. (1978).** Isolation of Klebsiella from within living wood. *Applied and Environmentl Microbiology*. 36:178-85.
- Barbeau J. (2000).** Les films biologiques d’origine hydrique et la dentisterie : la nature changeant du contrôle des infections. *Journal de l’Association dentaire canadienne*. 66:10-12.
- Barbeau J. (2007a).** Un monde merveilleux. *Journal de l’Ordre des dentistes du Québec*. 44: 517-524.
- Barbeau J. (2007b).** Poursuite judiciaire contre un dentiste concernant une infection oculaire grave possiblement liée à l’eau de la turbine. *Journal de l’Association dentaire canadienne*.7 :618-622.
- Barbeau J., Gauthier C., Payment P. (1998).** Biofilms, infections agents, and dental unit waterlines :a review. *Canadian Journal of Microbiology*. 44:1019-1028.
- Barbeau J, Nadeau C. (1997).** Dental unit waterline microbiology: a cautionary tale. *Journal Canadian Dental Association*. 63(10):775-779.
- Barbeau J., Tanguay R., Faucher E., Avezard C., Trudel L., Côté L ., Prévost A.P. (1996).** Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:3954-3959.
- Barbot V., Robert A., Rodier MH., Imbert C .(2012).** Update on infectious risks associated with dental unit waterlines.FEMS *Immunology medical microbiology*.65:196-204.

- Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H. (1999).** Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:4543- 4548.
- Barsotti O., Morrier J.J., Lecollier M.D., Brisset L. (2001).** Le risque infectieux au cabinet dentaire. Bilan épidémiologique et contrôle de l'infection croisée. *Journal of Hygiene* . 3 : 210- 218.
- Belifa S., Hassaine H., Balestrino D., Charbonnel N., M'hamedi I., Kara Terki I., Lachachi M., Didi W., Forestier C. (2013).** Evaluation of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from medical devices at the University Hospital of Tlemcen Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. 7(49):5558-5564.
- Bohne W, Pouëzat J. (1998).** L'hygiène au cabinet dentaire odysée de l'hygiène. *Sciences*. 98(2): 41-47.
- Brooks J.L, Jefferson K.K. (2014).** Phase variation of poly-N-acetylglucosamine expression in *Staphylococcus aureus*. *PLoS pathogens*.10(7):1004292.
- Cafiso V., Bertuccio T., Santagati M., Campanile F., Amicosante G., Perilli MG. (2004).** Presence of the ica operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. *Clinical Microbiology and Infection*. 10:1081–1088.
- Caiazza N.C, O'Toole G.A. (2003).** Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* .185(10):3214-3217.
- Calligaris-Maibach R. (2011).** Sonication de prothèses Augmente le taux de détection de bactéries. *information scientifique- Unilabs*.
- Camargo C.H., Souza M.D.L.R., Caramori J.C.T., Mondelli A.C., Montelli A.C., Barretti P.(2014).** Peritoneal Dialysis–Related Peritonitis due to Coagulase-Negative Staphylococcus: A Review of 115 Cases in a Brazilian Center. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*.9:1074-1081.
- Chaieb K., Mahdouania K., Bakhrouf A. (2005).** Detection of icaA and icaD loci by polymerase chain reaction and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* isolated from dialysate and needles in a dialysis unit. *Journal of Biomedical Materials Research* .61:225-230.
- Chalfine A, Carlet J. (2002).** Les infections liées aux soins médicaux. *adsp*. 38 :24-26 .

