



**HAL**  
open science

## Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés

Elodie Houvion

► **To cite this version:**

Elodie Houvion. Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés. Sciences du Vivant [q-bio]. 2014. hal-01733964

**HAL Id: hal-01733964**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733964v1>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**ACADEMIE DE NANCY-METZ**  
**UNIVERSITE DE LORRAINE**  
**FACULTE D'ODONTOLOGIE**

Année 2014

N° 6713

**THESE**  
pour le  
**DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE**

Par  
**Elodie HOUVION**

Née le 09 aout 1987 à Epinal (Vosges)

**Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés**

Thèse présentée et soutenue publiquement le **14 janvier 2014**

Membres du jury

<b>PR. C. STRAZIELLE</b>	<b>Professeur des universités</b>	<b>Président</b>
<b>DR. C. BISSON</b>	<b>Maître de conférences</b>	<b>Juge</b>
<b>DR. C. ALAUZET</b>	<b>MCU-PH en bactériologie</b>	<b>Juge</b>
<b>DR. N. PAOLI</b>	<b>Assistante hospitalo-universitaire</b>	<b>Juge</b>

Vice-Doyens : **Pr Pascal AMBROSINI — Dr Céline CLEMENT**

 Membres Honoraires : **Dr L. BABEL – Pr. S. DURIVAUX – Pr A. FONTAINE – Pr G. JACQUART – Pr D. ROZENCWEIG - Pr M. VIVIER**

 Doyen Honoraire : **Pr J. VADOT, Pr J.P. LOUIS**

<b>Sous-section 56-01</b> Odontologie pédiatrique	Mme M. Mlle Mlle Mlle	<b><u>DROZ Dominique (Desprez)</u></b> PREVOST Jacques JAGER Stéphanie HERNANDEZ Magali LUCAS Cécile	Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistante* Assistante
<b>Sous-section 56-02</b> Orthopédie Dento-Faciale	Mme M. Mlle M.	<b><u>FILLEUL Marie Pierryle</u></b> GEORGE Olivier BLAISE Claire EGLOFF Benoît	Professeur des Universités* Maître de Conf. Associé Assistante Assistant
<b>Sous-section 56-03</b> Prévention, Epidémiologie, Economie de la Santé, Odontologie légale	Mme M.	<b><u>CLEMENT Céline</u></b> CAMELOT Frédéric	Maître de Conférences* Assistant*
<b>Sous-section 57-01</b> Parodontologie	M. Mme M. M. Mlle Mlle	<b><u>AMBROSINI Pascal</u></b> BISSON Catherine MILLER Neal PENAUD Jacques BÖLÖNI Eszter PAOLI Nathalie	Professeur des Universités* Maître de Conférences* Maître de Conférences Maître de Conférences Assistante Assistante*
<b>Sous-section 57-02</b> Chirurgie Buccale, Pathologie et Thérapeutique  Anesthésiologie et Réanimation	Mme M. M. M. M. M. M.	<b><u>GUILLET-THIBAUT Julie</u></b> ARTIS Jean-Paul BRAVETTI Pierre VIENNET Daniel BAPTISTA Augusto-André DELAITRE Bruno MASCHINO François	Maître de Conférences* Professeur 1er grade Maître de Conférences Maître de Conférences Assistant Assistant Assistant
<b>Sous-section 57-03</b> Sciences Biologiques (Biochimie, Immunologie, Histologie, Embryologie, génétique, Anatomie pathologique, Bactériologie, Pharmacologie)	M. M. M.	<b><u>YASUKAWA Kazutoyo</u></b> MARTRETTE Jean-Marc WESTPHAL Alain	Maître de Conférences* Professeur des Universités* Maître de Conférences*
<b>Sous-section 58-01</b> Odontologie Conservatrice, Endodontie	M. M. M. M. Mlle M.	<b><u>ENGELS-DEUTSCH Marc</u></b> AMORY Christophe MORTIER Eric BALHAZARD Rémy PECHOUX Sophie VINCENT Marin	Maître de Conférences Maître de Conférences Maître de Conférences Assistant* Assistante Assistant*
<b>Sous-section 58-02</b> Prothèse complète, Prothèse maxillo-faciale)	M. M. M. Mlle M. M. Mme Mme	<b><u>DE MARCH Pascal</u></b> ARCHIEN Claude SCHOUVER Jacques CORNE Pascale LACZNY Sébastien MAGNIN Gilles RIFFAULT-EGUETHER Amélie VAILLANT Anne-Sophie	Maître de Conférences Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistante Assistant Assistant Assistante Assistante*
<b>Sous-section 58-03</b> Sciences Anatomiques et Physiologiques Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie	Mlle M. Mme M. M.	<b><u>STRAZIELLE Catherine</u></b> RAPIN Christophe (Sect. 33) MOBY Vanessa (Stutzmann) SALOMON Jean-Pierre HARLE Guillaume	Professeur des Universités* Professeur des Universités* Maître de Conférences* Maître de Conférences Assistant Associé

**souligné : responsable de la sous-section**

\* temps plein

**Mis à jour le 01.11.2013**

*Par délibération en date du 11 décembre 1972,  
la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que  
les opinions émises dans les dissertations  
qui lui seront présentées  
doivent être considérées comme propres à  
leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner  
aucune approbation ni improbation.*

## **A NOTRE PRESIDENT DE THESE**

Mademoiselle le professeur **Catherine STRAZIELLE**

Docteur en Chirurgie Dentaire

Professeur des Universités

Habilité à diriger des Recherches par l'Université Henry Poincaré, Nancy I

Responsable de la Sous-section : Sciences Anatomiques et Physiologiques,

Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique et Radiologie.

Nous sommes sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Veillez trouver ici l'expression de notre plus profond respect. Nous vous prions de croire à notre sincère reconnaissance.

## **A NOTRE JUGE ET DIRECTEUR DE THESE**

Madame le Docteur **Catherine BISSON**

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'université Henri Poincaré, Nancy-I

Maître de conférence des Universités – Praticien Hospitalier

Sous section: Parodontologie

Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail dont vous avez été l'initiateur, et de nous guider tout au long de son élaboration.

Nous vous remercions pour votre disponibilité, votre gentillesse, votre pédagogie et vos précieux conseils pour nos projets.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

## **A NOTRE JUGE**

Mademoiselle le Docteur **Nathalie Paoli**  
Docteur en chirurgie dentaire  
Assistante hospitalo-universitaire

Nous vous remercions  
chaleureusement d'avoir  
spontanément accepté de faire partie  
de notre jury de thèse.

Soyez assuré de notre reconnaissance  
et de notre profonde considération.



## **A NOTRE JUGE**

Madame le Docteur **Corentine ALAUZET**  
Docteur en pharmacie  
Docteur de l'université Henri Poincaré, Nancy 1  
MCU-PH en bactériologie

Nous vous remercions d'avoir accepté  
de faire partie de ce jury,

Vous nous faites l'honneur de juger  
notre travail,

A travers celui-ci veuillez trouver  
Notre sincère reconnaissance

**A Jeffrey,**

Merci de toujours être là pour moi, de me soutenir, et surtout merci d'avoir été si patient pendant toutes ses années d'études !

**A Alice,**

Ma petite merveille !

**A Maman, Papa, Fanny, et Clément,**

Merci pour votre soutien et votre aide.

**A Morgane et Nicolas,**

Merci pour toutes ces heures passées au téléphone!

# TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	9
TABLE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLEAUX	14
LISTE DES ABREVIATIONS	15
<b>Introduction</b>	<b>17</b>
<b>I. Le biofilm.....</b>	<b>18</b>
<b>A. Définition d'un biofilm bactérien.....</b>	<b>18</b>
1. Définition générale .....	18
2. La plaque dentaire : un modèle de biofilm.....	19
a) Définition .....	19
b) Les différents types de plaque dentaire.....	19
c) Intérêts d'étudier le biofilm.....	20
3. Caractéristiques des bactéries.....	22
a) Définition .....	22
b) Structure.....	22
<b>B. Structure du biofilm .....</b>	<b>29</b>
1. La composition bactérienne .....	29
a) Composition générale .....	30
b) Etude de Zijngé et al. (2010) : .....	33
(1) Biofilm sous gingival d'après l'étude de Zijngé :.....	33
(2) Biofilm supra gingival :.....	34
2. Architecture, composition et propriété de la matrice .....	36
<b>II. Formation du biofilm.....</b>	<b>38</b>
<b>A. La pellicule exogène acquise .....</b>	<b>38</b>
1. Sa composition .....	39
2. Son adhérence à la surface amélaire.....	39
3. Son rôle .....	40
<b>B. Les différentes étapes de l'adhérence bactérienne .....</b>	<b>40</b>
1. L'agrégation bactérienne .....	40
a) L'adhésion réversible .....	40
(1) L'adhésion des bactéries pionnières, colonisateurs primaires.....	40
(2) Mécanisme .....	41
b) L'adhésion irréversible spécifique .....	42
(1) Les différents types de liaison.....	42

(2) Mécanismes (tableau 5) .....	43
c) Adhérence irréversible aux tissus (tableau 5).....	46
(1) Pili et protéines fibrillaires .....	47
(2) Protéines de membrane externe – Msp.....	48
(3) Auto-transporteurs – EMAA.....	49
2. La coagrégation bactérienne et interactions bactériennes .....	50
a) Co-agrégation.....	50
(1) Définitions.....	50
(2) Présentation .....	51
(3) Les différents colonisateurs .....	52
(4) Exemples de mécanismes de co agrégaton hétérotypique.....	56
b) Interactions bactériennes .....	60
(1) Adhérence hétérotypique : coopération-mutualisme.....	61
(2) Compétition.....	66
3. Interactions bactériennes influençant la localisation des résidents au sein de biofilms	66
4. Maturation du biofilm et phénomènes de détachement .....	67
a) Le détachement.....	67
b) La maturation du biofilm.....	69
(1) La matrice extracellulaire.....	69
(2) La sélection bactérienne .....	70
(3) L'évolution du biofilm vers le tartre .....	72
<b>III. Les propriétés du biofilm .....</b>	<b>74</b>
<b>A. La gestion des nutriments et des métabolites .....</b>	<b>75</b>
1. Nutriments comme base pour les interactions interspécifiques bactériennes au sein des biofilms .....	75
2. Echanges métabolique de nutriments chez les bactéries buccales .....	76
a) Echanges métaboliques favorables et mutualisme .....	77
b) Echanges métaboliques néfastes et compétition .....	82
3. Bactériocines et d'autres métabolites inhibiteurs .....	86
<b>B. Le mécanisme du Quorum sensing.....</b>	<b>88</b>
1. Définition .....	88
2. Quelques rôles de l'autoinduceur-2 .....	90
a) Autoinduceur-2 régleme la acquisition du fer .....	90
b) Régulation par l'autoinduceur-2 de la croissance du biofilm de bactéries buccales.....	92
c) Autoinduceur-2 : rôle dans la régulation du métabolisme des carbohydrates .....	93
d) Communication inter espèce .....	94
3. Le CSP .....	94

<b>C. La régulation de l'expression génique.....</b>	<b>95</b>
1. Échanges génétiques de facteurs de virulence entre les résidents des biofilms .....	96
a) Exemple de <i>P. gingivalis</i> .....	97
b) Exemple des Streptocoques .....	97
c) Echange génétique de facteurs de virulence : exemple de <i>P. gingivalis</i> .....	98
2. Répression de certains gènes.....	99
<b>D. La résistance des bactéries du biofilm aux antimicrobiens et aux facteurs de l'hôte..</b>	<b>100</b>
.....	
1. Propriétés intrinsèques du biofilm.....	100
2. Acquisition de gènes de résistance.....	104
<b>Conclusion</b>	<b>108</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>110</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: synergie pathogénique des bactéries ayant un rôle dans l'étiologie des maladies parodontales	21
Figure 2: membrane cellulaire d'une bactérie.	23
Figure 3: paroi d'une bactérie à Gram positif. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006) .....	24
Figure 4 : paroi d'une bactérie à Gram négatif. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006) .....	24
Figure 5: <i>Porphyromonas gingivalis</i> , microscopie électronique à balayage. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).....	26
Figure 6: schématisation de l'organisation des micro-colonies et des espaces libres dans un biofilm. (Rodney et Costerton, 2002) .....	29
Figure 7: les complexes bactériens. (Socransky et al, 2008) .....	30
Figure 8: diagramme des complexes bactériens. (Socransky et al, 2008) .....	30
Figure 9: visualisation des espèces les plus abondantes du biofilm sous gingival. (Zijnge et al, 2010) .....	34
Figure 10: visualisation de la répartition des nombreuses espèces composant le biofilm supra gingival. (Zijnge et al, 2010) .....	35
Figure 11: coupe transversale d'un biofilm. (Ten Cate, 2006) .....	36
Figure 12: schématisation des étapes de formation d'un biofilm. (Jakubovics, Kolenbrander, 2010) .....	44
Figure 13: représentation schématique des interactions entre les micro organismes oraux et les tissus de l'hôte. (Koo et al, 2010) .....	47
Figure 14: différence entre co-adhésion et co-agrégation. (Busscher and Van Der Mei, 1997) .....	50
Figure 15: la concurrence et la coopération entre les colonisateurs précoces et tardifs à la surface de la dent. (Kolenbrander and al, 2002) .....	52
Figure 16: interactions entre <i>Streptocoque gordonii</i> et <i>Porphyromonas gingivalis</i> . (Kobuniwa et Lamont, 2010) .....	57
Figure 17: biofilm buccal formé in vitro à partir d'un prélèvement de salive et observé en imagerie confocal. (Kolenbrander et al, 2002) .....	59
Figure 18: interaction de <i>Porphyromonas gingivalis</i> avec <i>Streptococcus gordonii</i> , qui dépend de deux ensembles de paires adhésine-récepteur. (Wright and al, 2012) .....	63
Figure 19: interactions entre les cellules bactériennes dans le biofilm de la plaque dentaire, avec des exemples de synergie et mutualisme. Les lignes reliant les micro-organismes représentent les interactions adhésives. (Wright et al, 2012) .....	65
Figure 20: le détachement de la plaque dentaire. (Busscher et al, 1997) .....	68
Figure 21: représentation hypothétique de l'impact des liaisons initiales sur la composition finale d'un biofilm. (Busscher et al, 1997) .....	71
Figure 22: formation d'un biofilm sur une surface dentaire et rôles des interactions bactériennes. (Hojo et al, 2009) .....	74

<b>Figure 23: représentation des relations métabolique entre les bactéries orales. (Hojo, 2009) .....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 24: interactions mutualistes entre trois espèces au sein d'un biofilm baigné par la salive. (Periasamy et al, 2010) .....</b>	<b>79</b>
<b>Figure 25: interactions de <i>Streptocoque mutans</i> avec d'autres bactéries. (Kuramitsu et al, 2007) .</b>	<b>82</b>
<b>Figure 26: action antimicrobienne de la chlorhexidine à 0,12% sur un biofilm coloré avec fluophore (de couleur verte). (Takenaka et al, 2008) .....</b>	<b>103</b>

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1: principales bactéries retrouvées dans la plaque dentaire supra et sous gingivale.</b>	<b>26</b>
<b>Tableau 2: bactéries de la flore présente dans les infections parodontales.</b>	<b>27</b>
<b>Tableau 3: la flore buccale en quelques chiffres.</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 4: les groupes prédominants de bactéries en fonction des différentes surfaces de la dent colonisées.</b>	<b>32</b>
<b>Tableau 5: propriétés fonctionnelles des adhésines bactériennes.</b>	<b>46</b>
<b>Tableau 6: composition minérale du tartre.</b>	<b>73</b>
<b>Tableau 7: molécules de signalisation de différentes bactéries.</b>	<b>90</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

- Ag I/II : Antigènes I/II
- CPLP : Calcium Phospholipide Phosphate
- Eh : potentiel redox
- EPS : Exo Poly Saccharidique
- EPS : Substance Polymère Extracellulaire
- Fimbriae de type 1 : Fim P/Q  
de type 2 : Fim A/B
- FISH : Fluorescence par Hybridation In Situ
- GAPDH : GlycérAldéhyde 3-Phosphate DésHydrogénase
- gp340 : glycoprotéine 340
- IgA : Immunoglobulines A
- IgG : Immunoglobulines G
- LPS : Lipopolysaccharide
- LTA : Acide Lipoteichoïque
- MG1 : Mucines de haut poids Moléculaire
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PEA : Pellicule Exogène Acquisée
- PRP : Protéines Riches en Proline
- PRP : Phosphoprotéine Riches en Proline
- Srr : Serine Rich Repeat
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène
- AI-2 : autoinducteur-2
- RadA : arginine inhibitable adhesin
  
- *Streptococcus mutans* : *S. mutans*
- *Streptococcus mitis* : *S. mitis*
- *Streptococcus salivarius* : *S. salivarius*
- *Streptococcus sobrinus* : *S. sobrinus*
- *Streptococcus oralis* : *S. oralis*
- *Streptococcus sanguinis* : *S. sanguinis* (anciennement *sanguis*)
- *Streptococcus cristatus* : *S. cristatus*
- *Veillonella parvula* : *V. parvula*

- *Prevotella intermedia* : *P. intermedia*
- *Porphyromonas gingivalis* : *P. gingivalis*
- *Fusobacterium nucleatum* : *F. nucleatum*
- *Actinomyces naeslundii* : *A. naeslundii*
- *Treponema denticola* : *T. denticola*
- *Eikenella corrodens* : *E. corrodens*
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* : *A. actinomycetemcomitans* ou *A.a*
- *Tannerella forsythia* : *T. forsythia*

## Introduction

Nous vivons dans un monde peuplé de bactéries. Notre corps est un réservoir où se mêlent des micro-organismes commensaux et parfois des pathogènes. Depuis Pasteur, les progrès des techniques modernes de la biologie moléculaire ont évolués. C'est ainsi qu'aujourd'hui il a été identifié environ 1000 espèces différentes de bactéries dans la cavité buccale.

