

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Centre Universitaire Belhadj Bouchaib d'Ain-Temouchent



Institut des Sciences
Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Pour l'obtention du Diplôme de Master en science biologique

Option : Microbiologie appliquée

Présenté par :

Mlle. Tissourassi Imene

Mme. Tolba Imene

—
Evaluation de l'effet antibiofilm d'un désinfectant à base d'une substance naturelle sur des tubulures d'eau de l'unité dentaire d'Ain Temouchent

Encadrant :

Mme. Lachachi Meriem

Maitre de conférences "B" au C.U.B.B.A.T.

Soutenu en juin 2020

Devant le jury composé de :

Président : **Mr.** Benyamina Sofiane Maitre de conférences "B" au C.U.B.B.A.T

Examinatrice : **Mme.** Madani Khadija Maitre assistante "A" au C.U.B.B.A.T

Encadrant : **Mme.** Lachachi Meriem Maitre de conférences "B" au C.U.B.B.A.

Remerciements

Louange à notre Seigneur "ALLAH" qui nous a doté de la merveilleuse faculté de raisonnement. Louange à notre Créateur qui nous a incité à acquérir le savoir.

Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadreur Mme LACHACHI Meriem. Ce fut une grande fierté et un honneur pour nous de travailler sous sa houlette. Par ses judicieux conseils qui ont contribué à éclairer nos réflexions, par sa patience et sa disponibilité, nous lui vouons une grande admiration.

Au terme de ce modeste travail, nous profitons de cette occasion pour adresser nos vifs remerciements à tous les professeurs de Centre Universitaire Belhadj Bouchaïb d'Ain-Temouchent et à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont contribué à notre formation.

Nous exprimons notre profonde gratitude à monsieur Benyamina Sofiane pour sa grande contribution à notre formation et pour tout l'intérêt qu'il porte à celle-ci en acceptant de présider le jury de notre soutenance.

Nos remerciements s'adressent également à Mme Madani Khadidja pour nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail.

Nous remercions tous les intervenants qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail et nous exprimons particulièrement notre reconnaissance à nos amies et collègues, Rouba Achwak, Talbi Safaa, Oumaouch Salima, Moussaoui Rayhana, Messoudi Khawla, les sœurs Taher Berrabah Rania et Chahea, les sœurs Khoualef Zahra et Fatiha, Rahmani Chaima, Medjahed Imene, Si Bouazza Kouloud, Zenesseni Imene, Senoussi Khayra qui ont apporté leur soutien moral et intellectuel pendant nos études, leur souvenir restera gravé dans nos mémoires.

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Synthèse bibliographique.....	2
I. Unités des soins dentaires	3
1. Les unités dentaires.....	3
2. Qualité de l'eau au siens des unités dentaires	3
3. Les agents pathogènes d'origine hydrique.....	4
4. Les tubulures d'eau des unités dentaires	4
II. Biofilm des unités des soins dentaires	5
1. Biofilm et tubulure d'eau dentaire	5
2. Les facteurs influençant la formation de biofilm.....	5
III. Les infections liées aux soins.....	6
1. Transmission d'infection pendant les soins dentaires	7
2. L'infection croisée au sien des unités dentaires	7
IV. Effet antimicrobien à partir des substances naturelles	7
1. La vitamine C ou acide ascorbique	8
a) Effet antibactérien de la vitamine C.....	9
b) Effet antioxydant de la vitamine C.....	9
Matériels et méthodes.....	10
I. Lieu d'étude	11
II. Prélèvement et échantillonnage.....	11
III. Préparation des échantillons de tubulures.....	11
IV. Ensemencement et isolement des souches	11
V. Purification et identifications des souches	12

1. Etude macroscopique.....	12
2. Etude microscopique.....	12
3. Test de coagulase.....	12
4. Etude des caractères biochimiques par la galerie Api 20 ^E	12
VI. Détection de la formation du biofilm chez les staphylocoques	13
1. Méthode de plaque de culture de tissus (TCP)	13
VII. Etude de l'activité antibactérienne de la vitamine C	15
1. Dosage de la vitamine C.....	15
2. Méthodes des puits.....	15
Résultats et discussions.....	16
I. Prélèvement.....	17
II. Identification bactérienne.....	17
1. Sur milieu Mac Conkey	17
2. Sur milieu Chapman.....	19
3. Test de coagulase pour l'identification des staphylocoques	21
III. Détection de la formation du biofilm chez les staphylocoques à coagulase positif	24
1. La technique de microplaque 96 puits (TCP)	24
a) Lecture de microplaque par un lecteur d'absorbance	25
IV. Etude de l'activité antimicrobienne de la vitamine C.....	26
1. Méthode des puits.....	26
Conclusion.....	30
Références bibliographiques.....	32
Annexes.....	39

Liste des abréviations

BHIB: Bouillon Cœur cerveau

CV: Cristal violet

CEUD : Circuits d'Eau des Unités Dentaires

ILS : Infection liée aux soins

FD : Fauteuil Dentaire

DO : Densité optique

EPS : Exopolysaccharide

TCP : Méthode de Plaque de Culture de Tissus

SCP : Staphylocoques à Coagulase Positive

SCN : Staphylocoques à Coagulase Négative

CGP : Cocci à Gram Positif

BGN : Bacilles Gram Négatif

Mg : Milligramme

ml : millilitre

pH : Potentiel d'hygiène

Api 20^E : Appareillage et Procédés d'identification 20 E (E : Entérobactéries)

Liste des figures

Figure 1 : Représentation d'une unité de soins dentaire.....	3
Figure 2 : Les tubulures d'eau des unités dentaires.....	5
Figure 3 : Préparation de l'échantillon de la tubulure de l'unité dentaire de la clinique AL-Sebbah EPSP Ain Temouchent.....	11
Figure 4 : Ensemencement et isolement des souches.....	11
Figure 5 : Méthode de microplaque de culture de tissu (TCP).....	14
Figure 6 : Méthode de puits.....	15
Figure 7 : Représentation de l'identification des entérobactéries.....	17
Figure 8 : Aspects des colonies sur milieu Mac Conkey.....	18
Figure 9 : Aspect microscopique des bacilles a Gram négatif par la coloration de Gram.....	18
Figure 10 : Identification des souches sur galerie Api 20 ^E	19
Figure 11 : Aspect macroscopique des staphylocoques sur milieu Chapman.....	20
Figure 12 : Aspect microscopique des cocci a Gram positif par la coloration de Gram.....	20
Figure 13 : Identification des staphylocoques par le test coagulase.....	21
Figure 14 : Formation de biofilm par la méthode TCP.....	25
Figure 15 : Mesure des DO de formation de biofilm chez les souches de staphylocoques....	25
Figure 16 : Résultat de l'effet antibactérien de la vitamine C avec la méthode des puits.....	26

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les sources végétales de vitamine C.....	1
Tableau 2 : Classification de l'adhésion des <i>Staphylocoques spp</i> selon (Mathur <i>et al</i> , 2016).....	14
Tableau 3 : Résultats de test coagulase.....	21
Tableau 4 : Résultats d'identification.....	22
Tableau 5 : Classification de l'adhésion des souches staphylocoques.....	25
Tableau 6 : Effet des concentrations croissantes de la vitamine C sur la croissance des staphylocoques.....	27
Tableau 7 : Lecture de la galerie Api 20 ^E	42

Introduction

Introduction

La médecine dentaire et la chirurgie buccale comme de nombreuses pratiques médico-chirurgicales peuvent causer des risques distincts pour le patient et l'équipe dentaire (**Damien et al, 2016**).

La qualité de l'eau de l'unité dentaire est d'une importance considérable car les patients et les membres de l'équipe dentaire y sont régulièrement exposés, ainsi qu'aux aérosols provenant des unités dentaires. La caractéristique unique des conduites d'eau du fauteuil dentaire est sa capacité à développer rapidement un biofilm sur les conduites d'approvisionnement en eau auquel s'associe la formation d'aérosols potentiellement contaminés (**Pankhurst et al, 2011**).

Les tubulures d'eau dentaire généralement utilisées dans les cabinets dentaires sont rarement désinfectées, en particulier la formation de biofilm présente des difficultés à maintenir des circuits d'eau des unités de soin dentaire propre pendant la pratique dentaire de routine (**Coleman et al, 2009**).

Ce biofilm en lui-même ne pose pas de problème de contamination, ce sont les bactéries pathogènes qui s'échappent et se libèrent dans l'eau de la conduite qui peuvent déclencher une réaction inflammatoire lors de l'utilisation des pièces à main.

Plusieurs désinfectants à base de substances naturelles peuvent avoir un effet antibactérien afin d'éliminer la formation du biofilm au niveau de la paroi interne des tubulures dentaires et réduire les infections croisées lors des soins dentaires naturels (**Levy et al, 2014**).

C'est dans cet objectif que nous proposons cette étude qui consiste à

- L'isolement et l'identification des bactéries à partir des tubulures d'eau liés des pièces à main des fauteuils dentaires.
- L'évaluation de la capacité de certaines souches bactériennes isolées des tubulures d'eau à produire des biofilms.
- La recherche de l'effet antibactérien de la vitamine C sur des souches formatrices de biofilm.

Synthèse bibliographique

I. Unités des soins dentaires

1. Les unités dentaires

Le système d'aspiration et d'alimentation en eau consiste en une structure élaborée de tubes en plastique flexibles reliés entre eux alimentant les instruments rotatifs et l'appareil à ultrasons formant l'unité d'aspiration d'eau (**figure 1**).

La structure spécifique du fauteuil dentaire (FD) favorise la contamination microbienne et la mise en place d'un biofilm dans les conduites d'eau des unités dentaires (CEUD) (**Lino et al, 2013**).

