

Partie 1. Synthèse bibliographique

1.1. Le biofilm dentaire

1.1.1. Définition

Au 17^{ème} siècle un drapier hollandais du nom Antonie Von Leeuwenhoeke observait pour la première fois la plaque dentaire à l'aide d'un système de microscope rudimentaire (Arampatzi *et al.*, 2011; Duffau, 2014). La plaque dentaire était probablement le premier biofilm à avoir été étudié en termes de composition microbienne ou sa sensibilité aux agents antimicrobiens.

La plaque dentaire, appelée aussi biofilm dentaire (Kolenbrander, 2011), est l'un des biofilms les mieux étudiés (Marsh, 2009). On peut la définir comme étant une accumulation hétérogène complexe composée d'une communauté bactérienne attachée à la surface des dents ou aux espaces gingivo-dentaires (l'émail, le ciment, les tissus épithéliaux mous) et enrobée dans une matrice extracellulaire de polymères d'origine microbienne et salivaire (Donlan et Costerton, 2002; Roman, 2006). Cette matrice peut représenter de 50% à 90% de la matière organique totale des biofilms (Flemming et Wingender, 2010; Arampatzi *et al.*, 2011).

Les biofilms sont des systèmes dynamiques structurellement complexes dont la formation représente un mode de vie permettant aux microorganismes non seulement de survivre dans des conditions environnementales hostiles et de coloniser de nouvelles niches mais aussi il favorise la collaboration métabolique et les échanges nutritionnels entre les différents membres de cette communauté (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2014).

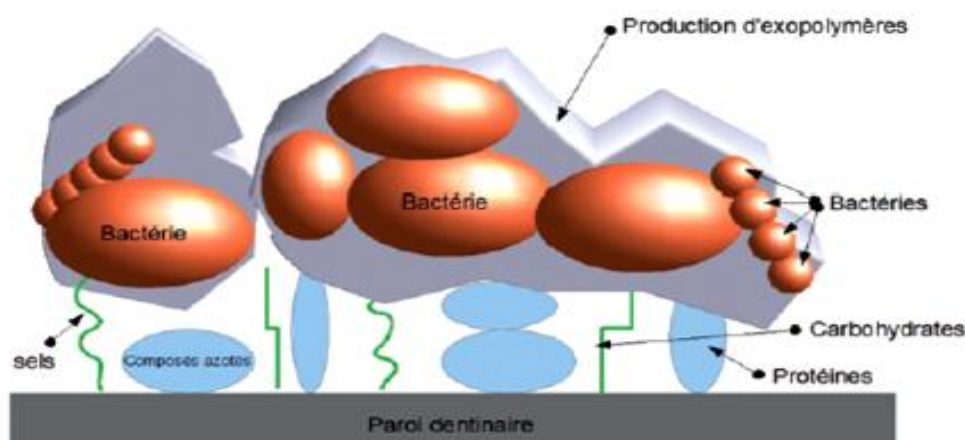


Figure 1. Schématisation du biofilm dentaire (Gouet, 2011).

1.1.2. Formation du biofilm

1.1.2.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

La première étape de la formation du biofilm dentaire est la formation de la pellicule acquise exogène, que les biologistes qualifient aussi de « biofilm salivaire ». Cette PAE va jouer le rôle de film de conditionnement. L'attachement bactérien se voit, par conséquent, grandement facilité (Pellat *et al.*, 2002; Simain *et al.*, 2010; Duffau, 2014).

Ce film se forme naturellement et spontanément à la surface des dents après le brossage, par l'absorption sélective de protéines et d'autres macromolécules provenant de la salive ou du fluide crevicalaire (Hannig et Joiner, 2006; Duffau, 2014). L'épaisseur de ce dépôt acellulaire, amicrobien varie entre 0,05 et 1µm.

Les glycoprotéines salivaires constituent 98% de la composante protéique de la PAE. (Hannig et Joiner, 2006). D'autres constituants comme les phosphoprotéines, les immunoglobulines (IgA, IgG) (Marsh et Martin, 2009), les mucines de poids moléculaire élevé (Haïkel, 2001), le lysozyme, l'albumine, l' α amylase, la glycosyl-transférase, les cystatines, la lactoferrine, l'anhydrase carbonique, les phosphoprotéines riches en prolines (PRPs), la stathérine, l'acide sialique et les sucres (galactose, mannose et glucose) participent également à la formation de la PAE.