- Cash R.G. (1990).** Trends in sterilisation and disinfection procedures in orthodontic offices. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 98:292–9.
- Cho S.H., Naber K., Hacker J., Ziebuhr W. (2002).** Detection of the *icaADBC* gene cluster and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from catheter-related urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 19(6):570–575.
- Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F., Melton D.M., 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*. 22:996-1006.
- Coleman D.C., O'Donnell M.J., Shore A.C., Russel R.J.(2009).** Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. *Journal of applied microbiology*. 106(5): 1424-1437.
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *New York Science Journal Science* .284: 1318-1322.
- De Paola L.G., Mangan D., Mills S.E., Costerton W., Barbeau J., Shearer B., Bartlett J. (2002).** A review of the science regarding dental waterlines. *Journal of the American Dental Association*. 133: 1199-1206.
- Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. (2000).** Exotoxins of *S. aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*.13: 16-34.
- Djeribi R, Zaghez M. (2004).** Contaminations microbiologiques par les dispositifs médicaux dans les unités dentaires. *EMC-Dentisterie*. 1 : 378–381.
- Donlan R. M. (2002).** Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 9: 881-890.
- Donlan R.M., Costerton J.W. (2002).** Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 15: 167- 193.
- Dunne W.M. (2002).** Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical microbiology reviews*. 15(2): 155-166.
- Dutil S., Mériaux A., Latrémoille M.C., Lazure L., Barbeau J., Duchaine C.(2009).** Measurement of airborne bacteria and endotoxin generated during dental cleaning. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 6:121-130.

- Dutil S., Tessier S., Veillette M., Laflamme C., Mériaux A., Leduc A., Barbeau J., Duchaine C. (2006).** Détection of *Legionella* spp. by fluorescent *in situ* hybridization in dental unit waterlines. *Journal of Applied Bacteriology*. 100:955-963.
- Dutil S., Veillette M., Mériaux A., Lazure L., Barbeau J., Duchaine C. (2007).** Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination. *Environmental Microbiology*. 9:2836-2843.
- Elazhari M., Elhabchi D., Zerouali K., Dersi N., Elmalki A., Hassar M., Saile R., Timinouni M. (2011).** Prevalence and Distribution of Superantigen Toxin Genes in Clinical Community Isolates of *Staphylococcus Aureus*. *Journal of Bacteriology and Parasitology*. 2:101-107.
- Espinasse F., Pageb B., Cottard-Boulle B. (2010).** Risques infectieux associés aux dispositifs médicaux invasifs.2010. *Revue Francophone des Laboratoires*.426 :51-63.
- Fey P.D, Olson M.E. (2010).** Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*. 5: 917-933.
- Fitzgibbon E.J., Bartzokas C.A., Martin M.V., Gibson M.F. Graham R.(1984).** The source, frequency and extent of bacterial contamination of the dental water systems. *British Dental Journal*. 157 : 98-101.
- Freeman DJ., Falkiner FR., Keane CT. (1989).** New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* . 42(8):872-874.
- Gad G.M., El-Feky M.A., El-Rehewy M.S., Hassan M.A., Abolella H., El-Baky R.A. (2009).** Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*.3:342-351.
- Geldreich EE. (1996).** Microbial quality of water supply in distribution systems. CRC. *New York: Lewis Publishers*.
- Georges D, Rozencweig S. (2006).** L'eau véhicule bactérien comment éviter le naufrage. *Spécial hygiène asepsie* .30 :1799-1805.
- Götz F. (2002).** Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*. 43: 1367-1373.
- Gravel S. (2009).** Amibes à potentiel pathogène dans les unités Dentaires. Mémoire de Maîtrise en Microbiologie et Immunologie. Université de Montréal. Page 8.
- Hadir A., El-Mahallawy MD., Samah A., Loutfy MD., Mohamed El-Wakil MD., Abeer K., Abd El-Al MD., Hanaa Morcos MD. (2009).** Clinical Implications of *icaA* and *icaD*

Genes in Coagulase Negative Staphylococci and *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Febrile Neutropenic Pediatric Cancer Patients. *Pediatric Blood Cancer*.52:824–828.

Hall-Stoodley L., Stoodley P., Kathju S., Høiby N., Moser C., Costerton J.W., Motter A., Bjarnsholt T. (2012). Towards diagnostic guidelines for biofilm-associated infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*.65(2):127-145.

Harrel S.K. (2004). Airborne spread of disease-the implications for dentistry. *Journal of the California Dental Association*. 32:901-906.

Holtfreter S, Broker B.M. (2005). Staphylococcal superantigens: do they play a role in sepsis?. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 53(1): 13-27.