L'eau qui traverse le FD constitue un facteur de risque, il est responsable de la production des aérosols en raison du contact avec le sang et la salive du patient, les micro-organismes présents dans les conduites d'eau et le microbiote buccal du patient. En association avec les germes pathogènes réaspirés au niveau de l'instrumentation dynamique, le biofilm recouvre toutes les parois internes des circuits de l'unité dentaire (**Céline et al, 2015**).



Figure 1 : Représentation d'une unité de soin dentaire (**Costa, 2015**)

2. Qualité de l'eau au siens des unités dentaires

La qualité de l'eau de sortie des CEUD est directement influencée par le contenu physique, chimique et la qualité microbiologique.

L'état des canalisations du réseau de distribution, la température, le type de matériau de tuyau utilisé jouent également un rôle majeur dans la qualité de l'eau (**Coleman et al, 2009**

Plus la qualité de l'eau fournie aux CEUD est mauvaise, plus le biofilm se forme facilement sur ses surfaces internes (Colemane *et al*, 2009).

3. Les agents pathogènes d'origine hydrique

Il semble que la présence de films biologiques dans les conduites d'eau soit reliée à des valeurs de base plus élevées, des agents pathogènes opportunistes mentionnés ci-dessous à la sortie de la conduite d'eau. On peut isoler la souche *Pseudomonas aeruginosa* dans 15 à 24 % des échantillons d'eau tirés des unités dentaires. Les microorganismes du genre *Legionella spp* se retrouvent régulièrement dans les conduites des unités dentaires. La forte prévalence de ces microorganismes pourrait être attribuable à la présence dans les conduites d'amibes libres qui sont des hôtes importants pour *Legionella pneumophila* et d'autres bactéries pathogènes : Les mycobactéries non tuberculeuses, et les staphylocoques.

Lorsqu'un agent pathogène atteint la paroi de la tubulure, le processus de colonisation commence, la bactérie prolifère dans le film biologique. Cependant, ce sont les bactéries qui s'échappent du film biologique et qui quittent les conduites d'eau qui présentent des risques d'infection (Barbeau, 2000).

4. Les tubulures d'eau des unités dentaires

Les Circuits d'eau des unités dentaires sont une partie intégrante de l'équipement de chirurgie dentaire. Ils fournissent de l'eau en tant que liquide de refroidissement pour turbines à air et détartreurs à ultrasons, spray à air et eau et pour le rinçage des tissus buccaux pendant les traitements de soins dentaires (Szymańska *et al*, 2008). Ils sont connectés par un réseau de petits tuyaux en plastiques étroits d'environ 2 à 3 mm de diamètre interne appelé tubulures faites de polychlorure de vinyle ou de polyuréthane dans lesquelles circulent l'air et l'eau servent à activer ou refroidir ces instruments (Ruchanee *et al*, 2018).

La plupart des unités dentaires sont raccordées directement au réseau d'aqueduc municipal et même si elle est traitée au chlore, cette eau héberge une microflore variée composée de bactéries, de levures, de champignons, de virus et de protozoaires (Barbeau, 2000).



Figure 2 : Les tubulures d'eau des unités dentaires

II. Biofilm des unités des soins dentaires

1. Biofilm et tubulures d'eau dentaire

Les biofilms sont des communautés microbiennes constituées de bactéries, de levures, de moisissures, de virus, d'amibes etc. Ces micro-organismes colonisent les supports pour s'y développer. Dans la plupart des biofilms, les micro-organismes représentent 10 % du poids sec et la matrice d'EPS, produite par eux-mêmes, compte 90 % d'eau. Les réseaux d'eau potable auxquels sont raccordées les unités de soins dentaires sont traités chimiquement. Dans le cas d'un traitement inefficace ou d'un mauvais entretien, la contamination des réseaux par des micro-organismes conduit à la formation d'un biofilm multi-espèces sur les conduites des unités dentaires (**Aline et al, 2011**).

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 entrent en contact avec la paroi des conduites d'eau des unités dentaires et forment un biofilm (**Barbeau, 1998**).

Depuis quelques années, la formation de films biologiques dans les pièces d'équipement et les conduites d'eau des unités dentaires suscite de plus en plus d'intérêt et d'inquiétude (**J Can, 2000**).

2. Les facteurs influençant la formation de biofilm

Une accumulation importante de biofilm dans les canalisations d'eau des unités dentaires est influencée par plusieurs facteurs, dont les périodes d'inutilisation des appareils, comme la nuit

et les weekends. Ce facteur favorise grandement la prolifération bactérienne et l'établissement d'un biofilm sur les parois internes des canalisations et le biofilm n'est pas soumis à des forces de cisaillement suffisantes pour l'expulser.

De plus, la composition de différentes tubulures (PVC, polyuréthane...), et la température moyenne de la plupart des circuits des unités d'eau dentaires est de 23°C, peuvent encourager la prolifération des microorganismes tels que les espèces bactériennes humérus qui préfèrent une température plus élevée. (**Kumar et al, 2010**).

Certains CEUD sont également occupés d'un chauffe-eau afin d'être plus confortable pour les patients et d'augmenter les températures jusqu'à 30°C (**Barbot et al, 2012**).

Comme les canalisations d'eau ont un très petit diamètre (2 mm), elles offrent aux microorganismes la possibilité de s'installer et un volume de liquide relativement petit peut expliquer la présence de ces fortes concentrations (**Caroline et al, 2010**).

III. Les infections liées aux soins (ILS)

L'activité au sein des cabinets dentaires comporte certaines particularités. Elle comprend de très nombreux actes invasifs, car elle est particulièrement exposée au sang ainsi qu'aux produits biologiques, et elle utilise des instruments complexes dans un milieu naturellement septique (**Philippe, 2013**).

Il serait très important, bien que très difficile, de mettre en place un système de surveillance de l'infection causée par un microorganisme et contractée à l'occasion d'un acte de soin dentaire sur l'ensemble de notre système médical de soins, car il génère un coût économique et humain considérable (**Jean, 2002**).

1. Transmission d'infections pendant les soins dentaires

- Par l'intermédiaire des mains souillées du praticien ou de l'assistant(e).
- Directement par voie aérienne interhumaine ou indirectement par l'intermédiaire d'aérosols générés par les soins.
- La présence fréquente de bactéries pathogènes au niveau de l'oropharynx et de la cavité buccale.
- La contamination de la cavité buccale par le sang lors d'actes invasifs, qui s'ajoute aux agents infectieux présents dans l'oropharynx, et éventuellement présents dans le sang tels que les virus des hépatites B, delta et C et le VIH.
- Entre deux traitements de patients, par des instruments insuffisamment désinfectés ou non stérilisés par une faute d'asepsie ou de l'environnement (**Dent, 2013**).

2. Les infections croisées au sein des unités dentaires

Les infections croisées peuvent être définies comme la transmission d'agents infectieux entre les patients et le personnel dans un environnement clinique. L'agent infectieux peut être transmis par des gouttelettes de sang, de la salive et des instruments contaminés par contact direct, inhalation ou inoculation (**Dent, 2013**).

La plupart des patients (75,2%) d'après l'étude de (**Dilini et al, 2017**), étaient conscients du risque de transmission de l'infection pendant les traitements dentaires. Les participants ont révélé leur crainte d'une transmission potentielle d'agents pathogènes à diffusion hémotogène en milieu dentaire. La sensibilisation du personnel médical à la stérilisation des instruments dentaires était faible.

IV. Effet antimicrobien à partir des substances naturelles

Les propriétés antimicrobiennes des plantes aromatiques et médicinales sont connues depuis l'antiquité. Toutefois, il aura fallu attendre le début du 20^{ème} siècle pour que les scientifiques commencent à s'y intéresser. Récemment, l'attention s'est portée sur les herbes et les épices qui peuvent être employés pour se protéger contre les effets des biofilms (**S. Athamena et al, 2010**).

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique. Ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. L'évaluation de ces activités demeure une tâche qui peut faire l'intérêt de nombreuses études. Actuellement, plusieurs questions sont soulevées concernant la sécurité et l'efficacité des produits chimiques utilisés

en médecine. En effet, durant les 20 dernières années, il a été prouvé que l'efficacité des antibiotiques a fortement diminuée. Les bactéries sont devenues de plus en plus résistantes (**Huetz et al, 2000**).

L'usage généralisé des antibiotiques et la prescription à grande échelle parfois inappropriée de ces agents ont entraîné la forte adaptation des souches bactériennes et la sélection des souches multi-résistantes. Face aux limites thérapeutiques des antibiotiques classiques, les scientifiques ont été poussés à orienter les recherches vers des nouvelles voies et surtout l'utilisation des principes actifs des plantes (composés phénoliques, alcaloïdes, huiles essentielles...) comme agents antibactériens (**S. Athamena et al, 2010**).

1. La vitamine C ou acide ascorbique

La vitamine C est une substance qui joue un rôle important dans le fonctionnement métabolique. C'est une vitamine hydrosoluble, sensible à la chaleur, aux ultraviolets et à l'oxygène, la demi-vie est de 10 à 20 jours (**Olivier, 2004**).

Depuis 1970, de nombreuses études ont permis de préciser les diverses propriétés physicochimiques (instabilité due à une capacité d'auto-oxydation au contact de l'oxygène de l'air, accélérée entre autres par ions métalliques), la vitamine C peut exister sous forme réduite, l'acide ascorbique, et sous forme oxydée, l'acide déhydroascorbique. Le couple acide ascorbique/ acide dehydroascorbique permet le transfert d'un ou deux électrons. La vitamine C intervient de cette façon dans diverses réactions : hydroxylation, inhibition de la formation endogène de nitrosamines, métabolisme de l'histamine, intervention dans les réactions immunitaires anti-infectieuses, oxydoréduction au niveau cellulaire, capacité à piéger les radicaux libres (**Chrisian et al 1999**).