Ce film protéique joue un rôle déterminant vis-à-vis de l'émail en le protégeant de la déminéralisation et en assurant une perméabilité sélective qui retarde la diffusion des acides (Pellat *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Adhérence et colonisation bactérienne

Les micro-organismes sont généralement transportés passivement à la surface de la dent par l'écoulement de la salive. Ils adhèrent réversiblement à la pellicule acquise exogène, par l'intermédiaire de forces réversibles électrostatiques (répulsives) et celles de van der Waals (attractives) (Pellat *et al.*, 2002; Marsh et Martin, 2009) ou à la surface d'autres bactéries grâce à une adhésion spécifique, irréversible, par l'intermédiaire de connexions ligand contre récepteur (Kolenbrander *et al.*, 2002; Kolenbrander *et al.*, 2006; Duffau, 2014).

La colonisation de la pellicule acquise exogène est progressive. Les bactéries les plus précoces dites « pionnières » trouveront sur la surface dentaire de nombreux récepteurs contenus dans la pellicule. Les colonisateurs pionnières sont principalement des bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*,

Streptococcus sanguinis ou encore *Actinomyces naeslundii* (Kolenbrander *et al.*, 2002; Kolenbrander *et al.*, 2006).

Les bactéries pionnières résistent aux fortes concentrations en oxygène et aux mécanismes d'élimination de la cavité buccale. Leur croissance s'accompagne de la modification et la création de nouvelles conditions environnementales (comme par exemple une diminution de la disponibilité en O₂) plus adaptées au métabolisme de certaines bactéries. Cela favorise alors le recrutement de nouvelles espèces: c'est les colonisateurs secondaires (Marsh et Martin, 2009).

C'est une deuxième vague de colonisation qui peut alors se mettre en place, trouvant sur ce lit bactérien de nouveaux moyens d'adhésion. Ces colonisateurs secondaires sont toujours considérés comme précoces, parmi lesquels figurent des bactéries telles qu'*Eikenella corrodens* ou *Capnocytophaga ochracea*, qui seront ensuite suivis de colonisateurs tardifs comprenant les parodontopathogènes les plus fréquemment suspectés (Duffau, 2014).