Holtfreter S., Grumann D., Schmudde M., Nguyen H.T., Eichler P., Strommenger B., Kopron K., Kolata J., Giedrys-Kalemba S., Steinmetz I., Witte W., Broker B.M. (2007). Clonal distribution of superantigène genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 3669-2680.

Jatzwauk L, Reitemeier B. (2002). A pilot study of three methods for the reduction of bacterial contamination of dental unit water systems in routine use. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 204: 303-308.

Kaneko J., Muramoto K., Kamio Y. (1997). Gene LukF-LukPV like component of Panton-Valentine leukocidin in *Staphylococcus aureus* P83 is linked with lukM.. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 61:541-544.

Kara Terki I., Hassaine H., Oufriid S., Bellifa S., Mhamedi I., Lachachi M., Timinouni M. (2013). Detection of icaA and icaD genes and biofilmformation in *Staphylococcus* spp. isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *African Journal of Microbiology*. 7(47), 5350-5357.

Kiem S., Oh W.S., Peck K.R., Lee N.Y., Lee J.Y., Song J.H. (2004). Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *Journal of Korean Medical Science*.19(6):779–782.

Ladhani S. (2001). Recent developments in staphylococcal scalded skin syndrome. *Microbiology and Infectious Diseases*. 7(6): 301-307.

Legius B., Van Landuyt K., Verschueren P., Westhovens R. (2012). Septic Arthritis Due to *Staphylococcus Warneri*: A Diagnostic Challenge. *The Open Rheumatology Journal*. 6: 310-311.

Lewis D.L, Arens M. (1995). Resistance of microorganisms to disinfection in dental and medical devices. *Nature Medicine*.1(9): 956-958.

- Lewis D.L, Boe R.K. (1992).** Cross-infection risks associated with current procedures for using high-speed dental handpieces. *Journal of Clinical Microbiology*.30 : 401-406.
- Lowy F.D. (1998).** *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*. 339:520-532.
- Manizan N.P., Dadie T., Koudou S., Dosso M.(2009).** Risque sanitaire a *pseudomonas* lié à la consommation des eaux embouteillées à abidjan. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 10 :65-70.
- Martin M.V. (1998).** The air/water syringe: a potential source of microbial contamination. *British Dental Journal*.184: 278-279.
- Mathieu L., Sibille I., Hartemann P. (1998).** Ecosystème et biofilm des réseaux de distribution d'eau potable. *Hygiene*. 6 : 375-384.
- Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay DJ., Fatma T., 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*. 24:25-29.
- Mempel M., Feucht H., Ziebuhr W., Endres M., Laufs R., Gruter L. (1994).** Lack of *mecA* transcription in slime-negative phase variants of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 38:1251-1255
- M'hamedi I., Hassaine H., Bellifa S., Lachachi M., Kara Terki I., Djeribi R. (2014).** Biofilm formation by *Acinetobacter baumannii* isolated from medical devices at the intensive care unit of the University Hospital of Tlemcen (Algeria). *African Journal of Microbiology Research*. 8(3) :270-276.
- Miller C.H. (1996).** Microbes in dental unit water. *Journal of the California Dental Association*. 24 : 47-52.
- Mills S.E. (2000).** The dental unit waterlines controversy : diffusing the myths, defining the solutions. *Journal of the American Dental Association*.131(10):1427-1441.
- Nagase N., Sasaki A., Yamashita K., Shimizu A., Wakita Y., Kitai S., Kawano J. (2002).** Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary. Medical Science*. 64:245-250.
- Nasr RA., AbuShady HM., Hussein HS. (2012).** Biofilm formation and presence of *icaAD* gene in clinical isolates of staphylococci . *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 13:269-274.
- Oliveira A, Cunha R.S. (2010).** Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*. 3:260-268.