Tableau 1 : Les sources végétales de vitamine C (**Desauniers et al, 2003**)

Aliments	(mg)
Goyave	199
Poivron rouge, cru ou cuit	101-166
Poivron vert, cru ou cuit	54 -132
Papaye	94
Kiwi	71
Orange	70
Jus d'orange	43-66
Mangue	57

a) Effet antibactérien de la vitamine C

Le recours à la vitamine C comme médicament pour prévenir les maladies, et non simplement pour compenser au minimum des carences, mais c'est juste l'une des plus grandes découvertes médicales du XXe siècle, si on la considère par le prisme des vies, souffrances et budgets sociaux économisés, son importance dépasse celle des médicaments miracles comme les antibiotiques (**Rueff, 2000**).

Il a été constaté que les infections bactériennes sont sensibles même à un apport minimal de vitamine C (**Hikey et al, 2014**).

b) Effet antioxydant de la vitamine C

Le stress oxydatif est à l'origine de dégâts cellulaires consécutifs à l'apparition de cassures et mutation au sien de l'ADN, c'est ainsi qui il porte une responsabilité variable dans le développement de maladies aussi courantes que les affections cardiovasculaires et les cancers (**Jeans Never et Joel, 2008**).

En biologie, les toutes premières recherches sur les antioxydants ont montré leur capacité à réduire l'oxydation des acides gras insaturés. C'est plus tard avec l'identification des vitamines C et E qu'est apparue l'importance des antioxydants en biochimie (**Delraigne et al, 2008**).

La vitamine C est un excellent réducteur, c'est pour cette raison qu'on lui accorde des propriétés antioxydantes qui présentent d'innombrables bienfaits sur l'ensemble de l'organisme, par conséquent elle bloque la production de radicaux libres (**Carr.A et al, 1999**).

En tant qu'acide ascorbique, la vitamine C est un puissant antioxydant permettant d'expliquer son rôle dans la prévention de certaines maladies voire certains cancers (**Jeans Never et Joel, 2008**).

Ces différentes études nous ont permis de réfléchir à l'activité antibactérienne de la vitamine C et l'utiliser comme un désinfectant naturel sur des souches pathogènes formatrices de biofilms au niveau des tubulures dentaires.

Matériels et méthodes

I. Lieu d'étude

Cette étude a été réalisée au niveau du laboratoire de microbiologie de l'université Belhadj BOUCHAIB - Ain Témouchent (CUBBAT) en février 2020.

II. Prélèvement et échantillonnage

Le 26 février 2020, des prélèvements ont été effectués à partir de l'unité dentaire de la clinique Al-Sebbah, EPSP Ain Temouchent qui nous ont permis de récupérer 5 tubulures liées aux pièces à main des différents fauteuils dentaires afin d'isoler des souches bactériennes.

III. Préparation des échantillons de tubulures

Dans des conditions stériles, une partie de 10 centimètres à partir de chaque tubulure a été sectionnée délicatement à l'aide d'un bistouri (**Figure 3**).



Figure 3 : Préparation de l'échantillon de la tubulure de l'unité dentaire de la clinique Al Sebbah EPSP Ain Temouchent

IV. Ensemencement et isolement des souches

La partie externe des tubulures a été désinfectée à l'eau de javel et rincée avec de l'eau distillée, chaque partie sélectionnée a été immergée dans un tube contenant 9 ml de milieu BHIB et ensuite incubée pendant 24h à 37°C (**Figure 4**).

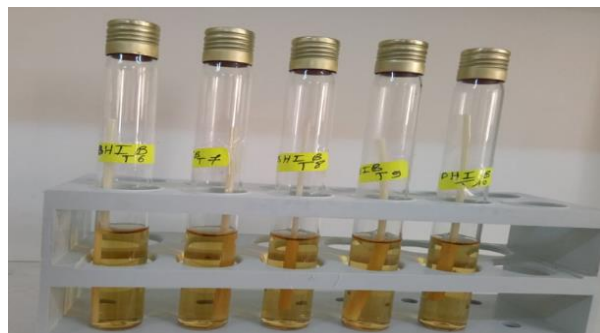


Figure 4 : Ensemencement et isolement des souches

A partir des précultures obtenues, un ensemencement a été effectué sur milieu Chapman pour l'isolement des cocci à Gram positif (CGP) et sur milieu Mac Conkey pour l'isolement des bacilles à Gram négatif (BGN). Les boîtes ensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

V. Purification et identification des souches

La purification des bactéries a été réalisée par l'ensemencement d'une seule colonie sur une autre boîte de même milieu gélosé jusqu'à l'obtention de souches pures qui seront identifiées par une série d'étapes.

1. Etude macroscopique

L'évaluation de la croissance des colonies bactériennes sur les milieux comprenait leurs caractéristiques morphologiques macroscopiques, telles que la taille et la forme des colonies, la surface et la marge, la couleur, l'opacité et la texture.

2. Etude microscopique

Des préparations microscopiques ont été faites à partir des colonies d'apparences différentes avec l'utilisation de la méthode de coloration de Gram. L'analyse de l'image microscopique des cellules bactériennes permet de les différencier en fonction de leur coloration.

3. Test de coagulase

Une suspension bactérienne a été préparée, quelques colonies de staphylocoques ont été ensemencées dans 5ml de milieu BHIB, et ensuite incubées pendant 24h à 37°C.

Après incubation, 0,5 ml de plasma humain a été mélangé avec 0,5 ml de suspension bactérienne dans des tubes à hémolyse et ensuite incubé pendant 24h à 37°C.

Ensuite, compte tenu des caractéristiques précédemment décrites, les résultats obtenus au cours de chaque étape permettent l'orientation des démarches ultérieures.

4. Etude des caractères biochimiques par la galerie Api 20^E

La galerie Api 20^E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries, et autres à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données (Murray *et al*, 1999).

Elle comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de

réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture (Annexe 2), et l'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification (Moustardier *et al*, 1972).

VI. Détection de la formation du biofilm chez les staphylocoques

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

Plusieurs chercheurs ont étudié les stratégies employées par les micro-organismes pour produire des biofilms, ils ont montré que les bactéries productrices de biofilm sécrètent certaines substances chimiques qui les protègent contre les désinfectants, les agents antimicrobiens et des systèmes immunitaires de l'hôte (Saitou, 2009).

Des méthodes classiques de la détection de la production de biofilms *in vitro* ont été établies, telle que la méthode quantitative de la microplaque 96 puits (Freeman *et al*, 1989 ; Mathur *et al*, 2006).

Le protocole d'essai TCP décrit par Christensen *et al*, (1985) est le plus largement utilisé. Il est considéré comme la norme d'essai pour la détection de la formation de biofilms par les staphylocoques et à l'avantage d'être un modèle quantitatif pour étudier l'adhérence des staphylocoques sur les dispositifs biomédicaux (Pragyan *et al*, 2016 ; Mathur *et al*, 2006).

- Préparation de suspension bactérienne

Quelques colonies ont étéensemencées dans des tubes qui contiennent 5ml de BHIB, ils sont ensuite incubés pendant 24h à 37°C, le milieu BHIB a été utilisé afin de favoriser la croissance en phase biofilm.

Chaque culture a été ajustée pour l'obtention de DO= 0,08 et diluée au 1/100ème dans le même milieu (BHIB), 9ml de BHIB stérile a été mélangée avec 1ml de suspension bactérienne.

Parallèlement, 150µl de BHIB stérile a été déposé dans les puits de la microplaque, ensuite chaque puits a été rempli avec 20µl de cette dilution, et des puits non inoculés ont été utilisés comme témoin négatif et incubés à 37°C pendant 24h.

Après incubation, les puits des microplaques ont été rincés par l'eau distillé (200µl) afin d'éliminer les bactéries flottantes planctoniques, puis séchés en position inverse et colorés avec 200µl de Crystal violet (CV) et incubés pendant 30minutes.

Matériels et méthodes

Le colorant incorporé par les cellules ayant adhéré ou ayant formé un biofilm est solubilisé avec 200µl d'éthanol à 95%.

Les plaques sont laissées pour le séchage afin d'évaluer l'importance de la coloration du biofilm en mesurant la densité optique par un lecteur d'absorbance pour microplaques à une longueur d'onde de 590 nm (HOLA et Ruzicka, 2011).