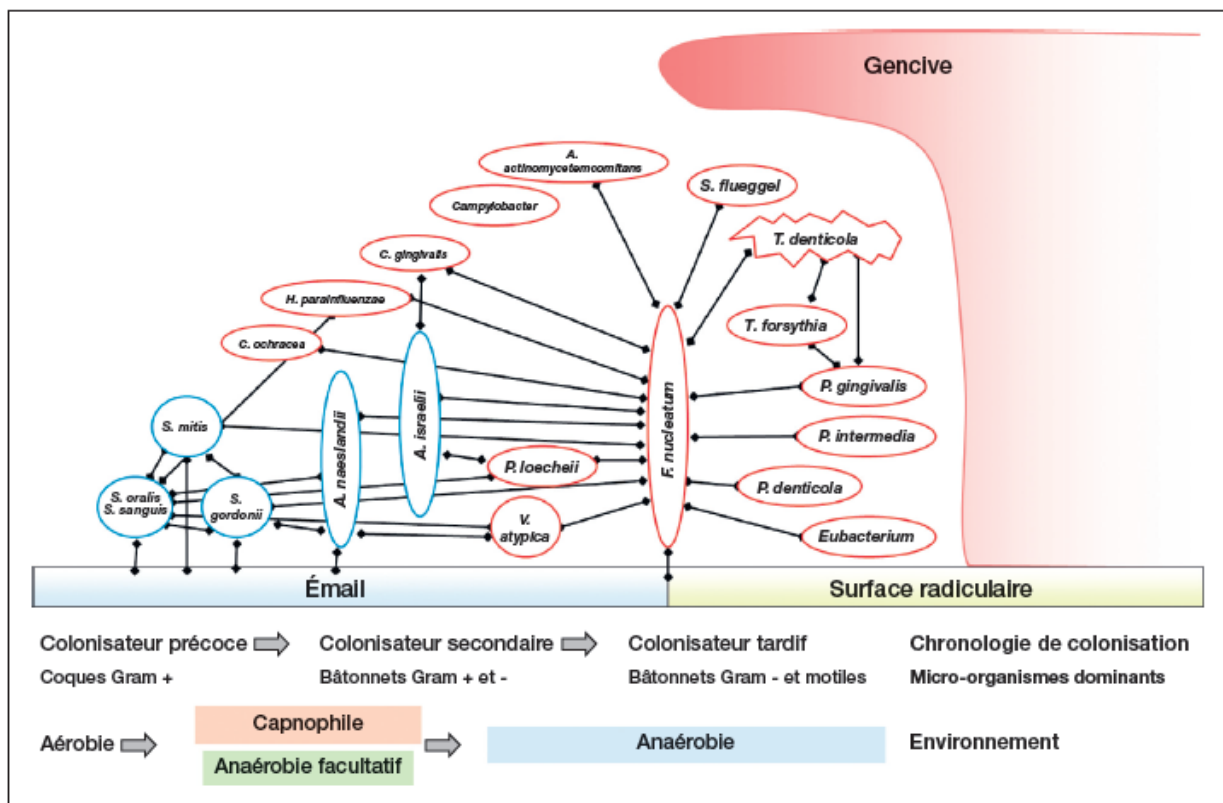


Figure 2. Organisation de la flore parodontale (Duffau, 2014).

1.1.2.3. Maturation

Lors de cette phase, on observe une modification importante de la taille du biofilm, résultat de nombreuses multiplications bactériennes. La matrice extracellulaire augmente en épaisseur avec des modifications des gradients d'oxygène, de substrats, voire de pH. Des mécanismes de communication intercellulaire s'installent durablement, la bactérie est ainsi informée de la densité et des interactions cellulaires dans son proche environnement. C'est le concept du «quorum sensing» (Simain *et al.*, 2010).

A ce stade, la plaque dentaire constitue une « véritable barrière de diffusion », en limitant l'entrée de certains composés comme les antimicrobiens contenus dans les dentifrices, elle a ainsi une sensibilité moindre à ces produits. De plus, elle provoque la rétention des produits du métabolisme bactérien (Rouch, 2015).

1.1.2.4. Dissémination

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion, des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur à partir du biofilm (Clutterbuck, 2007). Les bactéries libérées vont coloniser de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms aura lieu (Pantaléon, 2015).

Le décrochage des bactéries du biofilm peut être un phénomène passif ou actif. Lorsque le phénomène est passif, les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités : on parle d'« érosion » du biofilm. En revanche, on peut assister à un détachement massif et rapide « en lambeaux », où des mécanismes moléculaires sont mis en place afin d'induire le détachement des micro-organismes (Donlan, 2002; Wijman *et al.*, 2007; Arampatzi *et al.*, 2011). Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibio-résistance (Donlan, 2002).

Des facteurs intrinsèques au biofilm comme la présence de bactériophages, de molécule du *quorum-sensing*, de surfactants ou d'acides aminés, peuvent induire le détachement des bactéries du biofilm (Kaplan, 2010; McDougald *et al.*, 2012; Pantaléon, 2015).