- Paluch-Oles´ J., Magrys A., Koziol-Montewka M., Niedzielski A., wiadek JN., Niedzielska GY., Kotowski M. (2011).**The phenotypic and genetic biofilm formation characteristics of coagulase negative staphylococci isolates in children with otitis media. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 75:126-130.
- Panagakos FS., Lassiter T., Kumar E. (2001).** Dental unit waterlines: review and product evaluation. *Journal of the New Jersey Dental Association*.72: 20-25.
- Pankhurst C.L, Coulter W.A. (2007).** Do contaminated dental unit waterlines pose a risk of infection. *Journal of Dentistry* . 35:712-720.
- Pankhurst C.L., Johnson N.W., Woods R.G . (1998).** Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. *International Dental Journal*.48: 359-368.
- Pankhurst C.L, Philpott-Howard J.N. (1993).** The microbiological quality of water in dental chair units. *Journal of Hospital Infection*.23(3):167-174.
- Prevost A.P., Robert M., Charland R., Barbeau J. (1995).** Doctor, would you drink water from your dental unit?. *The New York state dental journal*,61(10): 22-28.
- Putnins E.E., DiGiovanni D., Bhullar A.S. (2001).** Dental unit waterline contamination and its possible implications during periodontal surgery. *Journal of Periodontology*. 72:393-400.
- Qin Z., Yang X., Yang L. (2007).** Formation and properties of *in vitro* biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 56:83–93
- Rachid S., Ohlsen K., Witte W., Hacker J., Ziebuhr W. (2000).** Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on polysaccharide intercellular adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.44: 3357-3363.
- Renaud J., Gonzalez M., Meunier O., Musset A., Mathis R., Haikel Y. (2009).** Contamination bactérienne des réseaux d'eau au cabinet de chirurgie dentaire. *Revue Belge de Médecine Dentaire*. 64 :1- 4.
- Richaud-Morel B., Boudot E., Arlin L.R., Perrin C., Faoro B. (2011).** Prévention des infections associée aux soins en chirurgie dentaire dans les établissements de santé. *CCLIN Sud- Ouest*. 1-12.
- Rodier Jean. (2009).** L'analyse de l'eau. 9^e éditions, Dunod Paris
- Rohde H., Burdelski C., Bartscht K., Hussain M., Buck F., Horstkotte MA. (2005).** Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the

accumulation associated protein by staphylococcal and host proteases. *Molecular Microbiology* . 55:1883–95.

Sharvari A, Chitra P.G. (2012). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in clinical isolates of Staphylococci. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(4): 724 -733.

Stampi S., Zanetti F., De Luca G., Romano G., Pistacchio E., Tonelli E. (1996). Effect of water softening and heating on microbial contamination of dental unit systems. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. 198: 522-530.

Stepanovic S., Vukovic D., Jezek P., Pavlovic M., Svabic-Vlahovic M. (2001). Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 20: 502-504.

Sutherland I.W. (2001). The biofilm matrix –an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. 9: 222-227.

Szymanska J, Dutkiewicz J. (2008). Concentration and species composition of aerobic and facultatively anaerobic bacteria released to the air of a dental operation area before and after disinfection of dental unit waterlines. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 15:301-307.

Thomas D., Chou S., Dauwalder O., Lina G. (2007). Diversity in *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Chemical Immunology and Allergy*. 93: 24-41.

Towner K.J. (2009). Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*. 73(4): 355-363.

Vincenot F., Saleh M., Prévost G. (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Revue francophone des laboratoires* .407 : 61-69.

Vuong C., Kocianova S., Voyich J.M., Yao Y., Fischert E.R., De Leo F.R., Otto M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 54881-54886.

Walker J.T., Bradshaw D. J., Bennett A. M., Fulford M.R., Martin M.V., March P. D. (2000). Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general practice. *Applied and Environmental Microbiology* . 66:3363-3367.

Walker J.T., Bradshaw D.J., Finney M., Fulford M.R., Frandsen E., Ostergaard E., Ten Cate J.M., Moorer W.R., Schel A.J., Mavridou A., Kamma J.J., Mandilara G., Stösser L., Kneist S., Araujo R., Contreras N., Goroncy-Bermes P., Mullane O.D., Burke F., Forde A., Sullivan O.M., Marsh P.D. (2004). Microbiological evaluation of dental unit

water systems in general dental practice in Europe .*European Journal of Oral Sciences*. 112: 412-418.

Whitehouse R.L., Peters E., Lizotte J., Lilge C. (1991). Influence of biofilm son microbial contamination in dental unit water. *Journal of Dentistry*. 19:290-295.