Celle-ci est colonisée par des bactéries qui adhèrent sur les dents et forment la plaque dentaire (amas bactérien, sans organisation particulière) qui prend le nom aujourd'hui de biofilm (accumulation structurée et ordonnée de bactéries). Ainsi, la notion de biofilm est plus qu'une communauté microbienne diversifiée noyée dans une matrice de polymères produite par les bactéries, qui adhère sur la surface des dents. En effet, les bactéries présentes dans un biofilm ont une physiologie différente de celles planctoniques. Des interactions de compétition et de mutualisme se mettent en place permettant l'adhérence et le développement d'un grand nombre d'espèces différentes. De plus, les bactéries communiquent entre elles à travers des molécules de signalisation, et utilisent le système de quorum-sensing pour optimiser leurs facteurs de virulence et de survie.

L'ensemble de ces observations montre pourquoi l'étude des bactéries dans la cavité buccale se fait désormais par l'étude des biofilms plutôt que par l'étude des espèces individuelles.

La parodontite et les caries sont des maladies infectieuses de la cavité buccale dans lesquelles les biofilms buccaux jouent un rôle causal. Ainsi, la compréhension des différentes propriétés inhérentes à ceux-ci est essentielle pour envisager des traitements efficaces. En effet, l'étude des mécanismes de quorum sensing ou d'échanges de gènes entre les bactéries pourrait offrir des cibles pour d'éventuelles thérapeutiques.

# I. Le biofilm

## A. Définition d'un biofilm bactérien

### 1. Définition générale

Le biofilm se définit comme une accumulation de micro-organismes, de différentes espèces, adhérant à une surface généralement en relation avec un environnement aqueux (*Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006*).

Cette notion récente est apparue à la fin des années soixante dix mais son implication en médecine n'a été prouvée que depuis une dizaine d'années.

Des cellules microbiennes se développent au sein d'une matrice formée de biopolymères, principalement des polysides, excrétés par des micro-organismes à certains moments de leur cycle cellulaire. L'architecture de ce biofilm est complexe et l'organisation des différents micro-organismes ne se fait pas au hasard. Cela dépend notamment de leur nature et de leurs affinités variables de co-adhésion. De plus, il est important de noter que le biofilm est en interaction constante avec l'environnement et peut donc varier en fonction de celui-ci mais aussi des conditions physico-chimiques externes et de l'activité des métabolismes microbiens.

Bien que cette découverte soit assez récente les micro-organismes n'ont jamais cessé de s'organiser de la sorte pour lutter contre les conditions environnementales et afin de coloniser tous types de surface. Très rencontrés dans le milieu marin, on retrouve des biofilms à la surface des rochers et des coraux mais aussi et surtout sur la coque des bateaux. (*Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006*).

## 2. La plaque dentaire : un modèle de biofilm

### a) Définition

L'utilisation récente de technique de microscopie confocale à balayage laser a pu montrer que la plaque a une architecture similaire à celle des biofilms provenant d'autres sites. (*Marsh, 2003*)

Dans la cavité buccale, les surfaces dentaires et gingivales baignent en permanence respectivement dans la salive et le fluide gingival qui représentent donc le milieu humide et chaud, permettant la croissance d'une remarquable collection de micro organismes, à l'origine de la formation du biofilm. (*Marsh et Martin, 2009*) Celui ci est alors appelé plaque dentaire. Elle se présente sous la forme d'un dépôt mou, adhérent et plus ou moins coloré. Elle est formée par des bactéries reliées entre elles par une matrice extra cellulaire polysaccharidique (EPS). (*Ten Cate, 2006*)

Elle est capable de se fixer tant sur les surfaces dentaires que sur des éléments prothétiques, orthodontiques ou sur certaines obturations. A noter que les études sur l'adhérence bactérienne ont montré que les surfaces lisses sont aussi facilement colonisées que les surfaces rugueuses, les caractéristiques physiques d'une surface influant peu. (*Costerton et al, 1995*)

Par contre, les zones difficiles d'accès au nettoyage (comme les espaces interdentaires ou les sillons, par exemple) montreront une accumulation plus importante. (*Marsh, 2003*)

Ainsi, la plaque dentaire, très hétérogène, varie quantitativement en fonction des zones de la cavité buccale mais aussi en fonction des individus.

### b) Les différents types de plaque dentaire

La plaque dentaire varie également qualitativement par la nature des bactéries qui la compose.

Il existe tout d'abord la plaque supra gingivale, qui est facilement détectée au cours d'un examen clinique à l'aide d'une sonde ou par des colorants. Elle se compose majoritairement de bactéries aérobies, qui sont responsables des caries.

Le deuxième type est la plaque sous gingivale, beaucoup plus difficilement évaluable cliniquement et qui n'est pas accessible au patient. Elle contient des bactéries anaérobies, plus virulentes, qui se développent en pH basique, qui sont à l'origine des maladies parodontales. (*Zijnge et al, 2010*)

### **c) Intérêts d'étudier le biofilm**

Les micro organismes organisés en biofilm, forment un environnement protecteur qui leur permet d'effectuer des échanges métaboliques mais aussi des échanges de gènes leur conférant, notamment, une résistance à certains antibiotiques (*Marsh et al, 2011*):

- **Diversité des bactéries:**

La présence d'oxygène ne permet initialement que la colonisation des surfaces de la cavité buccale par des bactéries aérobies. Mais une fois l'oxygène consommé, cela crée des conditions qui conviennent parfaitement à la croissance des bactéries anaérobies. (*Bradshaw et al 1997, 1998*)

Les mêmes phénomènes sont observés pour des bactéries ayant besoin d'un pH spécifique ou de certains nutriments. (*Chalmers et al, 2008*)

- **Résistance augmentée aux agents antimicrobiens :**

Un agent pathogène sensible à un antibiotique peut y devenir résistant si une bactérie voisine peut le neutraliser ou produire une enzyme le dégradant. (Herrera, 2000) Par exemple, les bactéries à Gram positif excrètent dans leur environnement proche une enzyme, la bêta lactamase.

Cette organisation en biofilm permet aussi une protection passive, grâce à la matrice extracellulaire qui empêche partiellement le passage d'éléments antibactériens, une protection active, en expulsant par des pompes d'efflux présentes au niveau des membranes bactériennes, certains produits hostiles aux bactéries, et enfin une protection génétique, par des échanges de matériel génétique entre les cellules, leur

conférant des propriétés différentes et une résistance accrue (Donlan et Costerton, 2002).

- **Une virulence accrue :**

Les maladies parodontales se développent suite à la présence de bactéries. Certaines bactéries ont un pouvoir de virulence majoré du fait de leur coopération avec d'autres espèces bactériennes au sein du biofilm. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).

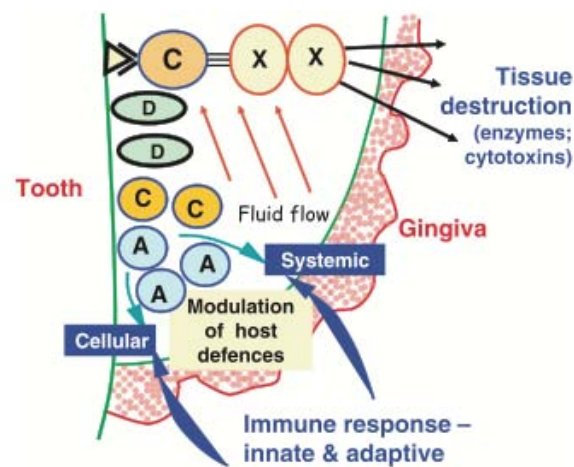


Figure 1: synergie pathogénique des bactéries ayant un rôle dans l'étiologie des maladies parodontales (Marsh 2011)

**Figure 1 :**

Des bactéries capables de provoquer directement des dommages aux tissus (par exemple les espèces X) peuvent être dépendantes de la présence d'autres micro-organismes (par exemple C et D) pour des éléments nutritifs essentiels (par exemple par l'intermédiaire d'une chaîne alimentaire) ou de sites de fixation (co-adhésion) afin qu'ils puissent croître et résister aux forces créées par l'augmentation du débit de fluide gingival. De même, ces deux groupes de bactéries (C et D) peuvent être dépendants, pour leur survie, d'autres micro-organismes (par exemple A et C) pour moduler les défenses de l'hôte.

Toutes ces propriétés seront plus largement décrites dans les chapitres suivants.

### 3. Caractéristiques des bactéries

#### a) Définition

Les bactéries sont des cellules autonomes, qui vont pouvoir se multiplier dans un environnement adapté. Il en existe de nombreuses espèces différentes qui varient en forme et en taille. On distingue alors :

- les bactéries sphériques, coque ou cocci, de forme ovoïde
- les bactéries bacillaires, fusiformes, aux extrémités effilées

Elles mesurent de 0,2 micromètres pour les Chlamydia à 250 micromètres pour les Spirochètes, la moyenne étant de 1 à 10 micromètres. (*Barsotti, 2006*)

#### b) Structure

Les bactéries sont des organismes procaryotes, qui ne contiennent ni noyau ni organelle et ne possèdent pas non plus de réticulum endoplasmique ou d'appareil de Golgi. Leur structure et leur composition chimique varient d'une espèce à l'autre. (*Madigan et Martinko, 2010*)

- **Le nucléoïde**

C'est une région irrégulière située à l'intérieur des cellules dans laquelle se trouve tout ou presque tout le matériel génétique. À la différence du noyau des cellules eucaryotes, le nucléoïde des bactéries n'est pas délimité par une membrane nucléaire. Il est composé de 60 à 80 % d'ADN, 10 % d'ARN et de 10 % de protéines.

- **Le cytoplasme**

C'est un fluide aqueux composé de ribosomes, d'éléments nutritifs, d'ions, d'enzymes, de déchets, de granules de réserves et de diverses molécules qui interviennent dans la synthèse, l'entretien cellulaire et le métabolisme énergétique.



- **La membrane plasmique**

Elle se trouve sous la paroi et se compose d'une double couche de phospholipides et de protéines. Elle forme une barrière perméable et permet les échanges entre la bactérie et le milieu extérieur. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).

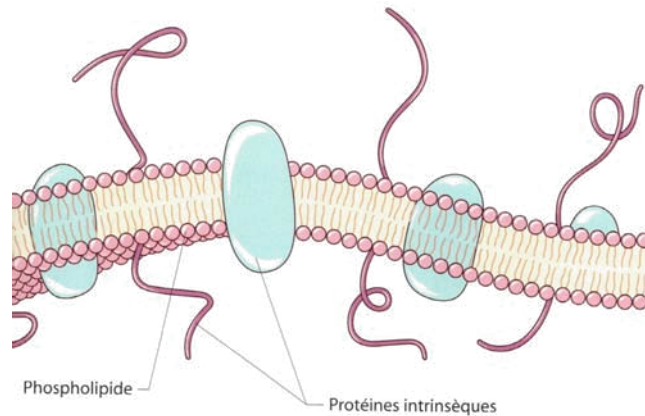


Figure 2: membrane cellulaire d'une bactérie. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006)

- **La paroi cellulaire**

Leur paroi cellulaire permet de les classer en deux groupes, les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, en fonction de la différence de structure et de composition chimique de celle-ci qui sera mise en évidence grâce à la coloration de Gram.

Les bactéries qui se révèlent à Gram positif sont constituées d'une paroi cellulaire relativement épaisse contenant un peptidoglycane épais et des acides teichoïques et lipoteichoïques (LTA). Ces LTA sont des polymères de glycérol et de phosphore qui se fixent à la membrane par un lipide. Ils traversent ensuite la paroi et exposent, au delà, un domaine glucidique hydrophile, chargé négativement.

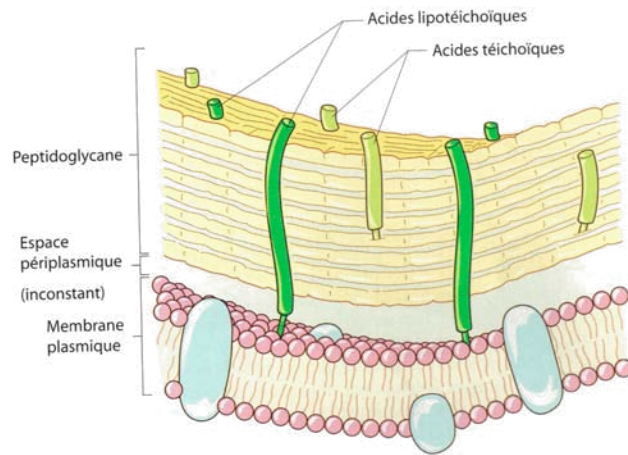


Figure 3: paroi d'une bactérie à Gram positif. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006)

Les bactéries à Gram négatif présentent une paroi constituée de deux couches. La couche interne est un peptidoglycane peu dense localisé dans le périplasma (entre la membrane cytoplasmique et une membrane cellulaire externe) recouvert d'un peptidoglycane plus dense, qui est faite de phospholipides. La couche externe est une bicouche lipidique contenant des macromolécules appelées lipopolysaccharides (LPS) et des protéines appelées porines.

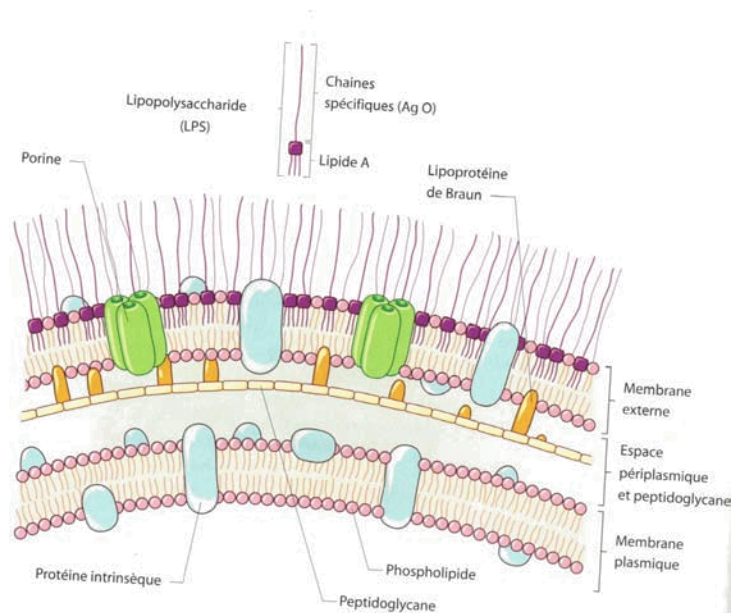


Figure 4 : paroi d'une bactérie à Gram négatif. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006)

Il existe également des bactéries dépourvues de paroi : les mycoplasmes. (*Madigan et Martinko, 2010*)

- **Composants externes de la paroi**

- La capsule/glycocalyx

Le glycocalyx est un réseau de polysaccharides retrouvé à la surface des bactéries et comprend capsules et couches mucoïdes. Très fréquemment retrouvé dans les biofilms, il protège les bactéries de l'action des antiseptiques, des antibiotiques et sert de réserve nutritive.

- Les flagelles

On les retrouve chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ils s'attachent à la membrane plasmique et traversent la paroi. Ils se composent de protéines, les flagellines et permettent aux bactéries de se déplacer en milieu liquide pour accéder à une source de nutriment ou pour échapper à des substances nocives.

- Les fimbriae

Ils sont également présents chez les bactéries à Gram positif et négatif. Insérés dans la membrane plasmique, ces fins filaments s'étendent vers le milieu extérieur mais ne sont pas impliqués dans la mobilité des bactéries. Ils se composent de protéines majeures, les fimbrillines et pilines, et de protéines mineures, les adhésines. Ces dernières permettent l'adhésion des bactéries entre elles ou à une surface, même à distance, par l'établissement de ponts.

- Les pilis sexuels

Peu nombreux, ils jouent un rôle dans les échanges de matériel génétique entre cellules et notamment dans les phénomènes de conjugaison.

(Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).



Figure 5: *Porphyromonas gingivalis*, microscopie électronique à balayage. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).

On distingue également les bactéries qui ont absolument besoin d'oxygène pour leur métabolisme, ce sont des *aérobies strictes* ; d'autres ne peuvent absolument pas survivre en sa présence, ce sont des *anaérobies strictes*. Enfin, certaines sont *aérobies facultatives* (ou *aéro-anaérobies*), elles peuvent se développer à la fois en absence ou en présence d'oxygène.

Tableau 1 : principales bactéries retrouvées dans la plaque dentaire supra et sous gingivale. (AFSSAPS, 2011)

Bactéries aérobies ou anaérobies facultatives	Bactéries anaérobies
<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>
<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Porphyromonas catoniae</i>
<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Streptococcus cristatus</i>	<i>Leptotrichia spp.</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Selenomonas spp.</i>
<i>Stomatococcus spp.</i>	<i>Parvimonas micra (Peptostreptococcus</i>

<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>micros)</i>
<i>Haemophilus spp.</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>Capnocytophaga</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Neisseria</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Spirochètes dont Treponema denticola</i>	
<i>Eikenella corrodens</i>	
<i>Pseudomonas</i>	

Tableau 2 : bactéries de la flore présente dans les infections parodontales. (AFSSAPS, 2011)

Gingivite	Parodontite agressive localisée	Parodontite agressive généralisée	Parodontite chronique
<i>Actinomyces gerencseriae</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Anaeroglobus geminatus</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Campylobacter rectus</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Capnocytophaga granulosa</i>	<i>Campylobacter rectus</i>
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Dialister invisus</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Parvimonas micra</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Leptotrichia buccalis</i>	<i>Treponema denticola</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Campylobacter gracilis</i>	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Parvimonas micra (Peptostreptococcus micros)</i>	<i>Eubacterium nodatum</i>	<i>Selenomonas spp.</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Prevotella spp.</i>		<i>Tannerella forsythia</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
		<i>Treponema denticola</i>	<i>Spirochètes (Treponema spp.)</i>
		<i>Treponema lecithinolyticum</i>	<i>Tannerella forsythia</i>

<i>Spirochètes</i> <i>(Treponema spp.)</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Veillonella parvula</i>			<i>Treponema denticola</i> <i>Veillonella spp.</i>
--	--	--	---

Les techniques modernes de biologie moléculaire ont identifié environ 1000 espèces de bactéries différentes dans le biofilm dentaire. (Ten Cate, 2006)

Chez l'homme, la flore buccale est composée de parasites eucaryotes, de champignons et levures, de mycoplasmes et de plus de 500 espèces bactériennes. Les bactéries sont diversifiées et, dans la bouche, six milliards de nouveaux micro-organismes seraient produits en 1 ou 2h. (Gracieux, Robert, Bonnaure-Mallet, 2006).