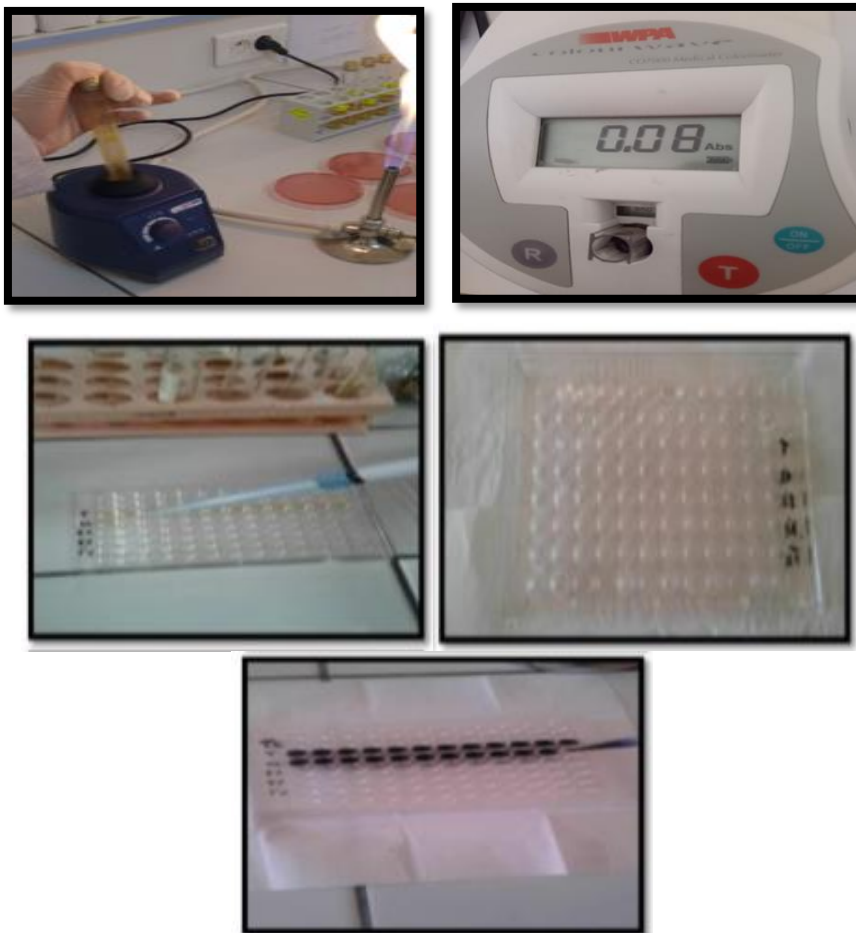


Figure 5 : Méthode de microplaque de culture de tissu (TCP)

Les souches ont été classées comme suit

Tableau 2 : Classification de l'adhésion des *Staphylocoque spp* selon (Mathur *et al*, 2016)

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

VII. Etude de l'activité antibactérienne de la vitamine C

Dans le but de constater l'activité inhibitrice de la vitamine C sur la croissance des différents germes étudiés, une relation concentration-activité de cette substance a été constituée.

1. Dosage de la vitamine C

Des solutions aqueuses de quatre concentrations de 93, 77, 50, 25 mg de la vitamine C en poudre ont été pesées et mélangées avec 1ml d'eau distillée stérile pour chaque souche.

2. Méthodes des puits

La méthode de diffusion sur gélose a été réalisée.

C'est une technique appliquée pour étudier la capacité d'une substance à exercer un effet antibactérien, elle est aussi appelée la technique de dilution en gélose pour la détermination des extrait actifs.

Après le séchage des boîtes, un encensement par écouvillonnage de chaque souche bactérienne a été réalisé sur une gélose perforée au centre à l'aide de la partie supérieure d'une pipette pasteur formant quatre puits pour la substance à tester aux concentrations 93, 77, 50 et 25mg/ml (**Figure 6**). Après 30 min de diffusion à la température du laboratoire, chaque puits reçoit 50µl de la vitamine C en solution, le puit témoin recevant de l'eau distillée. Une boîte sans vitamine C est également ensemencée pour servir de témoin. Les boîtes sont incubées pendant 2 h à 37°C.

La lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8mm (**Abo-Al-Ela et al, 2017**).



Figure 6 : Méthode de puits

Résultats et discussions

I. Prélèvement

Le 26 février 2020, 5 tubulures air/eau de différents fauteuils installés à l'unité dentaire de la clinique Al-Sebbah, EPSP Ain Temouchent ont été retirées pour l'analyse bactériologique.

II. Identification bactérienne

1. Sur milieu Mac Conkey

14 souches de bacilles à Gram négatif (BGN) ont été identifiées.

- 4/14 : *Pseudomonas putida* (29%).
- 3/14 *Acinetobacter baumannii* (22%).
- 2/14 *Escherichia coli* (14%).
- 3/14 *Enterobacter cloacea* (21%).
- 2/14 *Klebsiella pneumoniae* (14 %)

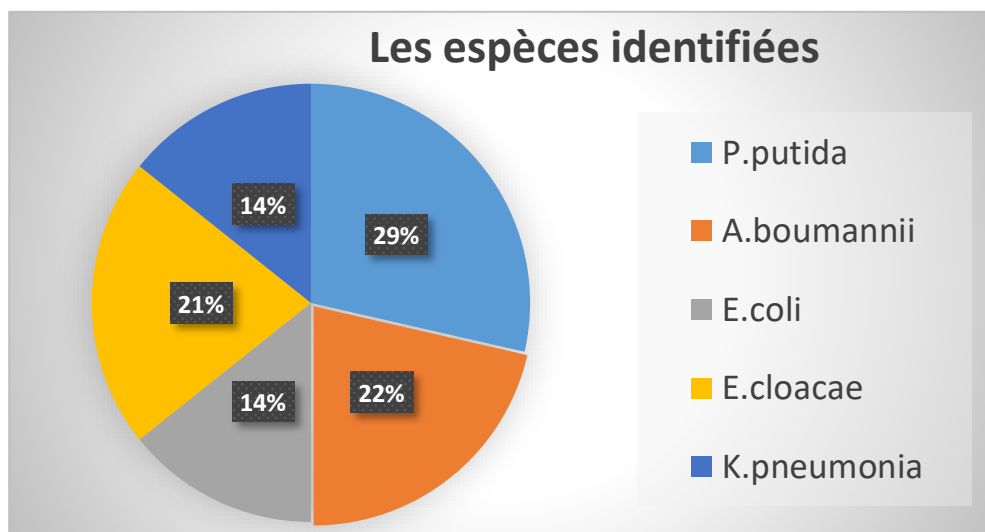


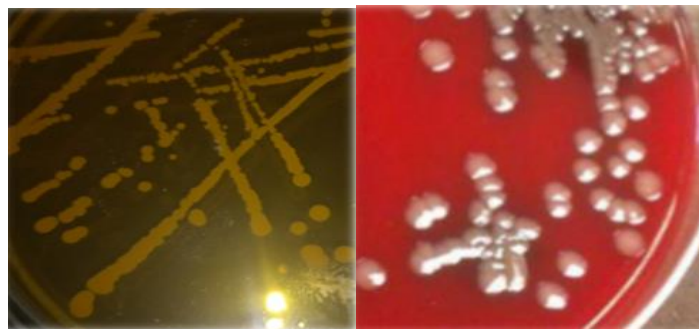
Figure 7 : Représentation de l'identification des entérobactéries

Résultats et discussions

L'aspect des colonies nous a servi pour l'identification macroscopique, 5 aspects sur milieux Mac conkey ont été notés (**Figure 8**).



A : *Escherichia coli* **B**: *Enterobacter cloacea* **C**: *Acinetobacter baumannii*



D : *Pseudomonas putida* **E** : *Klebsiella pneumoniae*

Figure 8 : Aspects des colonies sur milieux Mac conkey

La coloration différentielle les souches isolées a mis en évidence des fins bacilles à Gram négatif colorés en rose souvent incurvés non sporulés (**Figure 9**).

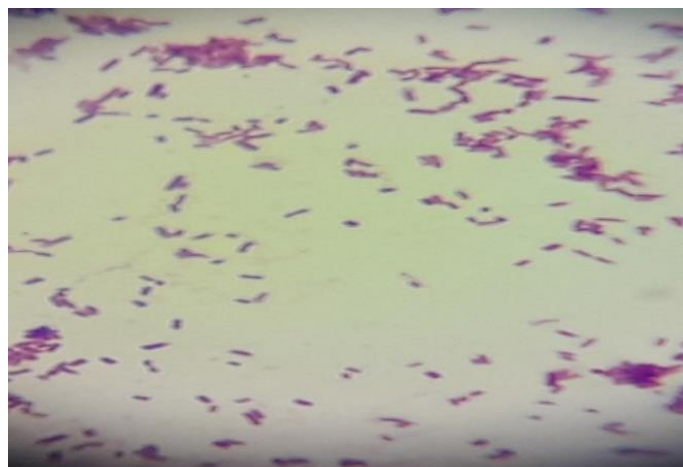


Figure 9 : Aspect microscopique des bacilles à Gram négatif par la coloration de Gram

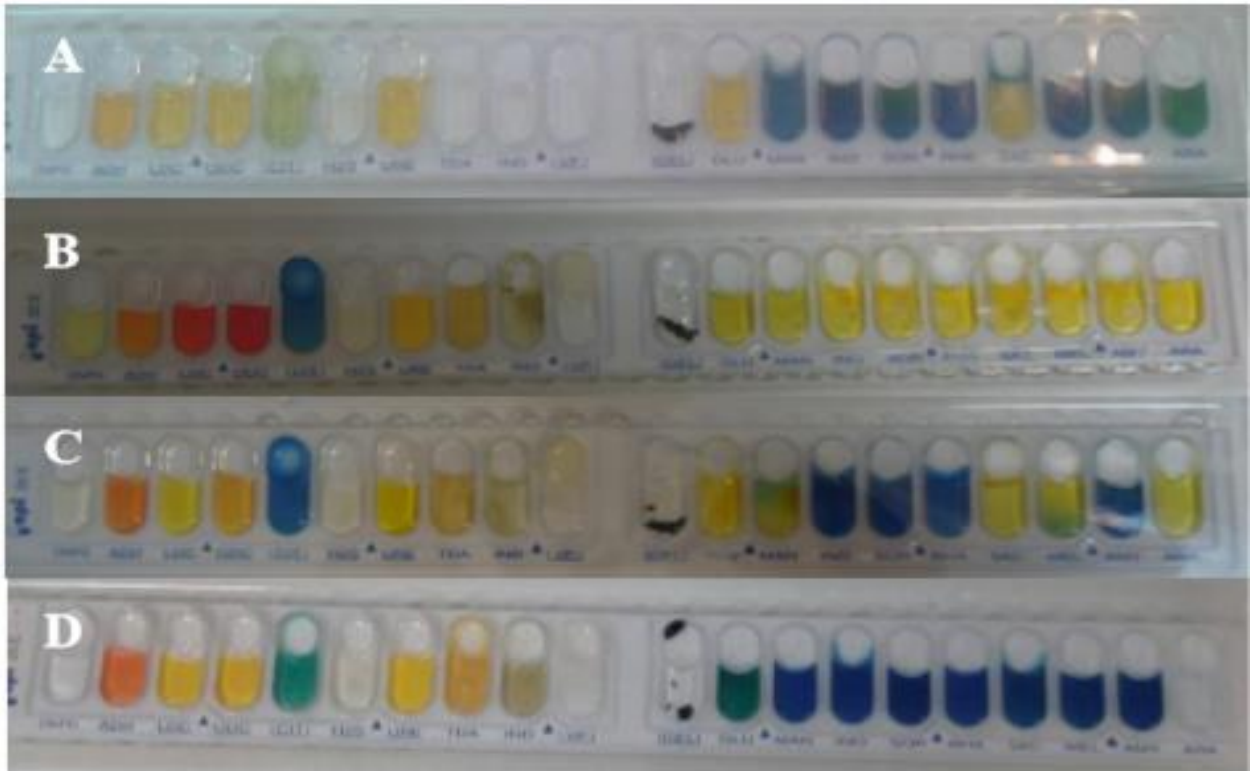


Figure 10 : Identification des souches sur galerie Api20^E

2. Sur milieu Chapman

10 souches de cocci à Gram positifs (CGP) ont été isolées.