Zanetti F., Stampi S., De Luca G., Fateh-Moghadam P.O., Bucci Sabattini M.A., Checchi L. (2000). Water characteristics associated with the occurrence of *Legionella pneumophila* in dental units. *European Journal of Oral Sciences*. 108 :22-28.

Ziebuhr W., Heilmann C., Gotz F. (1997). Detection of intercellular gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity*. 65: 890–896.

Ziebuhr W., Krimmer V., Rachid S., Lossner I., Gotz F., Hacker J.A. (1999). Novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*. 32(2):345–356.

Liste des travaux et publications

Publication internationale

Lachachi M., Hassaine H., Nayme K., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I., Timinouni M. (2014). Detection of biofilm formation, icaADBC gene and investigation of toxin genes in *Staphylococcus* spp. strain from dental unit waterlines, University Hospital Center (UHC) Tlemcen Algeria. *African Journal of Microbiology Research*. 8 (6) :559-565.

Lachachi M., Hassaine H., M'hamedi I., Bellifa S., Kara Terki I., Didi W. (2014). Développement du biofilm au niveau des canalisations d'eau de l'unité dentaire CHU Tlemcen. *Revue de Microbiologie Industrielle, Sanitaire, et Environnementale*. 8(2): 108-119.

Communications

Lachachi M., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I., Khadir A., Rebiahi S. 2011. Etude de la résistance aux aminosides des souches de *Staphylococcus aureus* isolée du service de chirurgie générale CHU de Tlemcen. Colloque nationale d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales. Alger.

Lachachi M., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I. 2011. Etude de la résistance aux aminosides des souches de *Staphylococcus aureus* isolée du service de chirurgie générale CHU de Tlemcen. Colloque international sur la problématique de l'émergence de bactéries multirésistantes aux antibiotiques et nouvelles approches thérapeutiques. Maroc Meknés.

Lachachi M., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I., Khadir A., Rebiahi S. 2011. Etude de la résistance aux aminosides des souches de *Staphylococcus aureus* isolée du service de chirurgie générale CHU de Tlemcen. Colloque national de la Société Algérienne de Biologie clinique. Alger.

Lachachi M., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I. 2012. Evaluation de la formation de biofilms chez les staphylocoques isolées à partir des tubulures de l'unité dentaire - CHU de Tlemcen. Colloque national de la 5^{ème} journée nationale d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales. Alger.

Lachachi M., Hassaine H., Belifa S., M'hamedi I., Kara Terki I., Masdoua N., Didi W.
2013. Evaluation and antimicrobial resistance in staphylococci biofilms isolated from medical devices of dental unit CHU Tlemcen. 2013. 4^{ème} international Workshop on industrial Biotechnology Tlemcen.

Lachachi M., Hassaine H., Bellifa S., M'hamedi I., Kara Terki I., Masdoua N., Didi W.
2014. Les infections associées aux soins dentaires et l'isolements des staphylocoques a partir des tubulures connecté aux pièces a main dans l'unité dentaire CHU Tlemcen. Colloque national de la 7^{ème} journée nationale d'hygiène hospitalière et de lutte contre les infections nosocomiales. Alger.