Tableau 3 : la flore buccale en quelques chiffres. (Bonnaure Mallet et al, 2006)

Un individu	10 <sup>13</sup> cellules eucaryotes	
	10 <sup>14</sup> bactéries	
Dans la cavité buccale	10 <sup>10</sup> bactéries avec plus de 500 espèces différentes	
	En 2h, 6 milliards de bactéries sont renouvelées	
	En 4h, il y a entre 2,5 x 10 <sup>5</sup> et 6,3 x 10 <sup>5</sup> bactéries par mm <sup>2</sup> sur la dent	
	1 mg de biofilm dentaire= 10 <sup>9</sup> bactéries	
Sur les cellules épithéliales	Face interne des joues	Pour une cellule : 0 à 25 bactéries
	Face dorsale de la langue	Pour une cellule : 100 bactéries

## B. Structure du biofilm

Le biofilm est de nature hétérogène et contient des micro-colonies individuelles. Les biofilms sont composés de 85% de matériau de matrice et de 15% de cellules présentant une organisation particulière. Des canaux d'eau libre sont intercalés entre les micro-colonies ayant une forme de « tour » ou de « champignons ». (*Lawrence, Korber, Hoyle, et Costerton, 1991*)



Figure 6: schématisation de l'organisation des micro-colonies et des espaces libres dans un biofilm.  
(Rodney et Costerton, 2002)

### 1. La composition bactérienne

Les techniques biochimiques basées sur l'ADN ont permis l'étude des gènes bactériens. Grâce à la technique d'imagerie confocale à balayage laser, les bactéries peuvent maintenant être visualisées en trois dimensions au sein de biofilms vivants, grâce à des colorants fluorescents qui ciblent des protéines ou enzymes spécifiques à chaque bactérie. (*Ten Cate, 2006*)

Les espèces bactériennes constituant le biofilm dentaire ont été regroupées en six complexes. (*Socransky, 1998 et 2004*)

## a) Composition générale

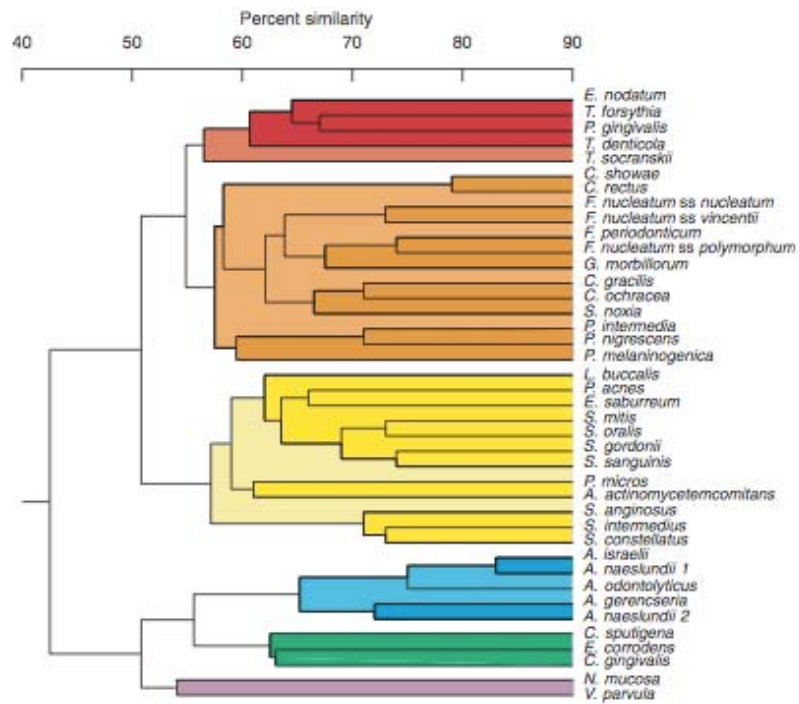


Figure 7: les complexes bactériens. (Socransky et al, 2008)

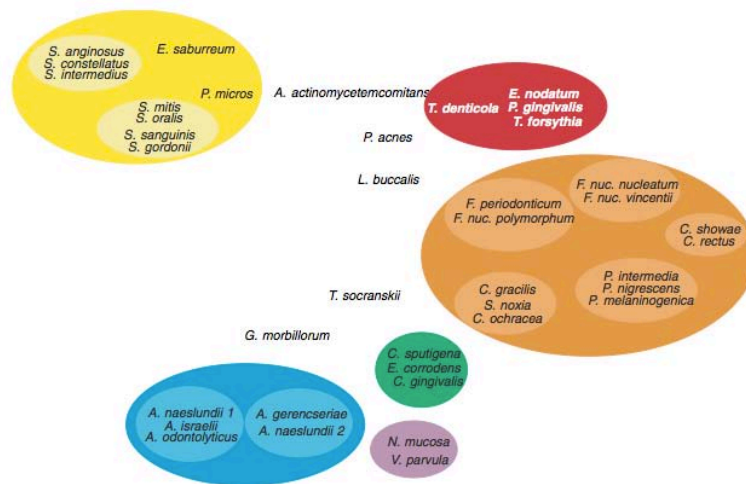


Figure 8: diagramme des complexes bactériens. (Socransky et al, 2008)



- **Biofilm supra-gingival**

La plaque supra-gingivale est la première à se former. Elle se compose de bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif, cariogènes telles que les *Streptocoques mutans*, *S. salivarius* et *S. sanguis* (aujourd'hui *sanguinis*).

Au fur et à mesure que le biofilm se forme sur les surfaces supra-gingivales et au contact de la fibromuqueuse gingivale, sa composition bactérienne varie permettant ainsi la croissance de formes et de colonies bactériennes pouvant déclencher une inflammation gingivale.

- **Biofilm sous-gingival**

Le biofilm sous gingival colonise le sillon gingivo-dentaire et les poches parodontales qui sont dépourvus d'oxygène. Le métabolisme des bactéries dans cette zone est donc de type anaérobie.

Les différences de composition bactérienne dans des prélèvements de biofilms réalisés chez des patients en bonne santé ou chez des patients atteints de parodontite ont pu être étudiées et ont abouti à la création des complexes bactériens de Socransky.

Les échantillons de plaque sous-gingivale de personnes en bonne santé contiennent surtout les espèces *Actinomyces* (complexe bleu) et, en quantités inférieures, les espèces *Streptococcus* (complexe jaune) et *Veillonella* (complexe violet). Moins de 4% des bactéries totales identifiées font parties de l'orange (*Fusobacterium*, *Prevotella*, *Campylobacter rectus*) ou du rouge (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), qui sont tous deux associés à la maladie parodontale.

Les biofilms matures développés à partir des échantillons de plaque de sujets sains présentent la même composition.

Dans la plaque sous-gingivale de patients atteints de parodontite, les espèces dominantes étaient en effet les membres du complexe d'orange. Cette augmentation a également été observée dans les biofilms matures cultivés à partir de ces échantillons. (*Walker, Sedlacek, 2007*)

La composition bactérienne de la plaque mature varie en fonction de la surface dentaire qu'elle colonise (par exemple au niveau des surfaces proximales et lisses, les fissures, et le sillon gingival)

**Tableau 4 : les groupes prédominants de bactéries en fonction des différentes surfaces de la dent colonisées. (Marsh, 2003)**

	<i>Percentage viable count (range)</i>		
	<i>Fissures</i>	<i>Approximal surfaces</i>	<i>Gingival crevice</i>
<b>Bacterium</b>			
<i>Streptococcus</i>	8-86	< 1-70	2-73
<i>Actinomyces</i>	0-46	4-81	10-63
An G + R <sup>a</sup>	0-21	0-6	0-37
<i>Neisseria</i>	+ <sup>b</sup>	0-44	0-2
<i>Veillonella</i>	0-44	0-59	0-5
An G-R <sup>a</sup>	+	0-66	8-20
<i>Treponema</i>	-	-	+
<b>Environment</b>			
Nutrient source	Saliva & diet	Saliva, diet & GCF	GCF <sup>c</sup>
pH	Neutral-acid	Neutral-acid	Neutral-alkaline
Eh	Positive	Slight negative	Negative

<sup>a</sup>An G + R: An G-R: obligately anaerobic Gram-positive and anaerobic Gram-negative rods, respectively.

<sup>b</sup>+: detected occasionally.

<sup>c</sup>GCF: gingival crevicular fluid.

Adapted from Marsh and Bradshaw (1999).

L'accumulation de la plaque dentaire se fait préférentiellement sur les sites stagnants qui ne sont pas soumis aux forces de cisaillement qui se produisent dans la bouche. Les bactéries prédominantes de chaque surface, identifiées grâce aux techniques classiques de culture, sont énumérées dans le tableau 4. (Marsh, 2003)

Environ 50% des cellules de la plaque ne peuvent encore pas être cultivées en laboratoire. Il existe un nombre de taxons nouveaux, identifiés par PCR (polymerase chain reaction), en particulier sur les sites sous-gingivaux, dont nous savons peu de choses (Kroes et al, 1999 ; Paster et al, 2001).

Une fois établi sur un site, la microflore résidente reste relativement stable au fil du temps, en dépit des perturbations régulières mineures de l'environnement (par exemple l'alimentation, l'hygiène bucco-dentaire). Cette stabilité est appelée homéostasie microbienne, qui est due à un équilibre des interactions microbiennes, par synergie et antagonisme (Alexander, 1971; Marsh, 1989).

## **b) Etude de Zijng et al. (2010) :**

Les auteurs ont utilisé l'hybridation fluorescente in situ pour localiser, in vivo, les espèces les plus abondantes et celles associées à la parodontite au niveau de sept dents issues de quatre sujets différents. Les données ont montré de façon convaincante la prédominance du genre *Actinomyces sp.*, et des espèces *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Spirochètes*, et de la famille du phylum des *Synergistetes* dans la plaque sous-gingivale. Cette étude a montré, pour la première fois in vivo, que le genre *Lactobacillus sp.* représente les cellules centrales des agrégats de bactéries dans la plaque sous-gingivale, alors que *Streptococcus sp.* et la levure *Candida albicans* forment les structures en épis de maïs de la plaque supra-gingivale. Ces observations in vivo, sur les biofilms oraux, offrent une vision précise sur l'architecture du biofilm et la distribution spatiale des espèces prédominantes.

L'utilisation d'hybridation fluorescente in situ, a également montré, pour la première fois, in vivo, que la formation initiale du biofilm était le résultat de l'agrégation et de l'adhérence entre *Streptococcus spp.* et *Actinomyces spp.* (*Palmer, 2003*).

Dans une étude ultérieure avec la même technique, il a été démontré, in vivo, qu'après sept jours la proportion de streptocoques a diminué et la proportion de *Fusobacterium nucleatum* a augmenté. (*Al-Ahmad, 2007*)

### **(1) Biofilm sous gingival d'après l'étude de Zijng :**

Quatre couches différentes ont été distinguées.

- La couche basale est composée de cellules présentant peu de fluorescence par rapport aux autres cellules. De toutes les sondes testées, seule *Actinomyces sp.* a donné un signal positif dans cette couche, visible sur le panneau A de la figure 9.
- La couche intermédiaire est composée de plusieurs cellules fusiformes dont *F. nucleatum*, *T. forsythia* et éventuellement d'autres *Tannerella sp.* qui sont visibles dans les panneaux E et F.
- La couche supérieure et une partie de la couche intermédiaire du biofilm

contiennent principalement des bactéries appartenant à la famille *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB-cluster) qui sont montrées dans le panneau D. Ces cellules sont filamenteuses, en forme de tige ou même coccoïde. Les échantillons avec une double coloration ont montré que la plupart des bactéries filamenteuses appartiennent au genre *Tannerella* sp., tandis que la plupart des bactéries en forme de tige appartiennent au genre *Prevotella* sp. et *Bacteroidetes* sp. Dans la couche supérieure, on retrouve également des *Synergistes* sp, en étroite relation avec des cellules eucaryotes (panneau C).

- En dehors du biofilm, une quatrième couche, sans organisation claire, a été observée. Des *Spirochètes* ont pu être identifiés et forment le genre dominant. (Zijngel et al, 2010)

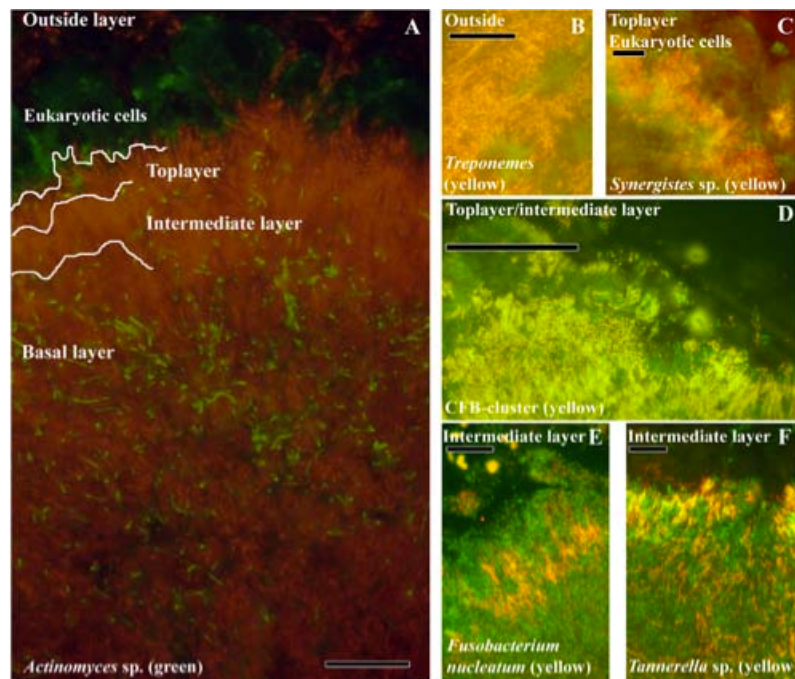


Figure 9: visualisation des espèces les plus abondantes du biofilm sous gingival. (Zijngel et al, 2010)

## (2) Biofilm supra gingival :

En général, son architecture, plus hétérogène, se compose de deux couches différentes avec toujours une couche basale, à la surface de la dent. Selon les patients et les bactéries en présence, on peut décrire différents types de biofilm selon 4 couches basales (Figure 9).

- Tout d'abord, un biofilm constitué seulement de bâtonnets : *Actinomyces sp.*, perpendiculairement orientés vers la surface des dents (panneau D).
- Le second type est un mélange d'*Actinomyces sp.* et de chaînes de cocci, non identifiées, comme les *Streptocoques*, perpendiculairement orientées à la surface de la dent (panneau E).
- Le troisième type montre un biofilm de bactéries filamenteuses, des *Streptocoques* et les levures, où les *Streptocoques* forment des colonies distinctes autour des cellules de levure (panneau F).
- Le quatrième type est composé essentiellement de *Streptocoques* grandissant à proximité immédiate de *Lactobacillus sp.* qui sont orientés perpendiculairement à la surface de la dent (panneau G).

Une deuxième couche peut recouvrir la couche basale de n'importe quel type de biofilm.

*Streptococcus sp.* peut alors être présent sous forme de cellules dispersées, sans organisation apparente (panneau A3), ou ils peuvent être alignés en une fine couche (panneau A1).

Les *Lactobacillus sp.*, qui s'éloignent de la surface des dents, sont entourées par des cellules présentant différentes morphologies (panneau C). (Zijngel et al, 2010)

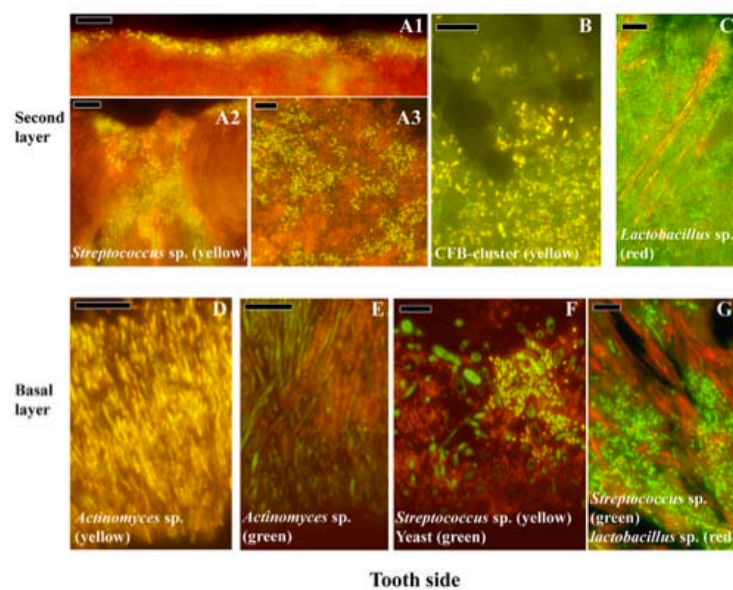


Figure 10: visualisation de la répartition des nombreuses espèces composant le biofilm supra gingival. (Zijngel et al, 2010)

## 2. Architecture, composition et propriété de la matrice

Les études du centre de Bozeman Montana Engineering définissent le biofilm comme une mince couche basale en contact avec la surface de l'émail et parfois même le pénétrant. Il subit des forces de cisaillement qui peut entraîner le détachement de cellules individuelles ou sa desquamation. (*Costerton et al, 1995*)

Les biofilms ont également montré de grands espaces ouverts ("channels"). Différents auteurs ont cherché à savoir si ces canaux étaient remplis de substance polymère extracellulaire (EPS) ou étaient effectivement ouverts. Thurnheer et al. avec leurs biofilms colorés avec du calçifluor apportent la preuve que ces canaux sont comblés avec EPS. (*Thurnheer et al, 2006*)

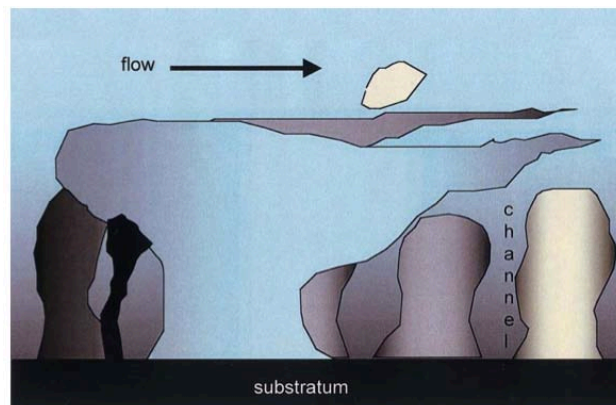


Figure 11: coupe transversale d'un biofilm. (Ten Cate, 2006)

Cette architecture plus ouverte devrait permettre aux molécules de se déplacer facilement dans et hors de la plaque, mais la présence d'une matrice constituée d'une gamme variée d'exo-polymères, crée un complexe environnemental qui régule la pénétration et la distribution des molécules au sein de la plaque (*Robinson et al. 1997, Thurnheer et al. 2003, Marcotte et al. 2004*), y compris les agents thérapeutiques. Cette structure aérée traversée de systèmes canaliculaires permet le transport d'aliments et éventuellement d'agents antibactériens.