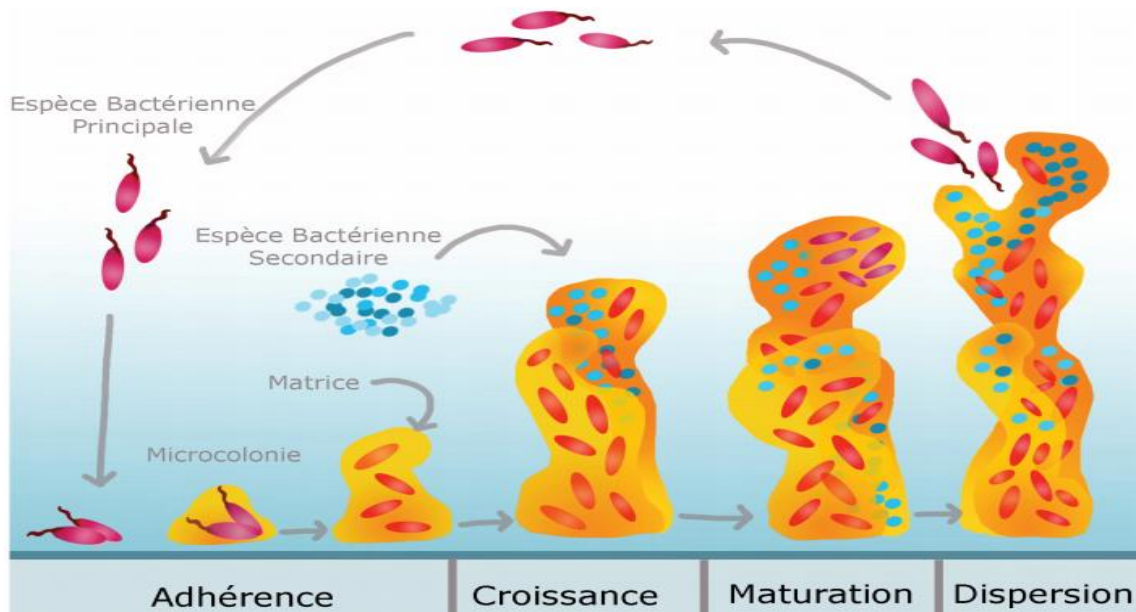


Figure 3.  tapes de la formation et de la dispersion du biofilm bactérien (Tremblay *et al.*, 2014).

1.1.3. Classification du biofilm dentaire

Deux types de plaque en fonction de leur localisation anatomique sont décrits : la plaque supra-gingivale impliquée dans la pathologie carieuse et la plaque sous-gingivale associée aux pathologies gingivales et parodontales (Haïkel, 2001; Joachim et Charon, 2011).

1.1.3.1. Plaque supra-gingivale

Elle est surtout aérobie et baignée par la salive. Le premier stade de formation de la plaque supra-gingivale consiste en un dépôt de glycoprotéines salivaires sur les surfaces des tissus, nommé pellicule acquise exogène. Les premières bactéries qui se déposent sur la surface des dents au niveau supra-gingival sont principalement des bactéries à Gram positifs (*Streptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*) qui vont adhérer définitivement à la pellicule acquise exogène.

Les métabolites de la flore bactérienne provoquent une augmentation de l' xsudation et la migration des leucocytes dans l'épithélium jonctionnel. Ce relâchement permet aux bactéries d'accéder plus facilement à l'espace entre la dent et la gencive et de provoquer des gingivites et la formation de poches gingivales (Wolf *et al.*, 2004; Bibette, 2013).

La composition de la flore supra-gingivale va influencer grandement la composition de la plaque sous-gingivale.

1.1.3.2. Plaque sous-gingivale

La plaque sous-gingivale se forme dans un environnement baigné par le fluide crévical dont la teneur en oxygène est faible, ce qui favorise le développement d'espèces bactériennes anaérobies. Le nombre de bactéries à Gram négatifs sous la gencive augmente, de même que la profondeur de sondage.

Des agrégats plus lâches de bactéries en parties mobiles non adhérentes (avec une forte proportion d'anaérobies et de spirochètes) sont rencontrés dans la poche. Du tartre peut également se former à partir de cette plaque (Wolf *et al.*, 2004; Bibette, 2013).

1.1.4. Diversité bactériennes de la plaque sous-gingivale

Les bactéries sous-gingivales sont rarement des colonisateurs uniques. Cette microflore est le plus souvent très diversifiée et organisée en complexes (Roman *et al.*, 2006).

Les travaux de Socransky et collaborateurs (Socransky *et al.*, 1998) ont permis de définir des complexes bactériens spécifiques. Ces complexes bactériens sont représentatifs des différents stades de la maladie parodontale (Socransky *et al.*, 1998; Socransky et Haffajee, 2005) et révélateurs de formes cliniques (Roman *et al.*, 2006).

Socransky et Haffajee (Socransky et Haffajee, 2005) ont regroupé les principales espèces bactériennes occupant la niche sous-gingivale en cinq complexes:

- Le complexe jaune comprend les espèces *Streptococcus* incluant *S. oralis*, *S. sanguinis* et *S. gordonii*.
- Le complexe vert est constitué des espèces *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* et *Capnocytophaga sp.*
- Le complexe mauve est composé de *Veillonella parvula* et d'*Actinomyces odontolyticus*. Les membres de ce complexe associés aux précédents représentent les colonisateurs primaires.
- Le complexe orange est composé des espèces *Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Campylobacter sp.*, *P. micros* et *Streptococcus constellatus*. Les bactéries de ce groupe secrètent les substances nutritives nécessaires pour l'agrégation de bactéries, la croissance et la maturation du biofilm.
- Le complexe rouge est composé des espèces *P. gingivalis*, *T. denticola* et *T. forsythia*. Le complexe rouge représente les colonisateurs tardifs, il est associé avec le complexe orange aux stades avancés des parodontites.