6/10 : staphylocoques à coagulase positif (SCP).

4/10 : staphylocoques à coagulase négatif (SCN).

Résultats et discussions

Sur la Géllose Chapman, les colonies présentant l'aspect macroscopique caractéristique des souches de staphylocoques. Le développement bactérien sur le milieu Chapman ne constitue qu'une indication, d'autres bactéries (entérocoques) peuvent y être cultivées. Sur ce milieu, les colonies de staphylocoques apparaissent souvent pigmentées et entourées d'une auréole jaune dans le cas où le mannitol est fermenté, sinon les colonies sont de couleur blanche (**Figure 11**). Les colonies sont arrondies à bords réguliers de 1 à 2 mm de diamètre après 48h d'incubation à 37°C.



A : Staphylocoque à coagulase positif **B** : Staphylocoque à coagulase négatif

Figure 11 : Aspects macroscopiques des staphylocoques sur milieu Chapman

La coloration différentielle des souches isolées a mis en évidence des cocci sphériques, en grappe de raisin, en paires, colorés en violet (**Figure 12**).



Figure 12 : Aspect microscopique des cocci à Gram positif par la coloration de Gram

Résultats et discussions

3. Test de coagulase pour l'identification des staphylocoques

La présence d'une coagulase est utilisée pour distinguer entre les staphylocoques à coagulase positive et les staphylocoques à coagulase négative. En comparant au témoin, la majorité des isolats de staphylocoques possèdent une coagulase libre (**Figure 13**) ; (**Tableau 3**).

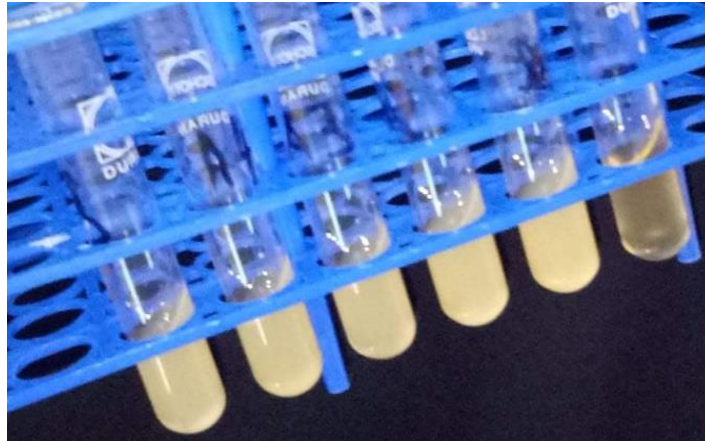


Figure 13 : Identification des staphylocoques par le test coagulase

Tableau 3 : Résultats de test coagulase

Tubes	T1	T 2	T 3	T4	T 5	T6	T7	T8	T9	T10
Test coagulase	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-

La propriété de *Staphylococcus aureus* à provoquer la coagulation d'un plasma est due à la sécrétion d'une protéine extracellulaire ; la Staphylocoagulase ou la coagulase. La recherche de la Staphylocoagulase est le test essentiel qui permet de distinguer les souches potentiellement pathogènes, car la Staphylocoagulase joue un rôle central dans le pouvoir pathogène des Staphylocoques, en leur permettant de lutter contre les anticorps opsonisants et la phagocytose. (**Gemmell et al, 1982**).

Résultats et discussions

Tableau 4 : Résultats d'identification

Milieux de culture	Coloration de Gram	L'espèce selon la galerie Api 20 ^E	L'espèce selon le test coagulase	Nombre de souches
Mac conkey	Gram négatif	<i>Pseudomona putida</i>	-----	4
		<i>Acinetobacter baumannii</i>		3
		<i>Escherichia coli</i>		2
		<i>Enterobacter cloacea Klebsiella pneumoniae</i>		3
				2
Chapman	Gram positif	-----	Staphylocoque à coagulase positif	6
			Staphylocoque à coagulase négatif	4

Après identification de l'ensemble des souches isolées des tubulures, nous avons remarqué un pourcentage élevé des entérobactéries tel que *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, et *Klebsiella pneumoniae* suivi des souches de staphylocoques, les travaux de (Jean Barbeau, 2000) signalent que les films biologiques peuvent être des milieux importants pour la croissance de ces microorganismes, de nombreuses études ultérieures ont trouvé différents agents pathogènes opportunistes dans les CEUD, notamment les espèces *Legionella sp* et *Pseudomonas sp* (Zhang Y et al, 2017).

Résultats et discussions

Les *Pseudomonas* ont une grande capacité à survivre ou se multiplier dans les milieux hydriques. La formation de biofilms leur confère une résistance (**Manizan et al, 2009**).

La présence du genre *Pseudomonas putida* indique que l'eau de l'unité dentaire est une eau putride. Nos résultats concordent avec l'étude de **Manizan et al (2009)** où ils confirment que les souches de *Pseudomonas putida* se trouvent habituellement dans les eaux usées putrides riches en matière organique.

Les espèces *Klebsiella pneumoniae* et *Acinetobacter baumannii* sont des bactéries commensales de la peau et de l'oropharynx des humains (**Roca I et al, 2012 ; lenis djikshorn et al 2007**), leur présence dans l'eau des tubulures explique que la source de contamination des pièces à main pourrait être d'origine humaine et environnementale.

Concernant les *Enterobacter cloacae* et *Escherichia coli* qui sont retrouvées dans l'environnement, et au niveau de la flore commensale chez l'homme, sont capables de passer de l'état commensal à celui de pathogène opportuniste (**K.Aexandre et al, 2016**).

Nous constatons une dominance des souches appartenant aux staphylocoques à coagulase positif qui sont les germes les plus fréquents des isolats.

(**Cirkovik et al, 2017**) confirment que les Staphylocoques à coagulase positif sont des bactéries d'une pathogénicité douteuse dans toutes les maladies humaines.

Les staphylocoques sont les agents pathogènes les plus importants dans les infections liées aux corps étrangers (**Knobloch et al, 2002**).

Nos résultats montrent une présence des staphylocoques à coagulase négatif en petit nombre par rapport aux souches de staphylocoques à coagulase positif.

Ils appartiennent à la flore commensale de la cavité buccale et beaucoup d'informations proviennent des échantillons tels que les rinçages oraux, la salive et les frottis de muqueuses. (**Smith et al, 1999**) signalent que les staphylocoques appartiennent à la flore commensale. Cette caractérisation pourrait être la conséquence de la remontée de ces germes par le phénomène de ré-aspiration qui se produit par les pièces à main et lorsque le praticien cesse de les utiliser (**Legius et al, 2012**) ; (**Valdes et al, 2017**), ainsi les bio aérosols contenant des staphylocoques peuvent pénétrer au profond des instruments refroidis par l'eau et coloniser des surfaces à longue distance de 1 mètre (**Zemouri et al, 2017**).

III. Détection de la formation du biofilm chez les staphylocoques à coagulase positif

1. La technique de microplaque 96 puits (TCP)

D'après les résultats de (Belifa *et al*, 2013 ; Kara Terki *et al*, 2013) la technique TCP reste la meilleure pour le dépistage de la formation de biofilm *in vitro*. Elle permet une détermination quantitative pour comparer et examiner l'adhésion des différentes souches (Racha *et al*, 2012).

La technique TCP est considérée comme test standard pour la détection de la formation de biofilm (Panda *et al* 2016 ; Youn et lee 2017). Elle a l'avantage d'être un outil quantitatif pour comparer l'adhésion de différentes souches (Marthur *et al*, 2006).

Cette technique nous permettra de faire une distinction précise entre les bactéries fortes productrices de biofilms et celles moyennes et faibles, avec une capacité d'examiner un grand nombre d'isolats simultanément. C'est la raison de son utilisation dans notre étude (tableau 5).

En ce qui concerne les staphylocoques, toutes les souches sont formatrices de biofilm par la méthode TCP dans notre étude (figure 15).

(Kara Terki *et al*, 2014) constatait que seul 48% des souches de staphylocoque à coagulase négatif avaient une forte production de biofilm.

(Olazaran *et al*, 2015) isolent à partir des dispositifs médicaux 57 souches de *staphylococcus spp* fortement et modérément formatrices de biofilm.

De même, (Al Azawi *et al*, 2018) signalent que 3 souches de staphylocoque à coagulase négatif étaient fortement formatrices de biofilm et 2 autres étaient modérément formatrices de biofilm.