Le biofilm est composé de 15 à 20 %, en volume, de bactéries. Le reste représente la matrice extracellulaire qui est un réseau de polymères qui permet la cohésion des bactéries entre elles et leur adhésion aux différentes surfaces dentaires et

muqueuses. Elle se compose de protéines et de polysaccharides et est produite directement par les bactéries du biofilm. Cette matrice est fortement hydratée et favorise la croissance bactérienne par apport de nutriments. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

Il faut recourir à la microscopie électronique pour l'observer. Elle contient les restes de la lyse bactérienne et des produits de l'activité bactérienne issus de la salive et du fluide gingival tels que les polysaccharides, les immunoglobulines mais aussi des enzymes bactériennes et salivaires. La matrice est riche en glucides ce qui renforce la cohésion de la plaque et forme une réserve d'énergie pour les bactéries. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

Une fois que le biofilm s'est formé et que la matrice d'exo polysaccharides a été sécrétée, la structure résultante est très viscoélastique et se comporte d'une manière caoutchouteuse (*Stoodley et al, 1998*).

## **II. Formation du biofilm**

Dans la cavité buccale, différentes molécules s'adsorbent entre autres sur des surfaces dures de compositions diverses (émail, amalgames, composites, CIV...) Les bactéries vont reconnaître ces molécules et s'y adhérer de manière sélective souvent avec avidité. Par exemple, il est bien établi que les protéines salivaires sélectivement adsorbées à la surface, forment ainsi une pellicule, et forment des liaisons sélectives avec les bactéries. Une fois irréversiblement liées aux films moléculaires sur des surfaces d'accueil, les bactéries elles-mêmes peuvent servir de substrats, et les molécules qui composent leurs surfaces membranaires sont des sites où d'autres bactéries adhèrent sélectivement pour initier la formation d'un biofilm mixte. L'établissement d'interactions entre bactéries est qualifié de «co-agrégation» ou «co-adhésion», selon que le phénomène est étudié avec des cellules en suspension ou sur un substrat solide. Les bactéries agglutinées au sein des biofilms obtiennent plus facilement des nutriments et sont protégées contre les médiateurs et les cellules de l'immunité de l'hôte. (*Ellen, Lepine, Nghiem, 1997*)

Les cellules bactériennes fixées sur les surfaces des dents produisent des polymères extracellulaires telles que des hydrates de carbone complexes et des acides nucléiques. Ces hydrates de carbone forment une matrice protectrice qui contribue au développement de la carie dentaire et de la parodontite. L'identification des produits microbiens à chaque étape de la formation des biofilms buccaux, offrira de nouvelles possibilités pour les mesures de prévention thérapeutiques visant à contrôler les maladies infectieuses par voie orale. (*Jakubovics, Kolenbrander, 2010*)

### **A. La pellicule exogène acquise**

La pellicule exogène (=PEA) acquise est un élément important car il constitue l'interface entre la surface de l'émail et la première couche du biofilm oral. Il est prouvé que cette structure est formée par l'adsorption sélective de protéines, de peptides et d'autres molécules de la salive. (*Al-Hashimi, Levine, 1989. Siqueira et al, 2007*)



Deux évènements récents ont facilité l'étude de celle-ci : l'amélioration des méthodes de prélèvement de la pellicule à la surface de la dent in vivo, et l'explosion des techniques de spectrométrie de masse qui permettent la caractérisation des peptides. (*Siqueira et al, 2009*)

## **1. Sa composition**

C'est un film protéique fin, son épaisseur ne dépasse pas 1  $\mu\text{m}$ . Il se forme spontanément sur les surfaces dentaires par adsorption sélective de protéines d'origine salivaire. On y trouve également d'autres composants tels que des glycoprotéines, des phosphoprotéines comme les immunoglobulines A (IgA) immunoglobulines G (IgG), le lysosyme, l'albumine, l'alpha amylase, la glycosyl-transferase, les mucines de haut poids moléculaire MG1 et les cystatines, l'anhydrase carbonique, les phosphoprotéine riches en proline (PRPs), la stathérine, et l'acide sialique. On a aussi identifié des sucres : galactose, mannose, glucose. Récemment, on a découvert deux nouveaux constituants qui sont la calgranuline B et des cytokératines. A noter que la pellicule exogène acquise trouvée dans le sillon gingivo dentaire et différente car elle comprend en plus des constituants provenant du fluide gingival comme notamment les phospholipides. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

## **2. Son adhérence à la surface amélaire**

La pellicule exogène acquise est un film d'origine salivaire dépourvu d'éléments cellulaires et de bactéries. Elle recouvre rapidement toute surface exposée à l'environnement buccal et on trouve ainsi des protéines détectables à peine 3 minutes après brossage et polissage professionnel. Les glycoprotéines salivaires riches en proline qui la composent se fixent sur les atomes de phosphates et de calcium exposés par les cristaux d'hydroxyapatites de manière spontanée. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

### **3. Son rôle**

Elle sert de lubrifiant qui va donc protéger les surfaces contre l'usure. Elle est tenace car ne s'élimine pas avec des simples méthodes d'hygiène habituelles.

De plus, elle joue un rôle dans l'homéostasie minérale de l'émail dentaire en formant une barrière et un tampon contre les agents de déminéralisation et en constituant un réservoir en électrolytes de reminéralisation. (*Siqueira et al, 2007*)

Son deuxième rôle est de permettre la fixation de bactéries.

Sa structure lui confère la possibilité de retenir certaines bactéries buccales ce qui initie alors la première étape de formation du biofilm.

Les bactéries possèdent des adhésines chargées positivement qui vont se fixer aux lectines chargées négativement de la pellicule. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

## **B. Les différentes étapes de l'adhérence bactérienne**

### **1. L'agrégation bactérienne**

Dans la cavité buccale humaine, le biofilm se forme sur la surface des tissus durs et mous, et parfois les deux. Les bactéries du biofilm qui sont exposées dans la bouche sont souvent éliminées, par le cisaillement mécanique du mouvement de la langue et des joues, par le flux salivaire ou par le brossage des dents. La colonisation des surfaces dentaires, après brossage, commence en quelques minutes, et après quelques heures, un vaste dépôt microbien peut être observé (*Palmer et al, 2006*).

Le développement de biofilms buccaux dépend des interactions entre les molécules de surface des bactéries : les adhésines et leurs récepteurs d'accueil.

#### **a) L'adhésion réversible**

##### **(1) L'adhésion des bactéries pionnières, colonisateurs primaires**

De nombreux micro-organismes qui entrent dans la bouche sont immédiatement pris

au piège par la salive. Certains viennent en bref contact avec des surfaces de tissus durs ou mous oraux mais ne se développent pas. N'ayant pas de récepteur approprié. Ce sont les colonisateurs transitoires, qui sont parfois détectés dans des enquêtes taxonomiques, mais participent peu à l'élaboration de communautés microbiennes. (Nobbs et al, 2011)

L'adhérence des bactéries à la pellicule salivaire constitue la première étape dans la colonisation des surfaces amélaire dans la bouche. Les streptocoques oraux ont été systématiquement identifiés comme étant les colonisateurs primaires, et ces organismes constituent 60-80% des bactéries de la plaque dentaire dans les 4 à 8 heures (Diaz et al, 2006; Dige et al, 2009).

D'autres colonisateurs primaires tels que les espèces *Actinomyces spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Propionibacterium spp.*, et *Veillonella spp.* sont présentes. La plupart des interactions physiques et chimiques qui se produisent entre les micro-organismes de cette communauté sont connus et seront décrites ultérieurement. (Kolenbrander et al, 2002)

## (2) Mécanisme

Les bactéries pionnières appartiennent à l'espèce des *streptocoques* du groupe *mitis* qui adhère mieux que ceux du groupe *mutans*. L'adhérence se fait par l'intermédiaire d'interactions physico-chimiques non spécifiques, dites réversibles, entre les bactéries et les surfaces dentaires ou muqueuses. Une bactérie libre se rapproche d'une surface grâce à 4 mécanismes différents :

- la convection : ensemble de forces résultants des mouvements de langue et des courants salivaires
- les mouvements actifs de bactéries motiles
- la diffusion passive : mouvement Brownien des bactéries qui leur permet un déplacement aléatoire
- la gravitation (Bonnaure Mallet et al, 2006)

Les micro-organismes sont généralement transportés passivement par le flux de la

salive ou du fluide gingival. Quelques espèces (*Wolinella*, *Selenomonas* ou *Campylobacter spp*), trouvées en sous gingival, ont des flagelles et sont donc mobiles. (Marsh 2011)

Il peut donc être soutenu que les micro-organismes, en essayant de coloniser un substrat encore inconnu, vont le faire en utilisant des forces d'interactions non spécifiques, sans l'aide d'adhésines. Ce n'est que lorsque ces forces ont permis à l'organisme d'adhérer à un substrat que le processus d'exploration des caractéristiques chimique de la surface va commencer, conduisant finalement à l'élaborations d'adhésines spécifiques. (Busscher et Van Der Mei, 1997)

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

## **b) L'adhésion irréversible spécifique**

### **(1) Les différents types de liaison**

L'adhérence irréversible implique des interactions entre des molécules spécifiques à la surface des cellules microbiennes, appelées adhésines, et des molécules complémentaires présentes dans la pellicule exogène acquise, appelées récepteurs. (PD Marsh 2011) Ce type de liaison est appelé interaction sélective. (Bonnaure Mallet et al, 2006) Ces interactions adhésine/récepteur sont solides et fonctionnent sur une distance relativement courte. Elles seront la cible possible d'intervention dans le but de bloquer la colonisation. (Whittaker, Klier, Kolenbrander, 1996)

Il existe également des interactions non sélectives entre une surface bactérienne globalement chargée négativement et la pellicule exogène acquise. Cette charge négative est fournie par l'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positif, et par le LPS des bactéries à Gram négatif. La pellicule étant chargée négativement, les bactéries s'y fixent par l'intermédiaire de cations divalents tels que les ions calcium (Ca<sup>2+</sup>). (Bonnaure Mallet et al, 2006)

Enfin, le dernier type d'interaction spécifique est la liaison enzyme/substrat.

(Bonnaure Mallet et al, 2006)

Les *streptocoques viridans* expriment de nombreuses protéines et lipoprotéines de type adhésines au niveau de leur membrane cellulaire. Par exemple, le génome de *Streptococcus sanguinis* code pour au moins 93 polypeptides qui sont prévus pour être ancrés à la surface des cellules et peuvent potentiellement être impliqués dans l'adhésion (Xu et al, 2007). Cela confère aux *streptocoques* une capacité de liaison exceptionnellement large aux récepteurs humains ou bactériens.

## (2) Mécanismes (tableau 5)

- **Les interactions sélectives adhésines/récepteurs**

Dans les premiers stades de la formation du biofilm, l'adhésion entre les cellules bactériennes se fait principalement grâce aux interactions adhésines/récepteurs. (Jakubovics, Kolenbrander, 2010)

### - L'antigène I/II (Ag I/II)

Certaines adhésines sont largement conservées chez les streptocoques oraux et sont susceptibles de jouer un rôle clé dans l'adhésion aux surfaces buccales. Par exemple, l'antigène I/II est constitué de protéines exprimées au niveau de la membrane des streptocoques commensaux oraux tels que *S. gordonii*, *S. oralis sanguinis*, et par les *streptocoques cariogènes de type mutans* (*S. mutans* et *S. sobrinus*) et les *streptocoques extra-oraux* tels que *S. pyogenes*. (Jakubovics et al, 2005)

Ag I/II joue un rôle central dans la liaison à la glycoprotéine 340 (gp340) de la salive. Lorsque gp340 est intégrée dans la pellicule exogène acquise, cela favorise l'adhérence avec les streptocoques.

Les grands agrégats bactériens n'adhèrent pas bien aux surfaces et sont retirés de la bouche par la déglutition.

Ag I/II peut également influencer la fixation des bactéries aux tissus mous. *Streptocoque gordonii* produit deux polypeptides, SspA et SspB, qui sont des

protéines majeures de surface de cette bactérie. Elles sont capables d'interagir avec la matrice extracellulaire, le collagène et la fibronectine (Jakubovics et al, 2009).

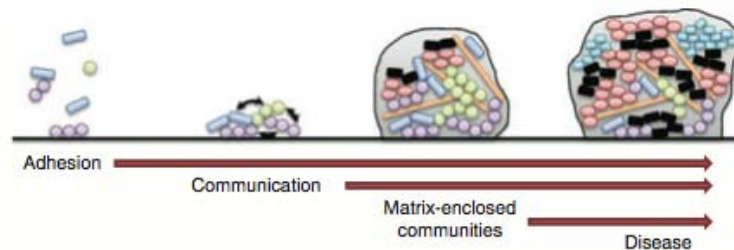


Figure 12: schématisation des étapes de formation d'un biofilm. (Jakubovics, Kolenbrander, 2010)

- Les protéines de la famille des serine rich repeat (Srr)

Les adhésines Srr exprimées à la surface bactérienne ont la capacité de reconnaître les hydrates de carbone (saccharide) des groupements glycosylés des constituants salivaires. Les protéines Srr sont produites par des *Streptocoques*, *Staphylocoques*, et *Lactobacilles*, et ont une forme d'appendice appelée fibrilles ou fimbriae.

Elles sont caractérisées par la présence de multiples répétitions de motifs riches en sérine qui peuvent constituer environ 80% de la protéine totale.

Deux variantes de protéines Srr ont été trouvés sur *Streptococcus gordonii*, qui sont Hsa et GspB. Ces deux protéines permettent l'adhésion à la pellicule salivaire grâce à la reconnaissance de l'acide sialique de certain de ses composants, y compris la mucine salivaire MG2 et l'agglutinine salivaire (Takamatsu et al, 2006).

- Dans les interactions spécifiques de type ligant/récepteur, impliquées dans l'adhérence irréversible, les adhésines bactériennes jouent le rôle de ligant. L'adhésine la plus fréquente est la lectine qui se lie à un sucre spécifique.

Les *Streptocoques mitis* ont la capacité de se lier à de nombreuses molécules de l'hôte grâce à leurs adhésines Ag I/II ou P1, leurs adhésines Lral et leurs protéines fixant l'amylase qui leur permettent de se fixer aux glycoprotéines salivaires de type agglutinines.

- Le mécanisme de fixation du genre Actinomyces est différent. Les adhésines sont exprimées par leurs fimbriae. Il en existe un premier type qui se lie aux PRP et la stathérine et permet donc la colonisation des tissus durs, par le biais de la PEA. Le

deuxième type se lie aux tissus épithéliaux et à d'autres bactéries. Ce type de contact se fait par l'intermédiaire d'un pont calcaïque qui peut alors se faire à distance de la surface à coloniser et initie le passage à la phase irréversible.

- **Adhésion non sélective**

- *Streptocoque gordinii* se lie aux protéines riches en proline (PRP) qui représentent 25 à 30 % des protéines salivaires totales. Il dégrade ensuite ses protéines en oligopeptides qui inhiberont la fixation du genre *Actinomyces*, deuxième bactérie pionnière.

Ces deux bactéries pionnières sont donc en compétition.

- Toutes les protéines de surface qui favorisent la colonisation microbienne buccale ne sont pas que des adhésines. Un exemple est FomA, produite par *Fusobacterium nucleatum*. Les adhésines de bactéries à Gram négatif peuvent être divisées en deux classes: les adhésines des fimbriae et des protéines de membrane externe (OMP). FomA est une OMP majeure de *F. nucleatum* et appartient à la famille des porines. La fonction première des porines est de permettre la diffusion non spécifique de petits solutés à travers la membrane cellulaire. Cependant, FomA montre aussi un fort attachement à la stathérine qui est une composante salivaire. (Nobbs et al, 2011)

- **Interaction enzyme/substrat**

L'interaction enzyme/substrat est illustrée par la glycosyl transferase présente à la surface de *Streptococcus mutans* et qui permet la lyse des polymères de type glycane en présence de saccharose. Ces glycanes adhèrent fortement aux dents et la fixation de l'enzyme à ceux-ci permet alors la fixation de streptocoque mutans à la pellicule exogène acquise.