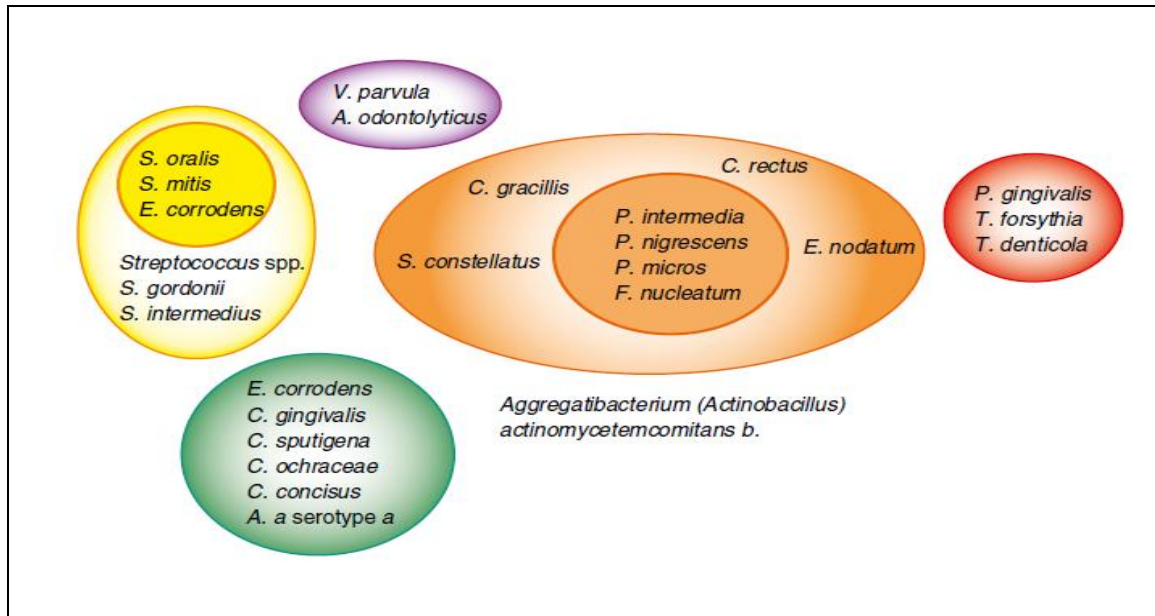


Figure 4. Représentation schématique de la composition des complexes bactériens et de leur organisation au sein d'un biofilm sous-gingival (Marsh et Martin, 2009).

1.2. Mécanismes biologiques de l'adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne sur un support est la première étape conduisant à la formation d'un biofilm bactérien. Elle met en jeu un certain nombre de mécanismes physicochimiques et biologiques complexes (Baillif *et al.*, 2010). L'adhésion peut se résumer en quatre étapes dynamiques successives:

1.2.1. Le transport

Le transport correspond à un transfert des bactéries à proximité de la surface réceptrice sur laquelle elles peuvent adhérer. L'origine de ces bactéries est soit le recrutement des cellules du milieu soit la redistribution des cellules issues de la phase de dispersion d'un biofilm situé à proximité (Branger *et al.*, 2012).

Le transfert des bactéries vers le support fait intervenir des phénomènes de nature physicochimique et biologique (An et Friedman, 1998; Katsikogianni et Missirlis, 2004; Branger *et al.*, 2012):

➤ **La diffusion passive:** Elle fait intervenir des mouvements browniens dus à l'agitation thermique, ce qui anime toutes les bactéries et leur permet un déplacement aléatoire à la vitesse moyenne de 40 µm par heure.

➤ **La sédimentation:** Elle est due aux forces de gravité, qui se produit par différence de gravité entre la bactérie et le fluide dans lequel elle se trouve (Fregaed, 1991; Branger *et al.*, 2012).

➤ **La convection:** Elle résulte de l'écoulement et les mouvements du fluide environnant. Le transport convectif semble être particulièrement important pour l'attachement des bactéries, un régime d'écoulement turbulent favorise l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre la bactérie et la surface (Jacobs, 2007; Branger *et al.*, 2012).