(Szczuka *et al*, 2015) ont constatés que les souches de SCP sont considérées comme productrices de biofilm. De même (Hsu *et al*, 2015) ont également démontrés une forte formation de biofilm chez les souches staphylococciques.

Par contre l'étude de (Johannes *et al*, 2002), signalent que sur 207 isolats de staphylocoques à coagulase positif faiblement formateurs de biofilm par la TCP, 8 souches portaient le gène de formation de biofilm (icaADBC).

A travers nos résultats la présence des staphylocoques considérés comme flore orale au niveau des cavités buccales des patients peuvent coloniser et former un biofilm sur les parois

Résultats et discussions

internes des tubulures par le phénomène de ré-aspiration (Legius *et al*, 2012 ; Valdes *et al*, 2017 ; Lachachi *et al*, 2014).

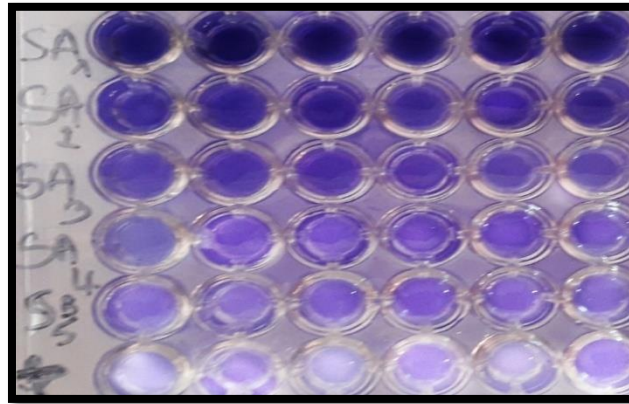


Figure 14 : Formation de biofilm par la méthode TCP

a) Lecture de microplaque par un lecteur d'absorbance

La classification des résultats obtenus présente sur la base du DO témoin (HOLA et Ruzicka, 2011).

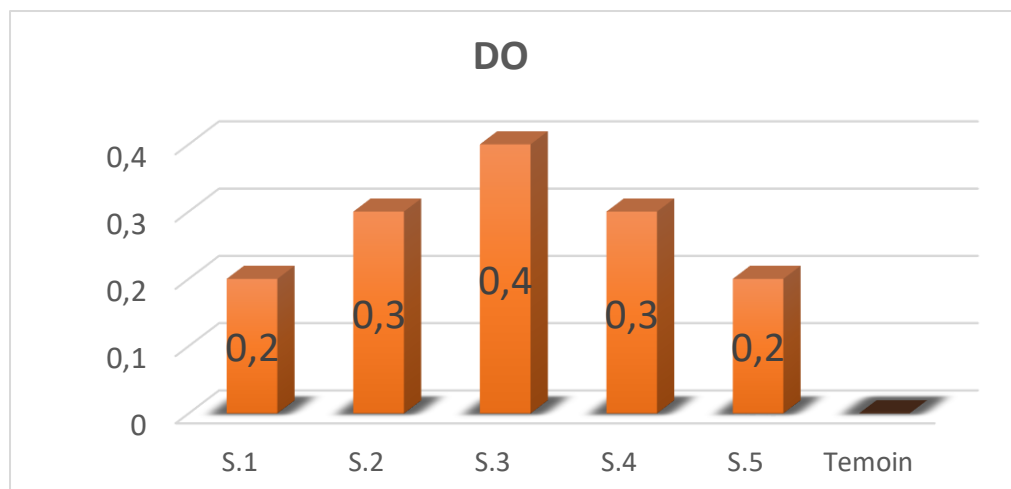


Figure 15 : Mesures des DO de formation de biofilm chez les souches de Staphylocoques

Tableau 5 : Classification de l'adhésion des souches *Staphylococcus aureus*

Souche	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5
Valeur de DO	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2
Formation de biofilm	Modérée	Forte	Forte	Forte	Modérée

IV. Etude de l'activité antimicrobienne de la vitamine C

1. Méthode des puits

Celle-ci consiste en l'étude de l'activité antibactérienne de différentes concentrations de la vitamine C en solution respectivement (93, 77, 50, 25) mg/ml vis-à-vis des staphylocoques à coagulase positif (**Figure 17**).

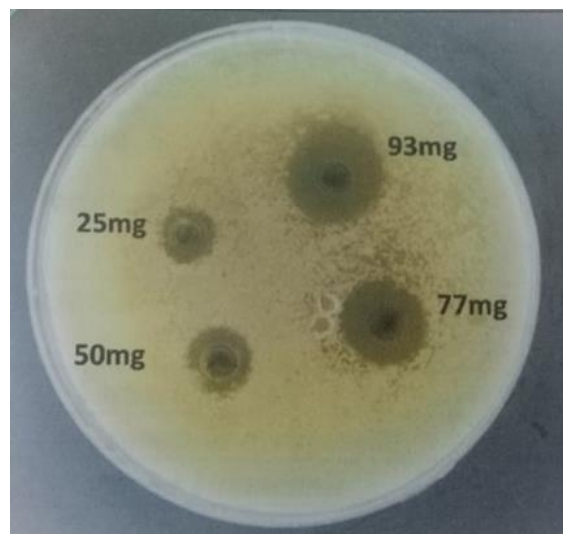


Figure 16 : Résultat de l'effet antibactérien de la vitamine C par la méthode des puits

Résultats et discussions

Tableau 6 : Effet des concentrations croissantes de la vitamine C sur la croissance des staphylocoques

	Concentration de la vitamine C			
Bactéries	93mg /ml	77mg/ml	50mg/ml	25mg/ml
Staph 1	Très bonne activité	Moyennement active	Active	Absence d'activité
Staph 2	Très bonne activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité
Staph 3	Très bonne activité	Moyennement active	Active	Absence d'activité
Staph	Très bonne activité	Moyennement active	Absence d'activité	Absence d'activité
Staph 5	Très bonne activité	Absence d'activité	Absence d'activité	Absence d'activité

>8 mm : active

8,5 – 12 mm : moyennement active

< 8 mm : absence d'activité

< 12 mm : très bonne activité

L'action inhibitrice se manifeste par la formation d'une auréole autour des puits, la lecture des résultats s'effectue par mesure des diamètres des zones d'inhibition. Un produit est considéré actif si le diamètre de la zone d'inhibition est supérieur à 8mm (Ela *et al*, 1996).

Nous remarquons que l'effet antibactérien est proportionnel à la concentration utilisée. Nous avons sélectionné les souches sur la base de leur résistance à au moins une des familles d'antibiotiques.

Résultats et discussions

D'après ces résultats l'activité antimicrobienne de la vitamine C testée à quatre concentrations différentes sur les staphylocoques montrent que la concentration 93mg/ml est l'activité antimicrobienne la plus importante vis-à-vis des 5 souches des staphylocoques testés (figure 17).

Nous avons observé une activité progressive de la vitamine C ce qui prouve son effet sur les biofilms bactériens. **Novac j et al (2004)**, démontrent que l'effet antibiofilm de la vitamine C est dû à l'inactivation du quorum sensing.

Nos résultats sont similaires à ceux de **Isela et al, (2013)** qui ont calculé une CMI d'acide ascorbique nécessaire pour inhiber la croissance microbienne à 10mg/ml, et ils ont observé une diminution du nombre de cellules bactériennes.

L'étude de (**Abou Soulayman et al, 2010**) démontre l'effet antibactérien de la vitamine C sur des souches responsables de la parodontite. Les patients atteints de parodontite chronique ont reçu une dose journalière de 2g de vitamine C par jour pendant 41 mois. À la réévaluation, tous les patients atteints présentaient une amélioration significative des paramètres cliniques.

Contrairement à nos résultats, (**Dumitrescu et al, 2010**) démontrent que la souche *staphylococcus aureus* a un fort pouvoir adaptatif à des fortes concentrations de la vitamine C.

A travers nos résultats, on constate qu'il serait très intéressant de pouvoir utiliser cette substance naturelle comme un bain de bouche pour les patients afin de réduire la flore buccale, minimiser le phénomène de ré-aspiration et lutter contre les infections croisées.

Conclusion

Conclusion

Nous avons constaté que l'eau de l'unité dentaire de la clinique Al-Sebbah, EPSP Ain Temouchent est de mauvaise qualité microbiologique.

La caractéristique principale des conduites d'approvisionnement en eau des unités dentaires est leur capacité à développer rapidement un biofilm auquel s'associe la formation d'aérosols potentiellement contaminés.

La structure complexe des tubulures d'eau offre des conditions idéales à la prolifération des germes et au développement d'un biofilm avec dominance des souches d'origine buccale telles que les staphylocoques et les souches d'origine hydrique telles que *Pseudomonas aërogenosa*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella pneumoniae* et *Acinictobacter baumannii*, qui sont toutes capables de former des biofilms.

A travers nos résultats, nous avons confirmé qu'il existe un phénomène de ré-aspiration par les pièces à main conduisant à la remontée des germes des cavités buccales des patients vers la tubulure d'eau et qui sera à son tour source de contamination chez d'autres patients.

L'eau dans les unités dentaires représente une source potentielle de risque d'infection pouvant nuire à la santé des patients et du personnel médical.

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 :

- Contrôle microbiologique de l'eau dans les unités dentaires (**Veronesi et al, 2007**).
- La tubulure d'eau devrait être considérée comme un dispositif médical, l'action corrective la plus efficace serait un changement régulier des tubulures.
- 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.

Les dentistes peuvent également procéder à la désinfection de la cavité buccale afin de réduire la charge bactérienne de celle-ci.