- **Le glycocalyx**

Enfin, pour terminer l'adhérence irréversible, les streptocoques vont produire une matrice extracellulaire (ou glycocalyx) composée de glycanes insolubles, de

glycanes et fructanes solubles et d'hétéropolymères, qui permettent aux bactéries de finaliser leur adhésion. (Bonnaure Mallet, 2006)

Tableau 5 : propriétés fonctionnelles des adhésines bactériennes. (Nobbs et al, 2010)

Protein Group	Protein(s)	Species	Function(s) and/or Substrata
Serine-rich repeat (Srr) family	Fap1	<i>S. parasanguinis</i>	Salivary pellicle
	Hsa/GspB	<i>S. gordonii</i>	Salivary pellicle (gp-340); fibronectin; host cells
Antigen I/II family	SpaP	<i>S. mutans</i>	Salivary pellicle; host cells ( $\alpha_5\beta_1$ integrins); fibronectin; type I collagen; laminin
	SspA/SspB	<i>S. gordonii</i>	Salivary pellicle (gp-340); host cells ( $\alpha_5\beta_1$ integrins); fibronectin; type I collagen; co-aggregation ( <i>Actinomyces</i> spp., <i>P. gingivalis</i> , <i>C. albicans</i> )
Pili/Fimbriae	FadA	<i>F. nucleatum</i>	Epithelial/endothelial cells
	FimA (major) fimbriae; Mfa1 (minor) fimbriae	<i>P. gingivalis</i>	Host cells ( $\alpha_5\beta_1/\alpha_5\beta_1$ integrins); fibronectin; type I collagen; co-aggregation ( <i>S. gordonii</i> )
	Flp1	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Epithelial cells; salivary pellicle
	FimP/Q (type I)/ FimA/B (type 2)	<i>A. oris</i>	Salivary pellicle; host cells; (Gal-GalNAc receptors); co-aggregation ( <i>Streptococcus</i> spp.)
	PilA, B, C	<i>S. sanguinis</i>	Fibronectin; epithelial cells
Outer membrane proteins	FomA	<i>F. nucleatum</i>	Porin protein; salivary pellicle (statherin); co-aggregation ( <i>P. gingivalis</i> )
	HBP35	<i>P. gingivalis</i>	Co-aggregation ( <i>A. naeslundii</i> ; <i>S. gordonii</i> ; <i>S. mutans</i> )
	Msp	<i>T. denticola</i>	Epithelial cells; fibronectin, fibrinogen, laminin, type I collagen; co-aggregation ( <i>F. nucleatum</i> ; <i>P. gingivalis</i> )
Auto-transporters	Aae/ApiA/EmaA	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Epithelial cells; type I collagen
	RadD	<i>F. nucleatum</i>	Co-aggregation ( <i>Streptococcus</i> spp.)

### c) Adhérence irréversible aux tissus (tableau 5)

La cavité buccale adulte a une superficie moyenne d'environ 215 cm<sup>2</sup>, dont 30% de tissus mous kératinisés et 50% de non kératinisés. L'épithélium buccal offre donc une surface étendue à laquelle les micro-organismes peuvent se fixer, au niveau de récepteurs exprimés directement à la surface des cellules épithéliales ou par des composants de la matrice extracellulaire sous-jacente. (Nobbs et al, 2011)



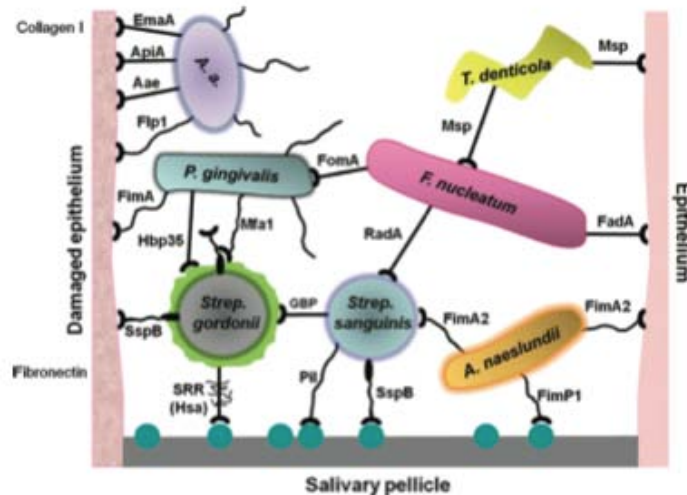


Figure 13: représentation schématique des interactions entre les micro organismes oraux et les tissus de l'hôte. (Koo et al, 2010)

### (1) Pili et protéines fibrillaires

La plupart des adhésines fibrillaires impliquées dans l'adhérence à la pellicule exogène acquise, tel Srr et Ag I/II, sont également impliquées dans la fixation des bactéries aux tissus de l'hôte.

Une autre grande famille de protéines fibrillaires bactériennes comprend les pili.

- **Au niveau des bactéries à Gram positif**

Ces appendices sont formés à partir de la sortase C, par polymérisation de sous unités protéiques majeures (formant le squelette) et de protéines mineures (les auxiliaires) pour générer une tige qui s'étend vers le haut à 3 µm de la surface cellulaire, souvent avec une pointe adhésive. A la surface de *Streptococcus sanguinis* ils sont composés de polymères de 3 sous-unités distinctes (Pil A, B, C) qui favorisent la fixation à la fibronectine et aux cellules épithéliales (Okahashi et al, 2010).

Deux loci codant les pili ont également été identifiés chez *Actinomyces naeslundii*, le type 1 (Fim P / Q) et le type 2 (Fim A / B). Le fimbriae de type 1 favorise l'adhérence de *A. naeslundii* T14V (renommé *A. oris*) aux protéines riches en proline de la PEA, tandis que le FimA du fimbriae de type 2 se fixe à Gal-GalNAc présent à la surface des cellules de l'hôte et à d'autres bactéries orales. (Mishra et al, 2010)

- **Au niveau des bactéries à Gram négatif**

Les protéines fibrillaires jouent un rôle important pour l'adhésion des bactéries à Gram négatif. Le pathogène parodontal *Porphyromonas gingivalis* exprime au moins deux types de fimbriae: les fimbriae majeures (0,3 à 1,6 µm), et les mineures (80 à 120 nm). Les protéines prédominantes qui composent ces fimbriae, sont respectivement FimA et Mfa1. (Nobbs et al, 2011)

Les fimbriae majeures sont les principaux médiateurs de l'attachement initial de *P. gingivalis* aux cellules épithéliales gingivales, grâce à la reconnaissance des récepteurs de type intégrine (avβ3 et α5β1) à la surface des cellules épithéliales.

Au moins 6 formes alléliques de FimA ont été découverts à ce jour, qui se lient aux récepteurs de type intégrine avec des affinités différentes, et ce en corrélation avec la pathogénicité de *P. gingivalis*.

La protéine Fada, fimbriae de *Fusobactérium nucleatum*, a récemment retenu l'attention du fait de l'identification de sa structure qui contribue à des complications systémiques. Cette protéine Fada existe sous deux formes: la forme non sécrétée pré-Fada (129 résidus d'acides aminés) et la forme sécrétée, Fada mature (mFada, 111-résidus d'acides aminés). Cette protéine semble favoriser la fixation et l'invasion de *F. nucleatum* dans les cellules épithéliales et endothéliales. (Han et al, 2005)

Mais ces fonctions dépendent de la présence de deux formes pré-Fada et mFada. La capacité de la protéine Fada à adhérer aux cellules endothéliales est l'un des mécanismes par lesquels *F. nucleatum* peut perturber une grossesse, en permettant sa colonisation placentaire. (Nobbs et al, 2011)

## **(2) Protéines de membrane externe – Msp**

Les *Spirochètes oraux* tels que *T. denticola* sont fortement associés au développement de la maladie parodontale. L'une des adhésines prédominantes de *T. denticola* est la protéine de surface Msp. Sa localisation précise est encore incertaine.

Il s'agit donc d'une protéine qui se lie à la matrice extra-cellulaire, à la fibronectine, au fibrinogène, à la laminine, au collagène de type I (*Edwards et al, 2005*), et aux fibroblastes épithéliaux ou gingivaux. (*Mathers et al, 1996; Fenno et al, 1998*)

### (3) Auto-transporteurs – EMAA

L'autre classe importante de protéines de surface identifiée au niveau des bactéries à Gram négatif est les auto-transporteurs. Ils ont des fonctions diverses, mais beaucoup restent encore à caractériser. Ces protéines contiennent tous les éléments nécessaires à leur auto-transfert vers la surface de la cellule bactérienne. Elles sont divisées en 3 domaines: une séquence signal N-terminal, un domaine central de passagers, et un C-terminal de translocation. La séquence signal dirige le passage de la protéine dans le périplasme. L'unité de translocation s'insère dans la membrane externe afin de former un pore  $\beta$ , à travers lequel passe le domaine passager. Cela conduit à la présentation du domaine passager à la surface cellulaire, grâce à l'unité de translocation qui sert de point d'ancrage membranaire. (*Henderson et al, 2004*)

Le pathogène *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* exprime au moins 3 auto-transporteurs, nommés Aae, Apia, et EmaA. Les protéines Aae et Apia permettent l'attachement de *A. actinomycetemcomitans* aux cellules buccales humaines (*Fine and al, 2005*), tandis que EmaA se lie au collagène de type I, un mécanisme également associé à l'initiation de l'endocardite infectieuse. EmaA est structurellement distincte des deux autres auto-transporteurs. Celles-ci comprennent une tige d'environ 150 nm qui se termine par une calotte ellipsoïdale, dans laquelle le domaine de liaison au collagène est situé. Les résidus d'acides aminés à l'intérieur de la tige forment des coudes au sein de la structure, lui conférant une flexibilité pour assurer une adhérence optimale au collagène. (*Tang et al, 2008*)

## 2. La coagrégation bactérienne et interactions bactériennes

### a) Co-agrégation

#### (1) Définitions

La liaison entre deux bactéries en suspension est appelée adhérence interbactérienne ou co-agrégation tandis que la co-adhérence est la liaison d'une bactérie libre à une autre déjà fixée. Cela se produit par l'intermédiaire de liaisons spécifiques entre une protéine de surface d'une bactérie et le récepteur complémentaire d'une autre.

La co-adhérence et la co-agrégation peuvent s'établir entre deux bactéries d'une même espèce, elle est donc dite homotypique, ou entre deux bactéries d'espèce ou de genre différent, elle est alors dite hétérotypique. La seule espèce capable de réaliser ces deux types d'interaction est le streptocoque. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

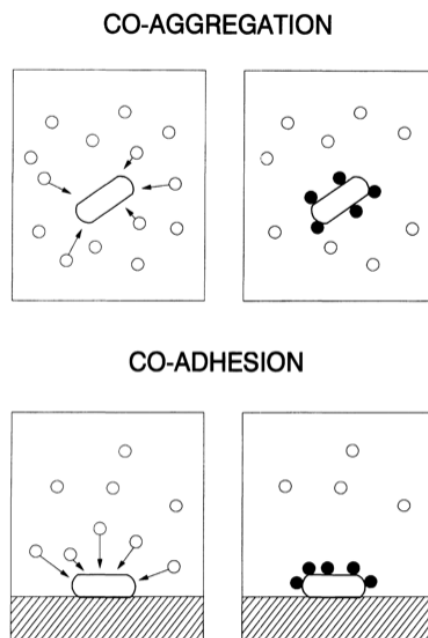


Figure 14: différence entre co-adhésion et co-agrégation. (Busscher and Van Der Mei, 1997)

## (2) Présentation

La fixation initiale des colonisateurs primaires aux surfaces orales représente de nouveaux récepteurs pour l'adhésion ultérieure d'autres bactéries. Dans de nombreux cas, la co-agrégation implique la reconnaissance de structures glucidiques sur la surface d'un micro-organisme par les protéines adhésines de type lectine d'un autre. (*Kolenbrander et al, 2006*)

De nombreuses publications ont montré la capacité des streptocoques oraux à recruter d'autres bactéries du biofilm. Certains auteurs ont mis en contact des streptocoques en culture auxquels ils ont ajouté des bactéries buccales issues de patients. Il a été observé de nombreuses interactions des streptocoques avec des bactéries non streptococciques. Les interactions adhésives entre les bactéries peuvent être observées en laboratoire, dans des études *in vitro*, à partir de suspensions denses de cellules d'espèces diverses. Dans les 10 secondes, les différentes cellules bactériennes forment des co-agrégats, visibles à l'œil nu.

La co-agrégation se produit seulement entre les micro-organismes ayant des récepteurs compatibles, et est dépendante de la présence d'adhésines d'une part et de leurs ligands d'autre part. (*Kolenbrander et al, 2006*)

La co-agrégation entre les bactéries orales a été étudiée en détail et plus d'un millier d'interactions par paires ont été évaluées.

*Fusobacterium nucleatum* est le micro-organisme qui présente le plus d'affinités avec presque toutes les autres bactéries orales identifiées à ce jour. *Fusobacterium nucleatum* est une bactérie obligatoirement anaérobie et n'est pas habituellement retrouvé dans la plaque dentaire supra-gingivale naissante. Cependant, les niveaux de *F. nucleatum* augmentent avec le développement de la plaque en sous gingival et cet organisme représente jusqu'à 20% ou plus de la totalité des bactéries. *F. nucleatum* semble agir comme un pont en se liant aux deux premiers colonisateurs, *Streptocoques* et *Actinomyces*, d'une part, et aux pathogènes parodontaux d'autre part, tels que *Porphyromonas gingivalis* ou *Prevotella intermedia*. (*Suzuki et al, 2004*)

### (3) Les différents colonisateurs

Le développement d'une communauté microbienne buccale est le résultat de phénomènes de compétition et de coopération entre les colonisateurs précoces et tardifs, parmi les 500 espèces qui la composent.

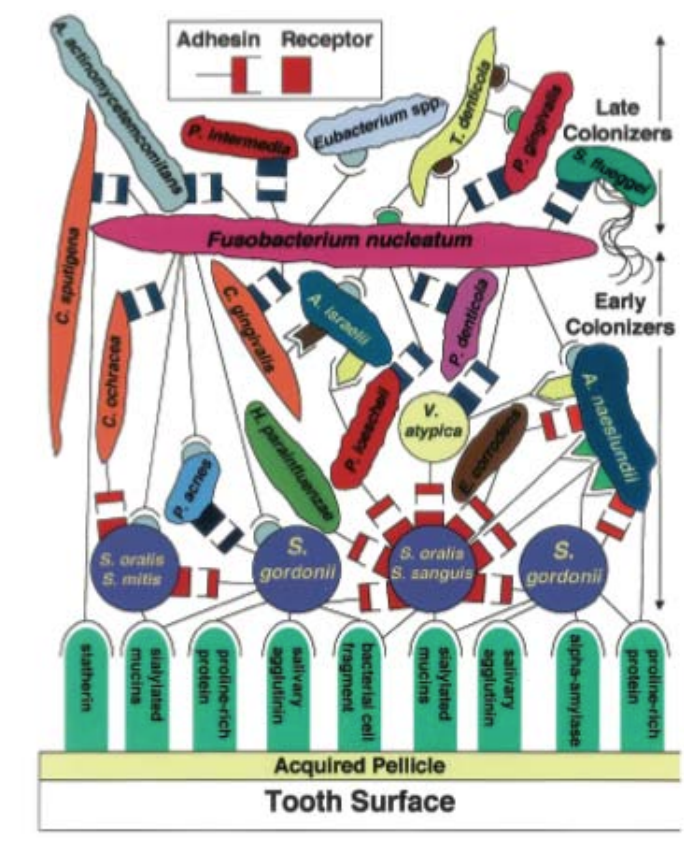


Figure 15: la concurrence et la coopération entre les colonisateurs précoces et tardifs à la surface de la dent. (Kolenbrander and al, 2002)

La figure 15 représente un modèle spatio-temporel de la colonisation bactérienne par voie orale. Chaque co-agrégation représentée est connue pour se produire par paire. En partant du bas, les colonisateurs primaires se lient, via des adhésines, (*S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. sanguis*) aux récepteurs salivaires complémentaires de la pellicule exogène acquise adsorbée à la surface de la dent. Les colonisateurs secondaires se lient à ces premières bactéries par des phénomènes de co-agrégation. Plusieurs types de co-agrégation sont représentés comme des ensembles complémentaires de symboles de formes différentes.

Les adhésines représentées sont des composants inactivés par la chaleur (la suspension cellulaire est chauffée à 85 ° C pendant 30 min) et sont sensibles aux protéases; leurs récepteurs complémentaires ne sont pas affectés par la chaleur ou par les protéases. Des symboles identiques représentent des composants qui sont fonctionnellement similaires mais de structure différente. Les symboles rectangulaires sont des co-aggrégations pouvant être inhibées par le lactose.

D'autres symboles représentent des composants qui n'ont pas d'inhibiteur connu.

Les souches bactériennes représentées sont *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium spp.*, *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Propionibacterium acnes*, *Selenomonas flueggei*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Treponema spp.*, et *Veillonella atypica*.

- **Les colonisateurs précoces**

*Streptocoques viridans*, et surtout *S. gordonii*, sont les premiers colonisateurs. De nombreuses espèces buccales se co-agrègent sur ces deux colonisateurs précoces qui eux se lient à plusieurs molécules de l'hôte. *Streptococcus* est le seul genre bactérien oral qui démontre une vaste co-agrégation intra générique et inter générique. *Streptocoque viridans* a la capacité de se lier à d'autres colonisateurs précoces et à des molécules de la PEA (cf fig. 15) et donc forme précocement la plaque dentaire. (Kolenbrander, 2000)

*S. gordonii* se lie aux glycoprotéines salivaires agglutinine par SspA / B. *S. gordonii* se lie à des protéines riches en proline par l'intermédiaire des extrémités ProGln des PRP. Les PRP représentent 25 à 30% des protéines totales dans la salive; ils régulent le phosphate de calcium et l'équilibre des cristaux d'hydroxyapatite et contribuent ainsi à la stabilisation de l'intégrité de la dent. (Kolenbrander et al, 2002)

Les PRP ne sont pas les seuls récepteurs pour la liaison des bactéries (Fig. 15), ils sont aussi une source de nutriments prêts à moduler l'adhérence des bactéries potentiellement concurrentes tels que *A. naeslundii* à la surface de la dent.

Les bactéries buccales sont capables de se lier à un récepteur et par la suite d'utiliser ce même récepteur en tant que nutriment, disposant ainsi de mécanismes de fixation différents. Elles peuvent se lier aux récepteurs de l'hôte ou à d'autres bactéries tout en dégradant les éléments nutritifs des PRP. Ces nombreuses interactions entre les streptocoques, les molécules de l'hôte, et d'autres colonisateurs démontrent les différents échanges entre les bactéries et aussi avec leur environnement. (*Kolenbrander et al, 2002*)

Les premières bactéries colonisatrices ont montré la capacité de réguler l'expression de certains gènes en réponse à un environnement contenant de la salive. Par exemple, en présence de salive, *S. gordonii* DL1 augmente l'expression de SspA / B, codant pour des protéines de surface qui se lient à l'agglutinine de salive. (*Dû et Kolenbrander, 2000*) Ainsi, les streptocoques en suspension dans la salive peuvent se lier à l'agglutinine salivaire et obtenir une expression accrue de la SspA / B.