➤ **La motilité:** Elle se définit par les mouvements propres autonomes de la bactérie, grâce à la présence sur sa surface de flagelles ou de pilis. Ce mécanisme peut être associé au chimiotactisme, qui permet aux bactéries de se rapprocher des surfaces (Jacobs, 2007; Branger *et al.*, 2012).

1.2.2. L'adhésion initiale

L'ensemble des bactéries et de la surface commencent à interagir l'un avec l'autre lorsque la distance qui les sépare est de 50 nm (Branger *et al.*, 2012); s'en suit d'une succession d'interactions de longue puis de courte distance, qui sont partiellement de nature physico-chimique. Cette phase d'adhésion est tout d'abord réversible puis devient irréversible (Jacobs, 2007).

1.2.2.1. Adhésion réversible

Dans de nombreux milieux biologiques, deux types d'interactions de longue distance sont décrits. Les bactéries sont tout d'abord attirées dans un minimum énergétique secondaire par des forces d'attraction : les forces de Van der Waals. Lorsque la distance de 20 nm est franchie, il apparaît des forces de répulsion électrostatiques (Branger *et al.*, 2012).

➤ Les forces de van der Waals

Ce sont des forces intermoléculaires de nature électrique, retenant ensemble des molécules et des atomes de deux corps et qui dépendent des attractions reliant les atomes et les molécules lorsqu'ils se rapprochent.

Ces forces ont une origine moléculaire résultant de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges d'une autre. Les forces de van der Waals sont en général de faible intensité, elles diminuent rapidement avec la distance et il en existe trois natures résultant de trois effets physiques différents: effet d'orientation (force de Keesom), effet d'induction (forces de Debye) et effet de dispersion (forces de London) (Vergnault, 2004; Branger *et al.*, 2012).

- **Effet d'orientation** (interaction dipôle permanent / dipôle permanent) : une attraction entre deux molécules polaires.
- **Effet d'induction** (interaction dipôle permanent / dipôle induit) : une attraction entre une molécule polaire et une molécule non polaire.
- **Effet de dispersion** (interaction dipôle induit / dipôle induit) : une attraction entre deux molécules non polaires (Boutaleb, 2007; Branger *et al.*, 2012).

Les forces de Keesom et Debye sont négligeables en milieu aqueux, et seules les forces de London seront prises en compte par la suite. Ces forces appelées forces de Lifshitzvan der Waals sont universelles et interviennent quels que soient les corps considérés. Pour deux particules immergées dans un solvant, ces interactions vont intervenir entre la surface de la particule et le solvant, et entre les particules quand celles-ci sont suffisamment proches l'une de l'autre (Branger *et al.*, 2012).

Ces différentes interactions sont des forces d'attraction. Pour éviter l'interpénétration des nuages électriques des deux molécules, des forces de répulsion entrent en jeu, ce sont les forces électrostatiques.

➤ **Les forces électrostatiques de répulsion**

Les interactions électrostatiques interviennent dans le cas de composés chargés. L'immersion d'une particule, une bactérie ou une surface plane dans un fluide, lui acquiert, une charge de surface provoquée par l'adsorption ionique ou l'ionisation des groupements chargés présents en surface (Boutaleb, 2007). On observe alors une accumulation de contre-ions dans la zone entourant la particule, accumulation qui se traduit par la formation d'une double couche électrique (Fregaed, 1991).

Lorsque la surface de la bactérie, globalement chargée négativement, arrive en contact avec la surface du substratum, portant une charge de même signe, il se produit des interactions électrostatiques répulsives dues au chevauchement des deux couches superficielles chargées. (Fregaed, 1991).

L'épaisseur de la double-couche est inversement proportionnelle à la concentration en ions dans la phase aqueuse. Le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements dissociés présents sur les surfaces, intervient également dans la valeur des interactions électrostatiques (Vergnault, 2004).

L'importance de ces événements initiaux n'est pas à négliger dans le développement du biofilm malgré la multitude d'événements ultérieurs qui auront lieu sur une échelle de temps beaucoup plus longue (Busscher *et al.*, 1995).

1.2.2.2. Adhésion irréversible

C'est une étape plus lente que la précédente, faisant appel à des interactions irréversibles de courte distance et à des énergies plus élevées (Branger *et al.*, 2012). Ces interactions interviennent lorsque la distance bactérie-substrat est proche du nanomètre (Fregaed, 1991). Ces interaction irréversibles aux quelles les bactéries sont soumises sont:

➤ Les interactions électrostatiques

Ces interactions apparaissent entre la surface des microorganismes et la surface réceptrice, elles sont dues au recouvrement des couches associées aux groupes chargés présents à la surface de la cellule microbienne et à ceux de la surface réceptrice (Boutaleb, 2007).