Afin d'éviter le phénomène de ré-aspiration des bactéries d'origine buccale, plusieurs études montrent qu'un rinçage de la bouche du patient juste avant le traitement dentaire avec une solution antiseptique tel que la vitamine C diminue de façon significative le nombre de microorganismes (**Grenier et al, 2009**).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1. Abo-Al-Ela, H. G., El-Nahas, A. F., Mahmoud, S., & Ibrahim, E. M. (2017).** Vitamin C Modulates the Immunotoxic Effect of 17α -Methyltestosterone in Nile Tilapia. *Biochemistry*, 56(14), 2042–2050.
- 2. Abous Sulaiman, Ali E, and Rama M, H. Shehadeh (2010).** Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the Treatment of Non-Smoers with chronic periodontit. *Journal of periodontology* 81, no 11 : 1547-54.
- 3. Al Azawi I., Al Hamadani A., Hasson S. (2018).** Association between Biofilm Formation and Susceptibility to Antibiotics in *Staphylococcus Lentus* Isolated from Urinary Catheterized Patients. *Nano Biomed Eng.* 10 : 97-103.
- 4. Aline poisson, 2011.** Contamination microbienne dans les unités de soins dentaires. Anses. *Bulletin de veille scientifique N°15 santé, environnement, travail.*
- 5. 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.
- 6. Barbeau J., Gauthier C., Payment P. (1998).** Biofilms, infections agents, and dental unit waterlines: a review. *Canadian Journal of Microbiology.* 44:1019-1028.
- 7. Barbot V., Robert A., Rodier M., Imbert C. (2012).** Update on infectious risks associated with dental unit waterlines. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65 : 196-204.
- 8. Bellifa S., HassaineH., BalestrinoD., CharbonnelN., M'hamedil., Kara Terkil., 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 Researc.* 49 : 5558-5564.
- 9. Caroline L. Pankhurst and N.W. Johnson London, UK R.G. Woods Sydney, Australia, 1998.** Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. *International Dental Journal.*48, 359-368
- 10. Carr, A, Feri, B, 1999.** Does vitamine C act as a pro-oxidant under physiological conditions. *The FASEB Journal* : 13 1007-24
- 11. Céline Clément, Julie Lizon, Frédéric Camelot, 2015.** Le risque infectieux lié à l'eau des unités en odontologie l'information Dentaire n°31
- 12. Christian Perier, Annette Chamson, Jacques Frey IThierry Chepda 1999.** Effets pro- et antioxydants de l'ascorbate Antioxidant and prooxidant effects of ascorbate. *Nutrition Clinique et Métabolisme* Volume 13, Issue 2, Pages 115-120

Références bibliographiques

- 13. Cirkovic I., Trajkovic J., Hauschild T., Andersen P., Shittu A., Larsen A. (2017).** Nasal and pharyngeal carriage of methicillin resistant *Staphylococcus sciuri* among hospitalized patients and healthcare workers in a Serbian university hospital. PLoS ONE. 12: 0185181.
- 14. D.C. Coleman, M.J. O'Donnell, A.C. Shore , R.J. Russell 2009.** Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. Journal Of Applied Microbiology
- 15. Damien Offner, Marion Strub, Christelle Rebert, Anne-Marie Musset. (2016).** Evaluation of an ethical method aimed at improving hygiene rules compliance in dental practice, American Journal Of Infection Control
- 16. Dent Res J (Isfahan) 2013** Dental Research, infection contrôle practices in dental school : a patient perspective from Saudi Arabia Journal. 10(1): 25–30.
- 17. Dilini Ratnayake, Sumudu Medawela, Ruwan Jayasinghe, Sumedha Jayathilake, Dileep de Silva, Mohaideen Sitheeqe. (2017).** Awareness of risk of cross-infection and infection-control measures among patients attending University Dental Hospital, Peradeniya, Sri Lanka. Journal of Investigative and Clinical Dentistry, 9(1), e12268. doi :10.1111/jicd.12268
- 18. Dumitrescu, O, Daumalder, O, Boisset, S, Reverdy, M, Tristan, A, et Vandensch, F (2010).** Resistance aux antibiotiques chez les *Staphylococcus aureus*. Medecine/ sciences, 26(11), 943-949.
- 19. Ela M.A, EL-Shaer N.S et Ghanem N.B (1996).** Antimicrobial evaluation and chromatographic analysis of some essential and fixed oils. Pharmazie : 51 pp.993-995
- 20. 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.
- 21. Gemmell and Dawson, (1982).** Identification of Coagulase Negative Staphylococci with the API Staph System. Journal of clinical microbiology. Vol: 16(5): 874-877.
- 22. Hickey S, Roberts, H. and Saul, A, 2014.** The vitamin Cure for Heart Disease Basic Health Publications.
- 23. Hola V. et Ruzicka F., (2011),** The Formation of Poly-Microbial Biofilm on Urinary Catheters, Urinary Tract Infections, 153- 172. I

Références bibliographiques

24. **Huetz de Lempis Alain.2000.** Principales plantes cultivées introduites en Amérique latine depuis 1492. In : Cahiers d'outre-mer. N° 209-210 -. Les plantes de l'Ancien monde à la conquête de l'Amérique latine. pp. 129-186
25. **Isela S, Segio N, Jose M, Rene H (2013).** Claudioc. Ascorbic acid on oral microbial growth and biofilm. *Pharma Innovation.* 2 : 104.9.
26. **J Can Dent Assoc 2000.** Caries-Detector Dyes — How Accurate and Useful Are They? *Journal de l'Association dentaire canadienne* 66 :195-8
27. **Jean Carlet, Francine mesrati, hervé outine, Estelle Renaud, 2002.** *American Medical Association.* Vol 288, No, 22.2858
28. **Jean never, joel . 2008.** Antioxydants alimentaires vitamines oligoéléments et non alimentaires. *Aliments fonctionnel*, 2eme édition . 978-2-7430-1026-3
29. **Jolanta Szymańska, Jolanta Sitkowska. 2012,** Bacterial hazards in a dental office : An update review, *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(8), pp. 1642-1650
30. **K. Alexandre, F. Chau, F. Guérin, L. Massias, A. Lefort, V. Cattoir, B. Fantin. 2016,** Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 71, Issue 7, July 2016, Pages 1899–1904,
31. **Kara Terki I., Hassaine H., Oufrid S., Bellifa S., Mhamedi I., Lachachi M., Timinouni M. (2013).** Detection of *icaA* and *icaD* genes and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. Isolated from urinary catheters at the University Hospital of Tlemcen(Algeria). *African Journal of Microbiology Research.* 7 : 5350-5357.
- Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H, 2002.** Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 191, 101–106.
32. **Kumar S., Atray D., Paiwal D., Balasubramanyam D., buranwamy P., kulkarni S. (2010).** Dental unit waterlines: source of contamination and cross-infection. *Journal of Hospital Infection.* 74 : 99-111.
33. **Kumar S., Atray D., Paiwal D., Balasubramanyam D., buranwamy P., kulkarni S. (2010).** Dental unit waterlines: source of contamination and cross-infection. *Journal of Hospital Infection.* 74 : 99-111.

Références bibliographiques

34. **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.
35. **Legius B., Van Landuyt K., Verschuere P., Westhovens R. (2012).** Septic Arthritis Due to *Staphylococcus Warneri*: A Diagnostic Challenge. *The Open Rheumatology Journal*. 6: 310-311
36. **Levy, S. B., & Marshall, B. (2014).** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12s), S122–S129.
37. **Lino Rocha Vinhas , 2013.** Biofilm study in waterlines and suction tubes of Dental Unit Chairs of a Dental Medicine Faculty Clinic – Evaluation of effectiveness of a disinfection protocol, Oporto Dental Medicine Faculty rev port estomatol med dent cir maxilofac. 2013;54(S1):e1–e59
38. **Manizan Pascal, Lacina Coulibaly, Germain Gourene .2009** Influence De La Colonne D'eau Surnageante Sur L'efficacité Épuratoire D'un Filtre à Sable Immergé Pour Le Traitement D'eau De Surface Polluée Par Des Rejets Domestiques (Rivière Banco, Côte d'Ivoire). *European Journal of Scientific Research ISSN 1450-216X* Vol.38 No.1, pp.6-19
39. **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.
40. **-Moustardier G. (1972).** Bactériologie médicale ; 4^{ème} édition, librairie Maloine. S.A. éditeur, Paris.
41. **Murray DB, et al. (1999)** Involvement of glutathione in the regulation of respiratory oscillation during a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 145 (Pt 10):2739-45
42. **-Murray P.V., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C. et Tenover R.H. (1999).** Manual of clinical microbiologie, 7th édition, Amer. Soc. Microbial; Washing, D.C.
43. **Novak J, Fratamico P (2004).** Evaluation of ascorbic acid as a quorum sensing analogue to contrôle growth, sporulation, and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*. *J food sci*, 69 : FMS 72-8.