Étant donné que chacune des 500 espèces de la communauté bactérienne buccale présente un tel potentiel pour la régulation des gènes en réponse à des molécules produites par l'hôte, et des interactions physiques avec d'autres bactéries, que la complexité des interactions possibles dans l'environnement buccal et le nombre de possibilités de communication de cellule-à-cellule deviennent redoutables. (*Kolenbrander et al, 2002*)

- **Les colonisateurs tardifs et *Fusobactérium nucleatum***

Les espèces bactériennes représentées dans la figure 15 sont placées selon deux catégories générales, les colonisateurs précoces ou les colonisateurs tardifs. Ce classement est basé sur le type d'espèce bactérienne identifiée dans la plaque dentaire lors de l'échantillonnage temporel, après les procédures d'hygiène buccale. (*Socransky et al, 1998*)



*Fusobacterium nucleatum*, cependant, est inhabituellement et intentionnellement placée à la frontière entre colonisateurs précoces et tardifs (Fig. 15) pour les raisons suivantes. Tout d'abord, *F. nucleatum* est la bactérie à Gram négatif retrouvée en plus grande quantité dans les sites sains, et leur nombre augmente de façon marquée dans les sites atteints de maladie parodontale. Il est toujours présent quand *Treponema denticola* et *Porphyromonas gingivalis* sont également présents, ce qui suggère que sa présence est antérieure à celle de ces deux autres espèces et pourrait être nécessaire à leur colonisation. (Socransky et al, 1998)

Deuxièmement, la co-agrégation de *F. nucleatum* se fait avec tous les colonisateurs précoces et les colonisateurs tardifs. (Kolenbrander et al, 2002)

Certains des premiers colonisateurs bactériens se co-agrègent spécifiquement avec d'autres premiers colonisateurs, et rarement avec les colonisateurs tardifs. (Kolenbrander, 2000)

Bien que tous les colonisateurs tardifs se co-agrègent avec *F. nucleatum*, ils ne se co-agrègent généralement pas les uns avec les autres, à l'exception de *T. denticola* qui se fixe à *P. gingivalis* (Fig. 15, en haut à droite). Ainsi, *F. nucleatum* agit comme un pont entre les colonisateurs précoces et tardifs, ce qui peut expliquer en partie pourquoi les fusobactéries sont si nombreuses dans les échantillons provenant de sites sains et malades.

Enfin, en plus d'interactions avec les bactéries orales et les cellules hôtes, *F. nucleatum* interagit et se lie avec des molécules dérivées de l'hôte, telles que le plasminogène. *F. nucleatum* est une bactérie généralement non protéolytique, mais d'autres micro-organismes qui coexistent avec lui, comme *P. gingivalis*, présentent une activité très protéolytique. En présence de cystéine protéase (issue d'un surnageant de culture de *P. gingivalis*) ou d'autres enzymes telles que les streptokinases, Darenfed et al observent une activation du plasminogène, lié à *F. nucléatum*, en plasmine. Cette plasmine, une sérine protéase, joue un rôle dans l'augmentation des capacités d'invasion de ces micro-organismes. (Darenfed et al, 1999)

*F. nucléatum* acquiert alors une activité protéolytique qui lui confère une nouvelle propriété métabolique, et la capacité de traiter des signaux peptidiques potentiels

dans la communauté. Ces peptides peuvent être utilisés comme éléments nutritifs par les fusobactéries ou par d'autres résidents d'autres biofilm.

#### (4) Exemples de mécanismes de co agrégation hétérotypique

- ***Fusobacterium nucleatum***

Un certain nombre d'études portant sur la co-agrégation des organismes sous-gingivaux ont commencé à révéler la base mécanistique de ces interactions.

Comme illustration de la multiplicité d'expression des adhésines, une adhésine de *F. nucleatum*, RadA (arginine-inhibitable adhesin), est responsable de sa co-adhésion avec les streptocoques oraux. (Kaplan et al, 2009) Ainsi, la liaison de *F. nucleatum* aux streptocoques ne va pas occuper toutes les adhésines de la fusobactérie, et elle va pouvoir recruter de nouveaux pathogènes à Gram négatif.

*F. nucleatum* se lie à *P. gingivalis* par une liaison spécifique de type lectine adhésine en reconnaissant le fragment de sucre au niveau de la capsule et le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*. (Kinder, 1989. Kolenbrander et al, 1989)

*F. nucleatum* se lie également au galactose fournit par le polysaccharide de sérotype O-spécifique de *A. actinomycetemcomitans* et aux fractions glucidiques de la protéine majeure de la gaine extérieure de *T. denticola*.

*T. denticola* et *P. gingivalis* sont un exemple de l'accumulation de différentes espèces au sein d'un biofilm. Les protéines de répétition riches en leucine de *T. denticola* et *T. forsythia* participent aux liaisons inter-bactériennes entre elles mais aussi aux liaisons avec *F. nucleatum*. (Ikegami et al, 2004)

- ***P. gingivalis***

- Adhésion de *P. gingivalis* sur *Streptococcus gordonii* (Figure 16)

L'un des meilleurs exemples de co-adhésion est la liaison de l'agent pathogène *P. gingivalis*, aux substrats de *S. gordonii*. Cette interaction peut se produire sur des surfaces supra-gingivales, et alternativement ou en même temps, en sous gingival. L'accumulation de *P. gingivalis* se produit sur les récepteurs streptococciques (Maeda K et al, 2008). Cela représente ainsi un moyen par lequel la biomasse de *P. gingivalis* peut augmenter à travers l'attachement et le recrutement de cellules de la phase planctonique.

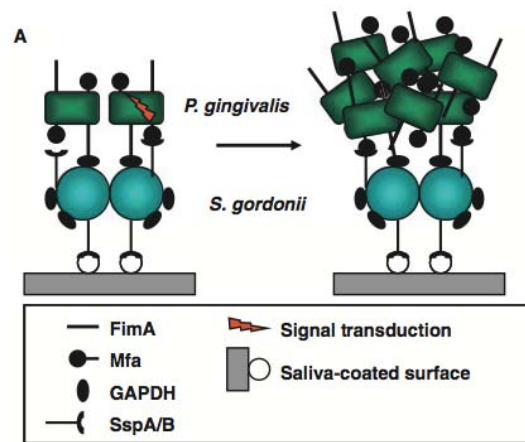


Figure 16: interactions entre *Streptocoque gordonii* et *Porphyromonas gingivalis*. (Kobuniwa et Lamont, 2010)

#### - Adhésines de *P. gingivalis*

La co-adhésion entre *P. gingivalis* et *S. gordonii* est réalisée par le biais de deux paires de récepteurs en forme de franges qui dépassent de l'enveloppe cellulaire. Ils permettent la liaison de *P. gingivalis* aux sites de la cavité buccale et à d'autres bactéries et sont de deux types.

Des longues (majeures) et courtes (mineures) sous-unités des protéines fimbriales de *P. gingivalis* interagissent, respectivement, avec les glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénases et les protéines de surface Ssp du *Streptocoque gordonii*. (Park and al, 2005, Maeda et al, 2004) (Figure 16)

\* Les longues fimbriales sont composées de la protéine de sous-unité structurale fimA et s'étendent approximativement sur 3 µm de la surface de la cellule. L'expression des fimA répond à des signaux environnementaux dépendant des conditions dans la

zone sous-gingivale, tels que la température et la concentration d'hémine (*Amana A et al, 1994*). Les domaines de liaison de fimA qui interviennent dans la fixation de streptocoques sont localisés dans une région C-terminale d'acides aminés, s'étendant des résidus 266 à 337. La sous-unité majeure se lie aux protéines salivaires et à la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) trouvée à la surface de *S. oralis*, *S. gordonii* d'autres streptocoques.

Il y a au moins six variantes différentes de fimA dans les souches de *P. gingivalis*, et les différences de liaison entre ces types de fimbrilline pourraient affecter la probabilité d'apparition de la maladie parodontale. Le locus fimA est caractérisé par des gènes qui sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle ou codent pour des protéines qui contribuent à la structure du fimbriae mature.

Les deux gènes en amont de fimA sont impliqués dans la régulation via un régulateur, FimR, qui fait partie de FimS/FimR, deux composants du système de transduction du signal qui régit les niveaux de transcription de FimA. (*Wright et al, 2012*)

\* Les fimbriae courtes de *P. gingivalis* font environ 6,5 nm de large et 103 nm de long, et sont composées de la protéine de sous-unité structurelle Mfa. (*Park et al, 2005*) L'interaction entre les protéines Mfa et Ssp présentes sur la surface des streptocoques, lui confère une plus grande résistance aux forces de cisaillement. Les interactions entre Mfa et Ssp initient une cascade de signaux de transduction à l'intérieur de *P. gingivalis* qui prépare la bactérie à une vie en communauté. En outre, comme la communauté de *P. gingivalis* - *S. gordonii* se développe, l'expression de Mfa est régulée à la baisse, ceci reflétant des besoins différents de ces adhésines. En effet, les sites des streptocoques étant déjà occupés, ils deviennent indisponibles pour de nouveaux *P. gingivalis* arrivant plus tard. (*Kobuniwa, Lamont, 2010*)

Mfa1 (67 kDa) a un rôle dans les processus inflammatoires. (*Lin et al, 2006*)

En aval de Mfa1 ont trouve un gène codant pour la protéine Mfa2. Cette protéine est connue pour avoir un rôle dans la régulation de la longueur de la fimbriae mineure et est nécessaire pour leur attachement à l'enveloppe de la cellule. Les cellules de *P. gingivalis* qui n'expriment pas Mfa2, mais qui continuent de produire Mfa1, ont des fimbriae mineures anormalement allongées et ces franges ne peuvent que faiblement se lier aux cellules. (*Hasegawa et al, 2009*)

- Adhésion de *P. gingivalis* avec *T. denticola*

*P. gingivalis* est capable de s'agréger avec diverses espèces à Gram positif et négatif. Ses longues fimbriae s'étendent sur une distance considérable à partir de sa paroi cellulaire bactérienne, ce qui suggère que ce sont les premiers composants bactériens à interagir avec d'autres bactéries. Par exemple, les longues fimbriae de *P. gingivalis* lui permettent d'adhérer avec *Treponema denticola*, un petit spirochète, par l'intermédiaire d'interactions spécifiques avec ses récepteurs appelés dentilisin, une protéinase analogue à la chymotrypsine. (Enersen et al, 2013) *T. denticola* est situé dans les couches superficielles de la plaque sous-gingivale, tandis que *P. gingivalis* est observée principalement sous la couche de spirochètes. (Suzuki et al, 2013)

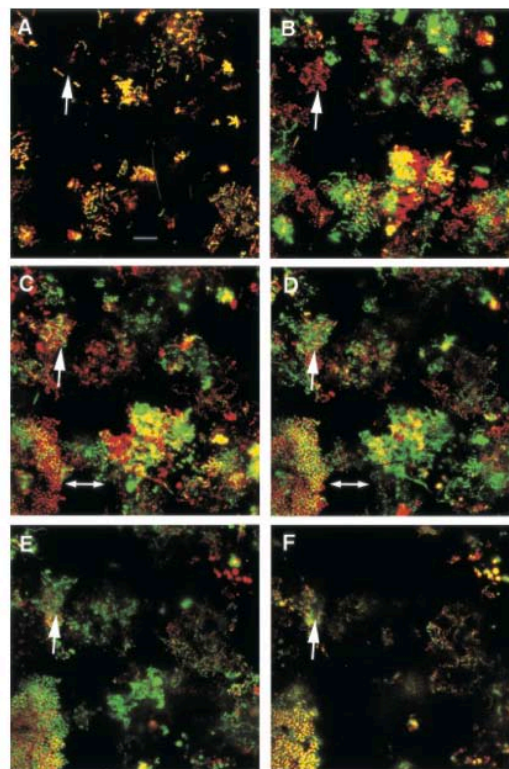


Figure 17: biofilm buccal formé in vitro à partir d'un prélèvement de salive et observé en imagerie confocal. (Kolenbrander et al, 2002)

Figure 17 : L'inoculation de salive en écoulement laminaire sur un substrat montre, après 18 h de croissance, la formation de microcolonies constitués de différents types bactériens en juxtaposition, ce qui suggère la construction de communautés d'espèces mixtes.

Dans ces conditions, la colonisation initiale sur le substrat est suivie par une croissance axiale et une accumulation vers la lumière. En écoulement laminaire, peu de forces de cisaillement agissent sur le substrat, car la vitesse d'écoulement salivaire est fortement réduite. Les masses de cellules peuvent communiquer entre elles (Fig. 17C, double flèche) plus facilement au niveau des espaces ouverts.

## **b) Interactions bactériennes**

Les interactions bactériennes conduisent à la formation de complexes microbiens, dans de nombreux cas constitués de plus de 50 espèces différentes de bactéries en un seul endroit. La communication chimique entre les bactéries est essentielle pour la coexistence stable des différentes espèces au sein de biofilms buccaux. (*Aas et al, 2005*)

La croissance ultérieure et la co-adhésion de bactéries permettent d'augmenter la densité cellulaire locale et conduisent au développement de micro-environnements au sein du biofilm. Au sein de ces communautés microbiennes, des produits métaboliques et les molécules de signalisation sont produites par les cellules d'une espèce qui peuvent influencer les bactéries voisines. La plupart des interactions entre les bactéries orales sont mutuellement bénéfiques. Il est clair que les communautés de bactéries sont mieux adaptées pour survivre et croître dans la salive qu'une espèce bactérienne seule. (*Jakubovics, Kolenbrander, 2010*)

Historiquement, l'analyse des caractères microbiens a commencé avec l'isolement de bactéries dans des cultures pures. Dans la plaque dentaire, cependant, la plupart des bactéries sont à proximité de cellules de différentes espèces et les interactions bactériennes peuvent avoir de profonds effets sur les micro-organismes en présence.

Pour comprendre le rôle essentiel des gènes et des protéines dans la survie et la croissance des bactéries dans les biofilms buccaux, il est nécessaire d'analyser des cultures mixtes de bactéries. Étant donné que la plaque dentaire mature peut contenir plus de 100 espèces bactériennes différentes, déterminer les interactions entre ces espèces concernées est de taille. (*Jakubovics, Kolenbrander, 2010*)

## (1) Adhérence hétérotypique : coopération-mutualisme

- **Les Fusobactéries**

Les fusobactéries agissent comme le principal pont entre les colonisateurs précoces et les colonisateurs tardifs. Certains de ces ponts de co-agrégation sont représentés sur la Fig. 15. Par exemple, le pont de co-agrégation entre *P. loescheii* et *S. oralis* est inhibé par le lactose, alors que celui entre *P. loescheii* et *Actinomyces israelii* ne l'est pas. *S. oralis* ne se co-agrège pas avec *A. israelii*, par conséquent, *P. loescheii* agit comme un pont de co-agrégation. Les deux bactéries *A. israelii* et *P. loescheii* se co-agrègent avec *F. nucleatum*, qui lui se co-agrège avec tous les colonisateurs tardifs.

Les ponts de co-agrégation sont des mécanismes de coopération pour réunir deux espèces qui ne sont pas des partenaires de co-agrégation au départ. Ces ponts peuvent faciliter la colonisation par de nouvelles bactéries dans le biofilm.

Les ponts sont distincts de la concurrence, qui se produit lorsque plusieurs espèces sont en compétition pour une liaison à un même récepteur.

Dans le cas de l'interaction de *P. gingivalis* avec *F. nucleatum*, celui-ci exprime une lectine adhésine qui reconnaît spécifiquement le galactose, présente au niveau de la capsule, et le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*.

*P. gingivalis*, et quelques autres colonisateurs secondaires tels que *F. nucleatum* peuvent également servir de pont en exprimant plusieurs adhésines qui permettent l'adhésion de colonisateurs plus tardifs. Ces interactions basées sur l'attachement permettent la formation du biofilm et l'évolution de celui-ci vers un état pathogène. (Kolenbrander et al, 2002)

Des récepteurs spécifiques du galactose se retrouvent sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *T. denticola*, sous la forme de O-polysaccharide et de groupes glucidiques, au niveau de la membrane externe.

Aussi, *T. denticola* et *Tannerella forsythia*, expriment chacun des leucine-rich repeat proteins, qui facilitent la liaison à *F. nucleatum*. (Wright et al 2012) (Fig. 19).

- **Les Streptocoques**

Les streptocoques sont des bactéries anaérobies facultatives et sont capables d'adhérer à un réseau de molécules salivaires dont les mucines, des protéines riches en proline, les statherines, les agglutinines salivaires (gp340) et l'alpha-amylase. (Nobbs et al, 2009) En conséquence, les streptocoques expriment une diversité de molécules de surface qui permettent la reconnaissance et donc l'adhérence à l'hôte ou à des récepteurs bactériens.

Les streptocoques participent également au développement de réseaux microbiens complexes.

- Adhérence à l'hôte

Par exemple, *Streptocoque sanguis*, aujourd'hui *sanguinis*, produit des longues structures filiformes appelées pilis qui sont composés de polymères de trois sous-unités protéiques différentes (PilA, PilB, PilC). Ceux-ci favorisent la fixation à des récepteurs de l'hôte. (Nobbs et al, 2009)

- Adhérence aux bactéries et à l'hôte

D'autres polypeptides ancrés dans la paroi cellulaire, identifiés au niveau des streptocoques oraux, comme les adhésines, comprennent CshA (et CshB). Elles forment des fibrilles de surface qui interagissent avec les microbes oraux et la fibronectine. (Holmes et al, 1996)

Le séquençage du génome a révélé que certaines souches de streptocoques peuvent transporter jusqu'à 30 gènes codant pour des protéines permettant l'ancrage à des parois cellulaires (Nobbs et al, 2009). Il est donc probable qu'à l'avenir d'autres adhésines, qui jouent un rôle dans la colonisation du streptocoque et le développement du biofilm, soient identifiées.