Ces interactions non sélectives se caractérisent par la formation de ponts par l'intermédiaire de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) entre une charge négative de la bactérie et une charge négative du substratum. La charge négative de la surface bactérienne est fournie par l'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positif, et par le LPS des bactéries à Gram négatif. (Bonnaure Mallet *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 2011).

➤ Les interactions acide-base (accepteur/donneur d'électrons)

Ces interactions permettent la formation de liaisons hydrogènes (interactions de Lewis). Ce sont des interactions de nature électrique forte, de courte distance, possibles lorsqu'un atome chargé négativement est en contact avec un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (Branger *et al.*, 2012).

Un composé donné peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir avec des liaisons hydrogènes. Il existe différents degrés dans ce caractère, ce qui se traduit par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins importantes (Boutaleb, 2007).

➤ Les interactions hydrophobes/hydrophiles

▪ Attraction hydrophobe

Elles entrent en jeu lors d'une adhésion en milieu aqueux (Vergnault, 2004). L'hydrophobie est, dans cette définition, un terme utilisé pour rendre compte du comportement de molécules apolaires dans l'eau. Autour d'une particule hydrophobe, les molécules d'eau s'organisent en structure ordonnée (Vadillo-rodriguez *et al.*, 2003), cette organisation conduit à une baisse du désordre ou d'entropie, thermodynamiquement défavorable (Dague, 2006; Boutaleb, 2007).

L'eau va donc tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe et par conséquent la formation des liaisons entre les molécules apolaires. Cette attraction hydrophobe dépend de la nature des particules et de leur distance de séparation, cette interaction est effective à des distances de l'ordre de 10 nm et plus (Vergnault, 2004).

▪ Répulsion hydrophile

La répulsion hydrophile se produit entre particules dotées d'une forte affinité pour l'eau, qui se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau (Vergnault, 2004).

Quand les deux surfaces hydratées s'approchent l'une de l'autre, la présence de cette eau liée induit une énergie de répulsion hydrophile. Cette répulsion hydrophile est également fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation, mais elle est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm (Boutaleb, 2007).

1.2.3. L'attachement

Pour se maintenir sur les surfaces dentaires durant une longue période, les bactéries doivent être vivantes et capables d'exprimer un certain nombre de gènes conduisant à l'acquisition de nouvelles structures permettant l'établissement des liaisons de haute affinité. Ces éléments se révèlent importants dans la mise en place des interactions irréversibles ainsi que dans l'étape ultérieure de multiplication bactérienne, aboutissant à la formation d'un biofilm (Baillif *et al.*, 2010). Les interactions sont de deux ordres:

➤ Les interactions de type Adhésine-Récepteur

Les adhésines sont des protéines qui se fixent stéréochimiquement à des récepteurs de la PAE, essentiellement saccharidiques, en formant des ponts entre les deux surfaces (Jenkinson et Lamont, 1997). Certaines adhésines sont largement conservées chez les streptocoques oraux et sont susceptibles de jouer un rôle clé dans l'adhésion aux surfaces buccales.

La catégorie la plus connue d'adhésines bactériennes est représentée par les léctines qui sont retrouvées le plus fréquemment chez *Streptococcus mutans* (Fregaed, 1991).

Il existe également l'antigène I/II qui est constitué de protéines exprimées au niveau de la membrane des streptocoques commensaux oraux tels que *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. sanguinis*, (Jakubovics *et al.*, 2005). L'Ag I/II joue un rôle central dans la liaison à la glycoprotéine de la

salive intégrée dans la pellicule acquise exogène, cela favorise l'adhérence avec les streptocoques.

➤ **Les interactions de type Enzyme-Substrat**

L'exemple le mieux documenté est celui de *S. mutans*, cette bactérie produit des complexes enzymatiques: les Glycosyltransférases (GTF) (Bowen et Koo, 2011). Ces derniers sont intégrés à la surface de la bactérie et ils sont responsables de la synthèse des polymères de type glucane en présence de saccharose (Krzyściak *et al.*, 2014).