ملخص

في السنوات الأخيرة، تشكل الشريط الحيوي في خطوط المياه بوحدة طب الأسنان جذب الكثير من الاهتمام و القلق، حيث ان أنابيب الم ياه بوحدة طب الأسنان تمثل بيئة مثالية لنمو الكائنات الحية الدقيقة الصادرة عن الفم. الهدف من هذا العمل هو دراسة الجودة البكتريولوجية للمياه المستخدمة في كراسي طب الأسنان في مستشفى جامعة تلمسان، عزل البكتيريا من أنابيب المياه، تقييم قدرتها على إنتاج الشريط الحيوي، البحث عن الجينات *icaADBC* المسؤولة عن تشكيل الشريط الحيوي و الجينات السمية للمكورات العنقودية وكذلك التعرف على أصل تلوث أنابيب المياه. وقد أثبتت نتائج الدراسة البكتريولوجية لمياه الأنابيب أنها غير صالحة للاستخدام حيث تم عزل 87 سلالة من 13 انبوب للماء تشمل (87/56) عصيات سالبة الجرام و (87/31) مكورات إيجابية الجرام. تم الكشف عن إنتاج الشريط الحيوي عند المكورات العنقودية لدى 31/26 عزلة ب TCP، لدى 31/22 عزلة بطريقة TM و عند 31/20 عزلة بطريقة الCRA. تم الكشف عن وجود الاوبرون *ica* عند 31/14 عزلة. تم البحث كذلك عن مقدار حدة 31/5 عزلة إيجابية لواحد أو أكثر من الجينات السمية و قد أثبتت النتائج أن هناك ظاهرة شفت أو امتصاص بواسطة أجزاء اليد مما يؤدي إلى صعود الجراثيم من تجاوبف الفم للمرضى إلى أنابيب المياه والتي بدورها قد تكون مصدرا للانتقال التلوث.

كلمات مفتاحية : أنابيب المياه بوحدة طب الأسنان، بكتيريا، الشريط الحيوي، الاوبرون *ica*، الجينات السمية، التلوث المتنقل.

Résumé

Depuis quelques années, la formation de biofilm dans les conduites d'eau des unités dentaires suscite de plus en plus d'intérêt et d'inquiétude. Les tubulures d'eau des unités dentaires constituent un milieu de croissance idéal pour les microorganismes provenant de l'aqueduc municipal et les micro-organismes oraux. L'objectif de ce travail est d'étudier la qualité bactériologique de l'eau utilisée dans les fauteuils dentaires du CHU de Tlemcen, d'isoler les bactéries des tubulures d'eau, d'évaluer leurs capacités à produire des biofilms, de rechercher les gènes responsables de la formation de biofilm *icaADBC*, les gènes toxiques staphylococciques et de mettre en évidence l'origine de la contamination des tubulures d'eau. Les résultats du contrôle bactériologique de l'eau des tubulures ont révélé que celle-ci était impropre à l'utilisation. 87 souches ont été isolées des 13 tubulures d'eau, celles-ci comprennent 56 bacilles à Gram négatif et 31/87 cocci à Gram positif. La production de biofilm chez les staphylocoques a été détectée chez 26/31 des isolats par TCP et 20/31 des isolats par la méthode de l'ARC. L'opéron *ica* été présent chez 14/31 souches. La recherche de la virulence a été détectée chez 5/31 isolats positifs pour un ou plusieurs gènes toxiques, les résultats obtenus confirment qu'il existe un phénomène d'aspiration par les pièces à main conduisant à la remontée des germes des cavités buccales de patients vers la tubulure d'eau qui pourra être à son tour source d'une contamination croisée.

Mots clés : Tubulure d'eau de l'unité dentaire- bactérie- biofilm- *ica* opéron-gène toxique-contamination croisée.

Abstrat

In recent years, biofilm formation in the water lines of dental units is attracting more and more interest and concern. The water pipes of the dental units are an ideal growth medium for microorganisms from the municipal water and oral microorganisms. The objective of this work is to study the bacteriological quality of the water used in dental chairs the University Hospital of Tlemcen, isolate bacteria from water pipes, to evaluate their ability to produce biofilms, search the genes responsible for the formation of biofilm *icaADBC* the staphylococcal toxin genes and to identify the origin of the contamination of water pipes. The results of the bacteriological water control manifolds have proven that it was unfit for use. 87 strains were isolated from 13 water necked thereof include (56/87) and Gram-negative bacilli (31/87) Gram positive cocci. The production of biofilm in staphylococci was detected in 26/31 isolates by TCP and 20/31 isolates by the method of the CRA. The presence of the *ica* operon was detected in 14/31 strains. Search virulence was detected in 5/31 isolates positive for one or more toxin genes, the results confirm that there is a suction phenomenon parts Hand leading to the rise of germs from the oral cavities of patients to the water manifold and which may in turn be a source of cross-contamination.

Key words: Dental unit waterlines- bacteria-biofilm- toxin genes- *ica* genes- cross-contamination.