La capacité de *S. mutans* à convertir le saccharose en molécules de glucane adhérentes favorise également l'attachement de ces organismes aux dents. Des bactéries dépourvues de cette propriété peuvent être piégées de manière non spécifique par ces glucanes dans une plaque en développement. (Hamada et al, 1980)



- **Adhérence entre colonisateurs précoces**

La fimbriae de type 2 à la surface de *Actinomyces oralis* qui reconnaît le polypeptide des parois cellulaires de *Streptococcus oralis*, permet ainsi aux cellules de se co-aggréger. (Palmer et al, 2003)

- **Streptocoques et colonisateurs secondaires et tardifs**

Les Streptocoques et les autres micro-organismes colonisateurs primaires offrent des sites de fixation pour des colonisateurs plus pathogènes comme *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* et *P. gingivalis* qui sont étroitement associés à la parodontite. (Perisasamy et Kolenbrander, 2010)

Une interaction interspécifique se crée entre *P. gingivalis* et *S. gordonii*. Ceci se produit par le biais de deux ensembles de paires d'adhésine/récepteur (Fig. 18). *Porphyromonas gingivalis* présente une liaison préférentielle aux surfaces orales recouvertes de certains Streptocoques, tels que *S. gordonii* et d'autres membres du groupe *oralis*. Il est probable que cette interaction commence principalement sur la surface supra-gingivale de la dent. (Wright et al, 2012)

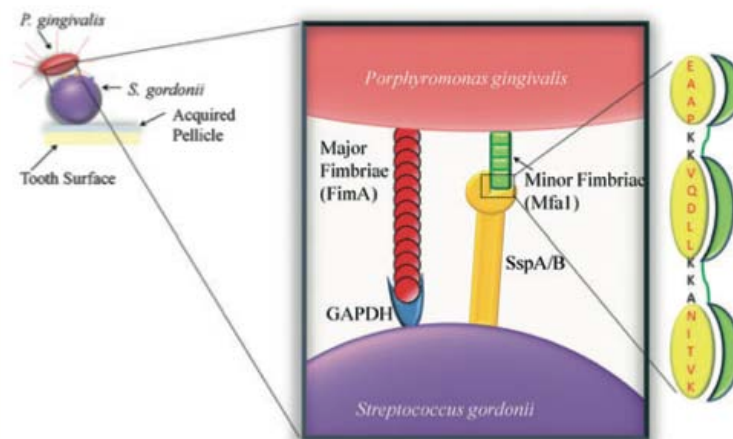


Figure 18: interaction de *Porphyromonas gingivalis* avec *Streptococcus gordonii*, qui dépend de deux ensembles de paires adhésine-récepteur. (Wright and al, 2012)

La figure 18 montre que les fimbriae majeure et mineure de *P. gingivalis* se lient respectivement à la glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et aux SspA/B de la surface de *S.gordonii*. Les domaines de SspA/B, qui interagissent avec la sous-unité fimbriae mineure, Mfa1, permettent de maintenir les contacts entre les deux espèces.

- **Interactions des streptocoques avec *Porphyromonas* et *Candida***

- Les adhésines des streptocoques oraux AgI / II

Les AgI/II des streptocoques sont des adhésines multi-fonctionnelles avec la possibilité de se lier à des composants de la PEA tels que le collagène, la laminine, ainsi qu'à d'autres micro-organismes. Les fonctions des protéines AgI/II varient selon les espèces et les souches de streptocoques au niveau desquelles ils sont exprimés. SspA et les niveaux d'expression SspB augmentent à une température élevée et un pH acide, tandis que l'expression SspB est réduite avec une diminution de la concentration de NaCl. En outre, les niveaux SspA sont généralement plus élevés que ceux des SspB, et le polypeptide SspA régule positivement SspB en liant sa région promotrice. (*El-Sabaeny et al, 2001*)

Un récepteur majeur de AgI/II est la glycoprotéine salivaire gp340, également trouvée dans la plupart, sinon toutes les sécrétions muqueuses. Lorsque gp340 est adsorbée sur une surface de la cavité orale, cela offre des sites de liaison pour les streptocoques. Les protéines AgI/II jouent un rôle essentiel dans l'association de *P. gingivalis* avec *S. gordonii*. (*Wright et al, 2012*)

Les protéines SspA et SspB jouent également un rôle dans les interactions entre *S. gordonii* et les filaments mycéliens de *C. albicans*, favorisant ainsi la colonisation par ces micro-organismes (Fig. 19). Le récepteur de *C. albicans* qui interagit avec SspB est une protéine exprimée à la surface de la cellule fongique, Als3. (*Silverman et al, 2010*)

- Interaction des SspA et SspB avec Mfa1

La liaison de *Porphyromonas gingivalis* à *S. gordonii* par l'intermédiaire des protéines SspA SspB est importante pour le développement de cette espèce au sein du biofilm car *P. gingivalis* n'interagit pas avec tous les membres de la famille AgI/II. (Wright et al, 2012)

La région précise de SspA/B impliquée dans cette liaison a été déterminée par l'examen de polypeptides et de protéines comprenant des portions de SspB et SspA. Cela a permis de caractériser une région soit un résidu d'acides aminés 1167 à 1250 dans SspB, nécessaire pour la liaison de *P. gingivalis*, désignée BAR (région d'adhérence SspB). Une zone critique de 26 résidus d'acides aminés, au sein de BAR, contient les motifs nécessaires reconnus par Mfa1 de *P. gingivalis*.

Il a également été montré que les peptides de BAR avec des mutations spécifiques, réalisée in vitro, confère des changements conformationnels et inhibent la liaison aux cellules de *P. gingivalis*. (Demuth et al, 2001)

Le motif NITVK au sein de BAR aide à définir la spécificité de liaison pour les membres des protéines AgI/II car NITVK se trouve uniquement dans les protéines des bactéries du groupe oralis des streptocoques, qui comprend *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. sanguinis*.

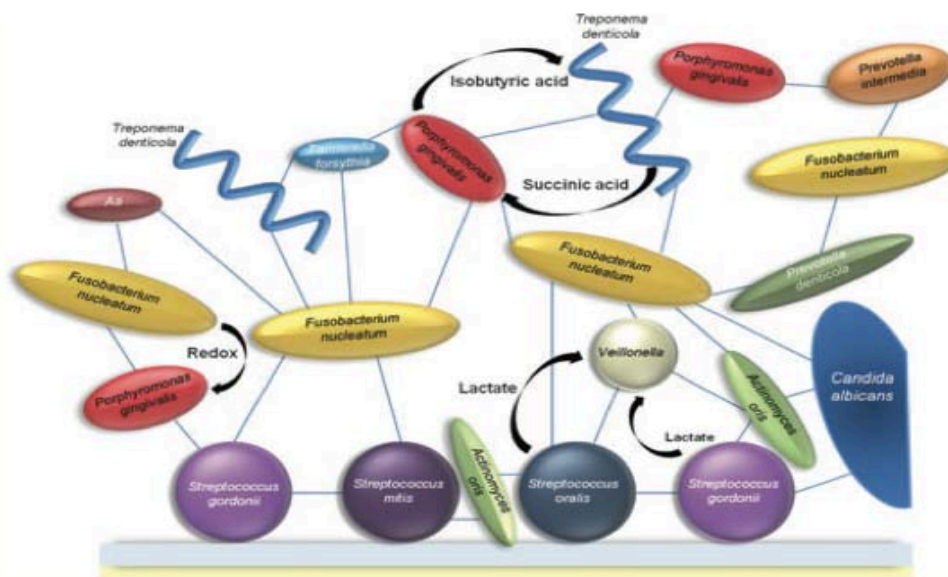


Figure 19: interactions entre les cellules bactériennes dans le biofilm de la plaque dentaire, avec des exemples de synergie et mutualisme. Les lignes reliant les micro-organismes représentent les interactions adhésives. (Wright et al, 2012)

## (2) Compétition

### - Compétition entre *P. gingivalis* et les *Streptococcus cristatus*

Il est connu que certaines bactéries peuvent inhiber la colonisation par des bactéries pathogènes du tractus gastro intestinal. Teughels et al en 2007 ont étudié la possibilité d'un tel phénomène pour la colonisation des cellules épithéliales pour *A. actinomycetemcomitans*. Sept bactéries, dites bénéfiques, car présentes en grande quantité au niveau d'un parodonte sain, ont été évaluées pour leur capacité potentielle à interférer, exclure ou remplacer *A.a* de leur site d'adhérence sur les cellules épithéliales, dans un modèle de biofilm in vitro. Ainsi, *S. sanguinis*, *S. mitis* et *S. salivarius* soit capables d'inhiber la colonisation de *A.a* alors que *Actinomyces naeslundii* la facilite. (Teughels et al, 2007)

Une étude similaire a été menée par Van Hoogmoed et al en 2008. Ces auteurs ont étudié la réduction de l'adhérence de pathogènes parodontaux tels que *P. gingivalis*, *P. intermedia*, et *A. actinomycetemcomitans* dans un modèle in vitro de chambre à flux continu. Tous les streptocoques testés (*S.sanguinis*, *S. mitis* et *S. salivarius*), sauf *S. cristatus* ainsi que *Actinomyces naeslundii* et *Haemophilus parainfluenza* sont capables de limiter l'adhésion de *P. gingivalis*. *P. intermedia* subit une diminution moins importante mais statistiquement significative de son adhérence, et plus particulièrement avec *S. mitis*. (Van Hoogmoed et al, 2008)

### **3. Interactions bactériennes influençant la localisation des résidents au sein de biofilms**

L'existence d'une multitude d'interactions différentes entre les résidents du biofilm influe sur la localisation ou colocalisation de certains organismes au sein de la structure du biofilm.

Par exemple, en utilisant des cellules par fluorescence, il a été observé que *P. gingivalis* colonise, in vitro, des biofilms de *S. gordonii* en particulier dans les régions où les derniers micro-organismes se sont accumulés (Kuboniwa et al, 2006). Cette

observation est cohérente avec les interactions connues entre ces deux organismes. (Palmer et al, 2006).

- Le regroupement des organismes au sein des biofilms peut plus facilement être rationalisé pour les organismes dont les interactions se font essentiellement par la coagrégation. Un certain nombre de bactéries orales sont spécifiquement agrégées avec d'autres. Par exemple, les souches de *P. gingivalis* s'agrègent avec plusieurs streptocoques oraux. *P. gingivalis* a la capacité de coloniser des biofilms composés de streptocoques oraux à la fois dans un modèle in vitro et in vivo. Cela suggère que cela pourrait être un mécanisme important par lequel *P. gingivalis* peut s'incorporer dans la plaque dentaire qui est principalement composée des colonisateurs streptococciques. (Kuboniwa et al, 2006)

- Plusieurs études récentes ont démontré que certains organismes qui ne font pas de biofilms par eux-mêmes, dans une culture in vitro, le font en présence d'autres partenaires potentiels. *T. denticola* ne semble pas former des biofilms sur la plupart des surfaces inertes (Vesey, et Kuramitsu. 2004), et se retrouve incorporé dans un biofilm qu'en présence de *P. gingivalis*. Ce modèle in vitro est cohérent avec la situation de *T. denticola* dans la plaque dentaire sous-gingivale, où il se trouve relativement plus externe de *P. gingivalis* (Ishihara et al, 2004).

De même, le parodontopathogène *T. forsythia* colonise peu les surfaces inertes, mais s'incorpore dans le biofilm en présence de *F. nucleatum*. Ces effets synergiques semblent être pertinents pour la formation de biofilm in vivo, puisque les deux paires d'organismes sont fréquemment associées dans les mêmes échantillons de plaque (Socransky et al, 1998).

#### **4. Maturation du biofilm et phénomènes de détachement**

##### **a) Le détachement**

- En raison de la fluctuation des forces de cisaillement agissant dans la cavité buccale, les micro-organismes adhèrent au cours de périodes de faible cisaillement,

alors qu'ils peuvent se détacher au cours de périodes de cisaillement élevées, probablement à la suite d'une rupture cohésive dans le biofilm. La formation de plaque sous-gingivale est beaucoup moins influencée par les énergies de surface que la plaque supra-gingivale, évidemment en raison de l'absence de forces de cisaillement dans l'environnement sous gingival.

Les forces de détachement par voie orale agissant sur les micro-organismes adhérents varient énormément au cours de la journée. Le détachement peut être pratiquement absent pendant le sommeil lorsque seules les forces de frottement visqueux résultant de la sécrétion salivaire sont opérationnelles. Sinon, lorsque l'on mange, parle ou boit, les forces de détachement dépassent souvent les forces d'adhérence.

Le détachement des micro-organismes qui adhèrent à la pellicule exogène acquise se fait par rupture cohésive dans la plaque dentaire (Figure 20). A noter que les biofilms adhérant sur des substrats hydrophobes peuvent avoir une force de cohésion inférieure que s'ils étaient liés à des substrats hydrophiles.

Ce mécanisme pourrait être une approche intéressante qui permettrait la réduction de la formation de plaque. Un tel mécanisme ne repose pas sur l'adhésion microbienne, mais plutôt sur le détachement stimulé par une rupture de cohésion dans la pellicule, on n'est pas à l'abri que d'autres souches, mutent et colonisent tout de même les surfaces buccales. (Busscher *et al*, 1997)

Pendant la phase de détachement, les forces de fort cisaillement, présentes au moment de l'élocution et de la mastication, peuvent provoquer un décollement de la masse de plaque entière en raison d'une rupture cohésive dans le film de liaison.

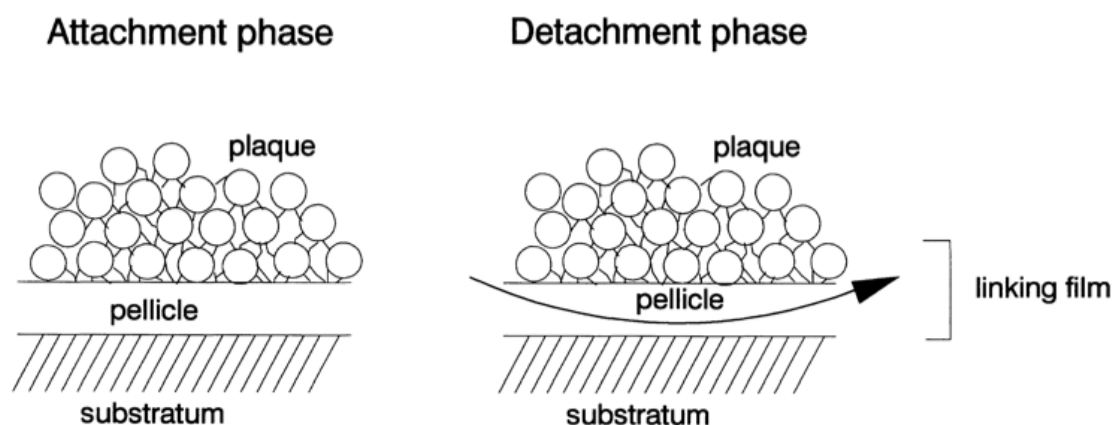


Figure 20: le détachement de la plaque dentaire. (Busscher *et al*, 1997)

Chaque micro-colonie peut alors se détacher lorsque sa résistance à la traction est dépassée et entraîner des infections chroniques bactériennes à distance, telles que l'endocardite de la valve native. De même, ce détachement de micro colonies préformées qui contiendrait des cellules résistantes aux antibiotiques pose un risque très sérieux d'embolie infectieuse. Sur les valvules cardiaques cela peut conduire à des accidents vasculaires cérébraux ou des séquelles pulmonaires graves. (*Rodney et Costerton 2002*)

- Si les conditions environnementales se détériorent, certaines espèces (par exemple, *Prevotella loescheii* et *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*) réagissent en produisant des enzymes qui clivent leurs adhésines, leur permettant alors de se détacher et de coloniser d'autres surfaces de biofilm. (*Kaplan et al, 2003*)

Une fois le biofilm formé, la composition bactérienne d'un site est caractérisée par un degré de stabilité ou d'équilibre entre les espèces qui le composent, en dépit des stress environnementaux réguliers, par exemple, des changements périodiques de l'environnement induits par l'hygiène orale, l'apport alimentaire, les variations de pH, ou les flux de salive diurne. Fait important, cette stabilité (appelée homéostasie microbienne) n'est pas due à l'indifférence biologique entre les organismes résidents, mais à un équilibre dynamique imposé par de nombreuses interactions microbiennes, comprenant des phénomènes de synergie et d'antagonisme. Tout changement environnemental et tout paramètre clé ( $\text{CO}_2$ , nutriments..) devenant incompatible avec la stabilité des communautés bactériennes, peuvent perturber l'homéostasie microbienne. Une conséquence de l'échec de l'homéostasie est la réorganisation de la structure et de la composition de la communauté microbienne, avec les espèces précédentes qui n'étaient que des composants mineurs de plus en plus concurrentiel dans les conditions nouvelles, et, par conséquent, plus dominant. Un tel changement dans la composition des communautés et de l'activité peut prédisposer, par exemple, à la maladie d'un site donné. (*Marsh, 2011*)

## **b) La maturation du biofilm**

### **(1) La matrice extracellulaire**

La sécrétion de molécules de grande taille par les bactéries adhérentes, se réalisant soit par des mécanismes de sécrétion active soit par lyse cellulaire, conduit à

l'élaboration d'un échafaudage macromoléculaire entourant les cellules. Cette matrice permet au biofilm de lier les cellules à la surface et agit en tant que résine échangeuse d'ions qui restreint le flux de molécules chargées ou réactives par l'intermédiaire du film biologique. (*Jakubovics, Kolenbrander, 2010*)

Les streptocoques oraux produisent les polymères glucidiques insolubles car ceux-ci semblent jouer un rôle majeur dans la progression de la carie dentaire. (*Banas et al, 2003*)

La multiplication des cellules fixées entraîne une augmentation de la biomasse bactérienne et de la synthèse d'exopolymères nécessaires pour former la matrice du biofilm.

La matrice présente dans tous les biofilms, n'a pas qu'un rôle d'échafaudage maintenant la forme du biofilm. Elle apporte une contribution significative à l'intégrité structurelle et à la tolérance générale des biofilms aux facteurs environnementaux et aux antimicrobiens. La matrice peut être biologiquement active et conserver l'eau, les nutriments et les enzymes dans le biofilm. Les caractéristiques chimiques de la matrice peuvent induire l'exclusion ou limiter la pénétration d'autres molécules, y compris certains agents antimicrobiens chargés. (*Marsh, 2011*)

La proximité des cellules dans un biofilm permet de nombreuses interactions synergiques et antagonistes entre espèces voisines, et le développement de chaînes alimentaires et de réseaux alimentaires. (*Kuramitsu et al, 2007*)

## **(2) La sélection bactérienne**

Le métabolisme des micro-organismes produit des gradients, au sein du biofilm, de nutriments et de produits de fermentation, de pH et de potentiel redox (Eh). Les bactéries répondent à ces changements fluctuants de l'environnement en modifiant leurs modes d'expression génétique. Les gradients de la plaque ne sont pas nécessairement linéaires, et les aspects hétérogènes environnementaux se traduisent par une mosaïque de micro-environnements.