Ces glucanes sont fortement adhésifs, ils se fixent de manière spécifique aux récepteurs présents sur la PAE notamment les Glucan-Binding-Protein (GBP) (Lynch *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les récepteurs de la pellicule acquise exogène, au niveau des surfaces dentaires, autres que les GBP, on retrouve surtout des protéines riches en histidine et en Proline (PRP), le lysozyme et l'alpha-amylase (Jenkinson et Lamont, 1997).

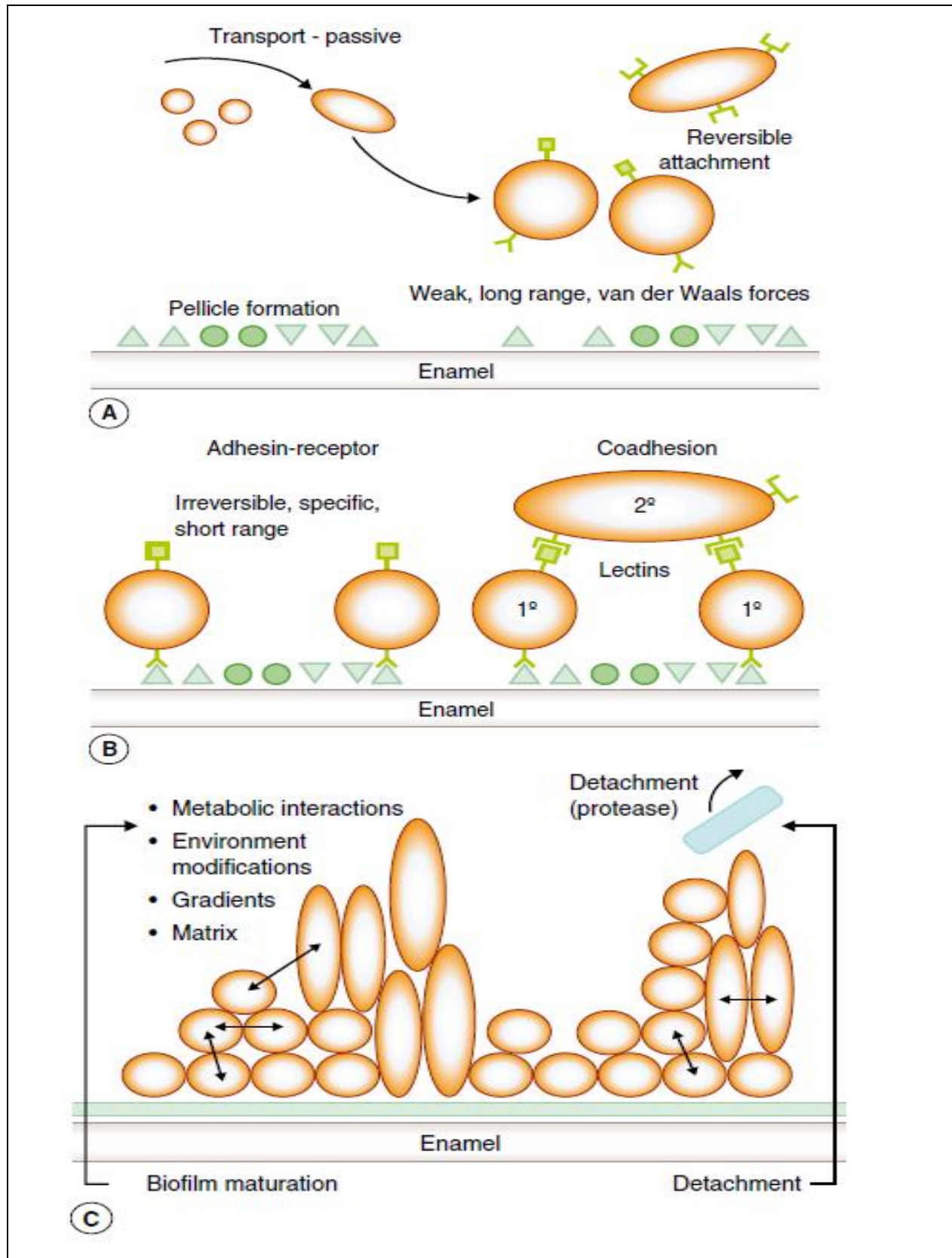


Figure 5. Les étapes de formation du biofilm dentaire (Marsh et Martin, 2009).