Références bibliographiques

44. **Olazarán S., Otero R. Treviño L., Noriega E., Díaz J., Ortiz A., González G., Vega N., González E. (2015).** Antibiotic Susceptibility of Biofilm Cells and Molecular Characterisation of Staphylococcus hominis Isolates from Blood. PLoS ONE. 12 : 0144684.
45. **Olivier fain, 2004.** Vitamin C deficiency, la revue de médecine interne 25(12):872-880
46. **Panda S., Chaudhary U., Dube K. (2017).** Comparison of four different methods for detection of biofilm formation by uropathogens. Indian J Pathol Microbiol. 59 : 177-9
47. **Pankhrust, Caroline.L, N.W.Johanson, R.G woods 2011.** Microbial contamination of dental unit waterlines: the scientific argument. International dental journal
48. **Philippe Rocher, Jouannaud, V., Coutarel, P., Tossou, H., Butel, J., Vitte, R.-L., SkiNaZi, F, Pariente, A. (2006).** Cystic dystrophy of the duodenal wall associated with chronic alcoholic pancreatitis. Gastroentérologie Clinique et Biologique, 30(4), 580–586.
49. **Pragyan Swagatika Panda, Uma Chaudhary, Surya Kumar Dube.2016.** Study of biofilm production and antimicrobial sensitivity pattern of uropathogens in a tertiary care hospital in North India. International Journal of Community Medicine and Public Health.10.18203/2394-6040
50. **Racha A. N., Abu Shady H.M., Hussein H.S. (2012).** Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. Egyptian Journal of Medical Human and Genetic .13: 269–274.
51. **Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés, X., & Vila, J. (2012).** *The Acinetobacter baumannii Oxymoron: Commensal Hospital Dweller Turned Pan-Drug-Resistant Menace. Frontiers in Microbiology, 3*.00-148
52. **Ruchanee Salingarnboriboon Ampornaramveth, Nilada Akeatichod, Jesita Lertnukkhid, and Nichakorn Songsang, 2018.** Application of D-Amino Acids as Biofilm Dispersing Agent in Dental Unit Waterlines. International Journal of Dentistry. |Article ID 9413925 | 7 pages
53. **Rueff, D. (2000).** Vitamine C. St.Julien-en- Genevois : Editions Jouvence
54. **S. Athamena, I. Chalghem1, A. Kassah-Laouar 2, S. Laroui 3 et S. Khebri 4. 2010.** Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de Cuminum L. Lebanese Science Journal, Vol. 11, No. 1

Références bibliographiques

- 55. Saito, K., Inagaki, S., Mituyama, T., Kawamura, Y., Ono, Y., Sakota, E., Kotani, H., Asai, K., Siomi, H., Siomi, M.C. (2009).** A regulatory circuit for piwi by the large Maf gene traffic jam in *Drosophila*. *Nature* 461(7268): 1296--1299.
- 56. Smith and Donald E, Lori Manzel, Lucjan Strekowski, Fyaz M. D. Ismail, Jerry C. 1999.** Antagonism of Immunostimulatory CpG-Oligodeoxynucleotides by 4-Aminoquinolines and Other Weak Bases: Mechanistic Studies Macfarlane. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 291 (3) 1337-1347;
- 57. Stéphane Sananese 2019.** Les risques liés à l'eau au cabinet dentaire. *Dental espace*
- 58. Szczuka E., Grabska K., Kaznowski A. (2015).** In vitro activity of Rifampicin combined with Daptomycin or Tigecycline on *Staphylococcus haemolyticus* biofilms. *Curr Microbiol* .71 : 184-189.
- 59. Szymanska, J., and J. Dutkiewicz. 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. *Ann. Agric. Environ. Med.* 15 :301-307.
- 60. Szymanska, J., and J. Dutkiewicz. 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. *Ann. Agric. Environ. Med.* 15 :301-307.
- 61. Valdes BR., Soares MG., Stewart B., Figueiredo CL., Faveri M., Miller S., Zhang Y., Feres M. (2017).** Effectiveness of a pre-procedural mouthwash in reducing bacteria in dental aerosols randomized clinical trial. *Braz Oral Res.* 31 : 21.
- 62. Youn H., Lee S. (2017).** Establishment of a Dental Unit Biofilm Model Using Well-Plate. *J Dent Hyg Sci.* 17 : 283-289.
- 63. Zemouri C., Soet H., Crielaard W., Laheij A. (2017).** A scoping review on bio-aerosols in healthcare and the dental environment. *Plos One.* 5 : 0178007.
- 64. Zhang Y., Ping Y., Zhou R., Wang J., Zhang G. (2017).** High throughput sequencing-based analysis of microbial diversity in dental unit waterlines supports the importance of providing safe water for clinical use. *Journal of Infection and Public Health.* 822 : 7

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture (g/l d'eau distillée)

Gélose Mac conckey

Peptone de caséine.....	17g
Peptone de viande	03g
Lactose.....	10g
Mélange de sels biliaires.....	1,5g
Rouge neutre.....	0,03g
Chlorure de sodium.....	05g
Cristal violet.....	0,001g
Agar.....	13,5g
PH.....	7,1

Milieu de Chapman : La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcine).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcine).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g
Ph.....	7,6

Préparation : 111g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave : 15 minutes à 120°C.

Bouillon cœurs-cerveille (BHIB)

Infusion de cervelle de veau.....	12.5g
Infusion de cœurs de bœuf.....	05g
Peptone.....	10g
Glucose.....	02g

Annexes

Chlorure de sodium.....	02g
Phosphatase di sodique.....	05g
Ph.....	7.4

Préparation : 37g par litre d'eau distillée. Stérilisation à l'autoclave à 120°C, 20min

Composition des réactifs utilisés

Réactifs de la coloration de Gram

Violet de gentiane

Phénol.....	2.0g
Violet de gentiane.....	1.0g
Éthanol à 90°.....	10mL
Eau distillée.....	100mL




























Lugol :

Iodure de potassium.....	2.0 g
Iode métalloïde.....	1.0g
Eaudistillée.....	300mL

Alcool (éthanol)

Fuschine de ziehl: Fuchine basique.....	1.0g
Phénol.....	5.0g
Éthanol à 90°.....	10ml
Eau distillée	100ml

Annexe 2 : Tableau d'identification du catalogue analytique API 20^ETableau 7 : lecture de la galerie Api 20^E

TABLEAU DE LECTURE DE LA GALERIE MINIATURISÉE API 20E						
Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		 
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		 
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	 	 
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		 
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ -/N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

Annexe 3 :

Ingrédients de la vitamine C

Acide ascorbique.....1262 mg

Calcium240 mg

Magnésium.....53mg

Potassium (citrate de potassium)53 mg

Résumé

La formation de film biologique dans les pièces d'équipement et les conduites d'eau des unités de soins dentaires suscite de plus en plus d'inquiétude. Les biofilms sont des communautés de microorganismes qui adhèrent à la surface des dispositifs médicaux, plus particulièrement les circuits des unités de soins d'eau dentaires. En effet, les surfaces internes des tubulures dentaires offrent un environnement particulièrement propice à la multiplication de divers microorganismes provenant du réseau d'adduction d'eau et des microorganismes d'origine buccale. L'objectif de ce travail est d'isoler et d'identifier les bactéries présentes au niveau des paroi interne des tubulures d'eau liés aux fauteuils de l'unité dentaire de la clinique Al-Sebbah, EPSP Ain Temouchent et d'évaluer leurs capacités à produire des biofilms, afin de tester l'activité antibactérienne de la vitamine C pour réduire le risque de contamination de celle-ci. Nos résultats révèlent un pourcentage élevé des entérobactéries tel que *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, et *Klebsiella pneumoniae* suivi des souches de staphylocoques d'origine buccale, ce qui indique que l'eau est de mauvaise qualité microbiologique. A travers nos résultats nous pouvons confirmer que la vitamine C a un bon pouvoir antimicrobien en inhibant la formation de biofilm *in vitro*.

Mots clés : Tubulure d'eau, unité dentaire, bactérie, biofilm, vitamine C

ملخص

هناك قلق متزايد بشأن تشكيل البيوفيلم في المعدات وأنابيب المياه في وحدات العناية بالأسنان. الأغشية الحيوية هي مجتمعات الكائنات الحية الدقيقة التي تلتصق بسطح الأجهزة الطبية، وخاصة دوائر وحدات العناية بمياه الأسنان. في الواقع، توفر الأسطح الداخلية لأنابيب الأسنان بيئة مواتية بشكل خاص لتكاثر العديد من الكائنات الحية الدقيقة المختلفة الناشئة عن شبكة إمدادات المياه والكائنات الدقيقة ذات المنشأ الفموي. الهدف من هذا العمل هو عزل وتحديد البكتيريا الموجودة على الجدار الداخلي لأنابيب المياه المرتبطة بكراسي وحدة طب الأسنان في عيادة الصباح لولاية عين تموشنت، وتقييم قدراتها. لإنتاج الأغشية الحيوية، من أجل اختبار النشاط المضاد للبكتيريا لفيتامين سي لتقليل خطر تلوثه. تكشف نتائجنا عن نسبة عالية من البكتيريا المعوية مثل

تليها سلالات *Klebsiella pneumoniae* *Pseudomonas putida* و *Acinetobacterbaumannii* و *Escherichia coli* و *Enterobacter cloacae* المكورات العنقودية الفموية، مما يشير إلى أن المياه ذات نوعية ميكروبيولوجية رديئة. من خلال نتائجنا، يمكننا أن نؤكد أن فيتامين سي لديه قوة جيدة مضادة للميكروبات عن طريق تثبيط تكوين البيوفيلم في المختبر.

الكلمات المفتاحية: مواسير مياه , وحدة طب الأسنان، بكتيريا ، بيوفيلم ، فيتامين سي

Abstrat

There is growing concern over the formation of biofilm in equipment and water pipes in dental care units. Biofilms are communities of microorganisms that adhere to the surface of medical devices, specifically the circuits of dental water care units. In fact, the internal surfaces of dental tubing provide an environment particularly conducive to the multiplication of various microorganisms originating from the water supply network and microorganisms of oral origin. the objective of this work is to study the bacteriological quality of the water used in the dental unit of the Al-Sebbah clinic, EPSP Ain Temouchent to identify the bacteria of the water tubes after having isolated them, to evaluate their capacities to produce biofilms, and to propose methods of disinfection starting from a natural substance because the results of our research revealed the presence of a good number of microorganisms with a dominance of staphylococci with negative coagulase of oral origin, which indicates that the water is of poor microbiological quality Through our results we can confirm that vitamin C has a good antimicrobial power by inhibiting the formation of biofilm *in vitro*.

Keywords: Dental unit, water tubing, bacteria, biofilm, vitamin C