Cette hétérogénéité environnementale sur des distances relativement courtes permet de comprendre comment les micro-organismes, avec les exigences de croissance apparemment contradictoires, peuvent coexister dans les biofilms comme la plaque



dentaire. Ces procédés conduisent à la mise en place d'un biofilm mature avec une composition relativement stable. (Marsh, 2011)

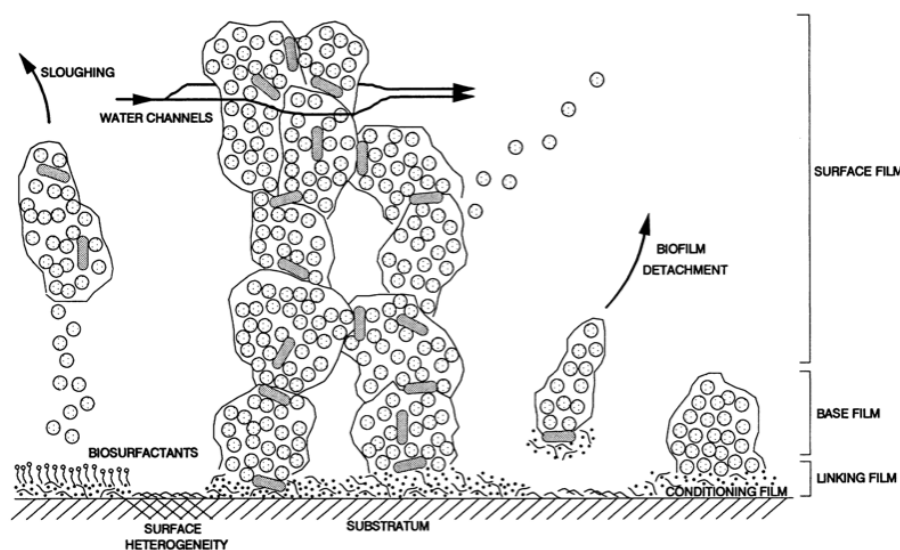


Figure 21: représentation hypothétique de l'impact des liaisons initiales sur la composition finale d'un biofilm. (Busscher et al, 1997)

Les premières bactéries colonisatrices ont une forte résistance à l'oxygène et aux mécanismes d'élimination de par leur adhérence à la pellicule exogène acquise. Petit à petit, l'aggrégation d'autres espèces va former des couches et induire une modification des conditions environnementales. Le taux d'oxygène diminue et ce sont les bactéries anaérobies qui se développent préférentiellement.

Ainsi, la proportion de *Streptocoques* augmente pendant les 12 premières heures, alors que celle des *Actinomyces* diminue entre 4 et 12 heures puis augmente jusqu'à 24 heures.

Après plusieurs heures, de nouvelles espèces adhèrent aux bactéries pionnières et vont ensuite attirer d'autres espèces et ainsi augmenter la diversité du biofilm. Ce seront alors essentiellement des bactéries à Gram négatif telles que *Fusobactérium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*...

Le biofilm prend alors de l'épaisseur et lorsqu'il n'est pas éliminé, la communauté est de plus en plus complexe. Un équilibre s'installe avec l'élimination de certaines bactéries, multiplications d'autres et fixation de nouvelles. En 2 à 3 semaines l'équilibre est atteint et le biofilm peut alors contenir jusqu'à  $10^9$  bactéries par milligramme de matière.

Cet accroissement du biofilm constitue l'étape de maturation. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

En temps normal, il existe une homéostasie microbienne, ainsi les bactéries et l'hôte vivent en harmonie. La flore buccale est dite « commensale » et constitue une flore barrière qui s'oppose à la colonisation par des pathogènes exogènes et au développement de micro-organismes endogènes pathogènes opportunistes.

L'apparition de maladies telles que la carie dentaire et la parodontite sont dues à la rupture de cet équilibre. (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

### **(3) L'évolution du biofilm vers le tartre**

Le biofilm produit des cristaux de différents phosphates de calcium qui permettent alors sa minéralisation et donc la formation de tartre.

Il se compose de minéral, de composants organiques qui sont des protéines salivaires, des cellules épithéliales desquamées, des leucocytes et des hydrates de carbone, et de composants inorganiques qui sont des phosphates de calcium, des carbonates de calcium et des phosphates de magnésium dont la structure est cristalline.

Les phospholipides représentent 10% des lipides totaux et jouent un rôle important dans la minéralisation de la plaque. Ils viennent de la salive et des composants membranaires des bactéries.

Au départ, le calcium et le phosphate sont disponibles à l'état libre. Les acides phospholipidiques des membranes bactériennes sont nécessaires à la calcification. A pH physiologique, ils ont une charge négative laquelle se lie au calcium. Il se forme alors un complexe calcium-phospholipide-phosphate (CPLX). L'apatite se dépose ensuite sur les ions calcium et phosphate et la formation du tartre débute par le dépôt d'OCP et DCPD qui seront hydrolysés et transformés en HAP et WHT moins solubles (voir tableau 6). (*Bonnaure Mallet et al, 2006*)

Tableau 6 : composition minérale du tartre. (Bonnaure Mallet et al, 2006)

Phosphate octo calcique : $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)_2\text{5HO}$	OCP
Hydroxyapatite : $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HAP
Phosphate tricalcique beta ou witlockite : $\text{Ca}_{10}(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_6$	WHT
Brushite ou « DiCalcique Phosphate Dihydrate » : $\text{Ca HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD

Certaines souches retrouvées dans le tartre ont une minéralisation intracellulaire comme *Streptocoque salivarius*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii* et *Corynebacterium matruchotii*. La formation d'hydroxyapatite dans le filament de *C. matruchotii* a été reproduite in vitro et confirmée en microscopie électronique chez *Escherichia coli*, *Candida albicans* et certains streptocoques.

La minéralisation intracellulaire et la croissance des cristaux dépendent des activités enzymatiques. A pH alcalin, l'urée produite dans la salive va être hydrolysée et va donc faire augmenter le pH, ce qui est nécessaire à la formation de tartre. *S. salivarius*, *Haemophilus* et *Actinomyces* ont une activité uréolytique et même si elles sont peu nombreuses, cela est suffisant pour permettre une uréolyse de la plaque et une précipitation des ions calcium. (Bonnaure Mallet et al, 2006)

### III. Les propriétés du biofilm

De récentes études de biologie moléculaire ont révélé que presque toutes les maladies dentaires sont causées par des biofilms buccaux composés d'une communauté bactérienne multi-espèce (*Becker et al, 2002*). Ces communautés sont des structures complexes et dynamiques qui croissent par la colonisation séquentielle et ordonnée de multiples bactéries buccales. (*Kolenbrander et al, 2002*) L'une des caractéristiques les plus remarquables des biofilms dentaires est la différence de fonctionnement entre les bactéries prises au sein d'un biofilm et à l'état planctonique. Par exemple, de nombreuses espèces bactériennes dans les biofilms présentent une plus grande tolérance aux antibiotiques et à d'autres facteurs environnementaux, tels que le pH et l'oxygène. (*Bradshaw et al, 1998*)

Les biofilms dentaires sont caractérisés par leur attachement à la surface, leur hétérogénéité de structure, leurs interactions complexes, et une matrice extracellulaire de substances polymères. Ils présentent une forte densité de micro-niches qui diffèrent considérablement en fonction des conditions environnementales. Les communautés d'espèces bactériennes présentes dans le biofilm dentaire interagissent en coopération ou en concurrence les unes avec les autres. Il a été démontré que les interactions bactériennes influencent la formation de biofilm par différents mécanismes.

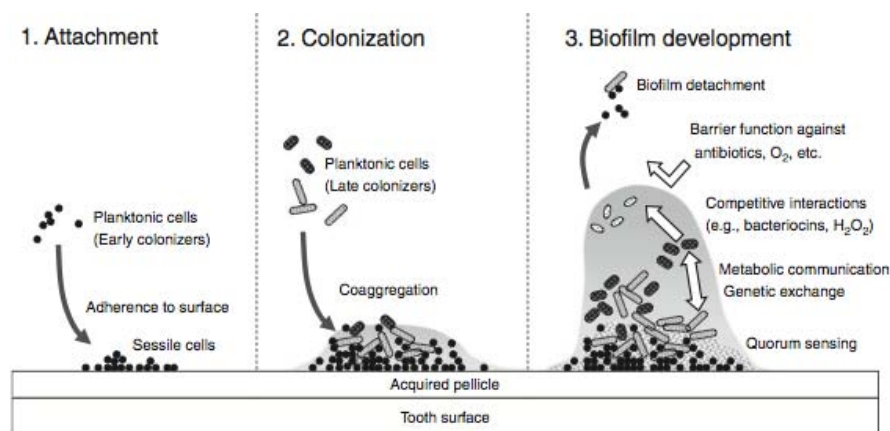


Figure 22: formation d'un biofilm sur une surface dentaire et rôles des interactions bactériennes. (Hojo et al, 2009)

Les interactions bactériennes au sein du biofilm sont multiples et seront développées ci après.

## **A. La gestion des nutriments et des métabolites**

### **1. Nutriments comme base pour les interactions interspécifiques bactériennes au sein des biofilms**

- Un facteur important dans la détermination de la composition d'un biofilm est clairement la disponibilité des nutriments. Les organismes qui se sont adaptés à des environnements particuliers tels que la cavité buccale ont évolué pour utiliser efficacement les éléments nutritifs disponibles. (Howard et al, 2007)

Pour les résidents au sein de biofilms buccaux, les nutriments disponibles proviennent de l'apport périodique de l'alimentation, de la salive, des aliments contenant des sucres, des débris alimentaires et métaboliques produits d'autres bactéries comme des polysaccharides.

Ainsi, *Streptococcus mutans* est capable de métaboliser le saccharose plus efficacement que d'autres bactéries communes orales, et est donc impliqué dans la pathogénèse de la carie dentaire. Dans les pays développés, les régimes alimentaires de l'homme sont nombreux et se composent d'une proportion importante de saccharose ce qui favorise la croissance de *S. mutans*. En outre, la conversion rapide par *S. mutans* de sucrose en acide lactique fournit également à *S. mutans* un mécanisme supplémentaire pour rivaliser avec de nombreux organismes en raison de ses propriétés acidifiantes importantes. (Bowen, 1997)

- Les protéines buccales présentes dans la salive humaine et le fluide gingival sont une autre source importante de nutriments nécessaires au développement de certaines bactéries buccales. Celles-ci peuvent provenir tant des tissus oraux de l'hôte (cellules épithéliales desquamées, anticorps, cystatines), que des bactéries. Ces bactéries protéolytiques auront ainsi leur croissance favorisée. C'est le cas de *P. gingivalis*, bactérie à Gram négatif anaérobie, hautement protéolytique, qui pourra se développer et coloniser la plaque dentaire sous gingivale. (Potempa et al, 1995)

D'autres micro-organismes, peu protéolytiques peuvent coexister avec *P. gingivalis* dans les biofilms, et sont susceptibles de bénéficier des produits de dégradation de l'activité protéolytique de ces organismes. Les micro-organismes qui partagent ces relations symbiotiques se trouvent donc à proximité de *P. gingivalis*.

Les communications métaboliques entre les bactéries orales peuvent se produire à travers l'excrétion d'un métabolite par un organisme qui peut être utilisé comme nutriment par un organisme différent, ou par le découpage d'un substrat par l'activité enzymatique extracellulaire d'un organisme, qui créer des substrat biologiquement disponibles pour d'autres organismes. (Kolenbrander et al, 2002)

Howard et al en 2007 ont démontré l'existence d'interactions synergiques ou mutualistes entre *Actinomyces naeslundii* et les *Streptocoques oralis*, dans les biofilms qui semblent dépendre de la salive. Les organismes seuls sont de mauvais colonisateurs des surfaces baignées par la salive, mais ensemble, ils forment de vastes biofilms sur ces mêmes surfaces. Cette observation semble résulter de la combinaison des activités métaboliques des deux organismes dans la dégradation des composants salivaires. (Howard et al, 2007)

Par ailleurs, *P. gingivalis*, peuvent survivre dans des environnements aérobies s'ils sont en partenaires et en co-agrégat avec des espèces consommant de l'oxygène tels que *Neisseria* (Bradshaw et al, 1998).

## **2. Echanges métabolique de nutriments chez les bactéries buccales**

Une des sources de nutriments est la salive et le fluide gingival mais c'est grâce aux interactions métaboliques inter-bactériennes que des espèces bactériennes très variées peuvent se développer au sein du biofilm. La viabilité des biofilms est dépendante non seulement des interactions entre les organismes résidents mais aussi des interactions entre ces constituants avec l'environnement non microbien. L'impact majeur sur les biofilms humains est l'apport de nutriments potentiels par l'hôte.

Dans la cavité buccale, la production en continu de salive par les glandes salivaires est une source potentielle de nutriments pour les bactéries des biofilms buccaux.

Ces liquides présents dans la cavité orale contiennent des protéines, des glycoprotéines, des peptides et des minéraux (calcium et fer) qui peuvent stimuler la croissance des résidents du biofilm oral (*Bowden, 1997*).

Le fluide gingival est une autre source endogène de nutriments. Il contient des protéines de l'hôte, comme l'albumine, des glycoprotéines et des molécules contenant l'hème. Cette source de nutriments influence grandement les microbes qui se trouvent dans le sillon gingival. En outre, certaines de ces glycoprotéines peuvent être incorporées dans la pellicule exogène acquise formée sur les dents et peuvent servir de récepteurs pour les adhésines des pionniers de la formation de plaques bactériennes. Ainsi, ces molécules peuvent jouer un rôle important dans la détermination des organismes capables de coloniser des sites spécifiques de la cavité buccale. (*Howard et al, 2007*)

Les échanges métaboliques entre les bactéries prises au sein du biofilm peuvent être de deux types. Les échanges métaboliques permettent ou inhibent la croissance d'une ou plusieurs espèces bactériennes.

#### **a) Echanges métaboliques favorables et mutualisme**

- **Rôle de la vitamine K**

La vitamine K est nécessaire pour la croissance de la plupart des souches de *Prevotella* et *Porphyromonas*. La vitamine K n'étant pas synthétisée dans l'organisme humain les micro-organismes auxotrophes (ayant besoin de vitamine K) en acquièrent par le biais des bactéries présentes dans le biofilm dentaire. *Veillonella*, une composante omniprésente des biofilms dentaires, est connue pour produire des ménaquinones (vitamine K<sub>2</sub>), qui sont ensuite utilisées par *Prevotella* et *Porphyromonas*. (*Marcotte et Lavoie, 1998*)

La ménaquinone est un composant de la membrane bactérienne, par conséquent, les micro-organismes auxotrophes ne peuvent pas utiliser ce facteur de croissance à moins que les bactéries productrices de ménaquinone meurent et le libèrent de leurs membranes cellulaires. En conséquence, il a été proposé que les facteurs de

croissance extracellulaires produits par *Propionibacterium* et *Veillonella* influencent directement la croissance des bactéries vitamine K auxotrophes. (Hojo, 2009)

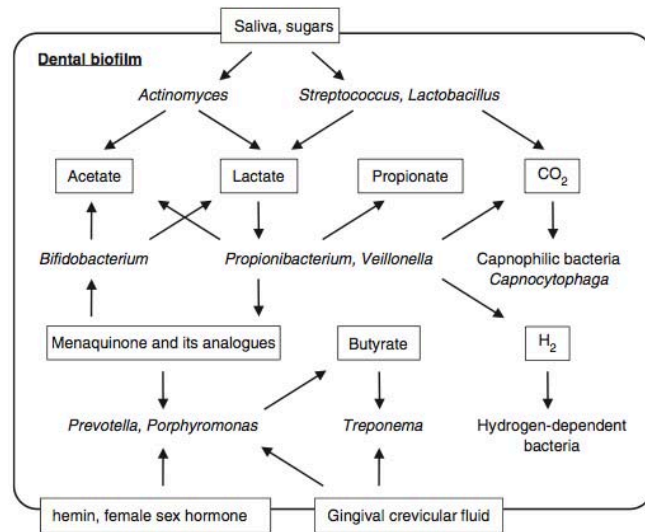


Figure 23: représentation des relations métabolique entre les bactéries orales. (Hojo, 2009)

- **Echanges entre les streptocoques et *Veillonellae***

Les acides gras à chaîne courte, produits par certaines bactéries buccales, sont considérés comme une source de carbone essentielle pour d'autres bactéries buccales.

Plusieurs études ont suggéré une association symbiotique entre *Streptococcus* et *Veillonella* via l'acide lactique produit. (Chalmers et al, 2008) Dans des études in vivo, les streptocoques et *Veillonella* sont produits souvent dans le même site de la cavité buccale. De plus, fait intéressant, ces études in vivo ont suggéré que ces genres sont associés à la santé parodontale. La relation parallèle n'est pas surprenante compte tenu du fait que le *Veillonella* utilise des acides gras à chaîne courte, tels que les lactates qui sont sécrétées par des bactéries à Gram positif telles que les streptocoques. À la fois in vitro et in vivo, il est probable que la croissance de *Veillonellae* dans la cavité buccale dépende du lactate produit par d'autres bactéries orales. (Kumar et al, 2005)

Egland et al en 2004, ont étudié l'arrangement spatial des bactéries dans un biofilm, qui est dirigé par des interactions métaboliques des bactéries entre elles. *S. gordonii* et *Veillonella atypica* sont deux colonisateurs précoces de la plaque dentaire et semblent effectivement participer à la communication métabolique. *S. gordonii*



fermente les carbohydrates pour former de l'acide lactique qui est le substrat de fermentation préféré de *V. atypica*. Les auteurs observent, lors d'une co-culture sur milieu agar, l'apparition de l'expression de l'alpha amylase de *S. gordonii*. Ainsi, *V. atypica* pourra ensuite stimuler la glycolyse par *S. gordonii* afin d'obtenir de plus en plus de lactate. (Egland et al, 2004)

Ces données indiquent que la consommation de lactate est susceptible d'être une force motrice importante pour les associations mutualistes entre bactéries du biofilm oral.

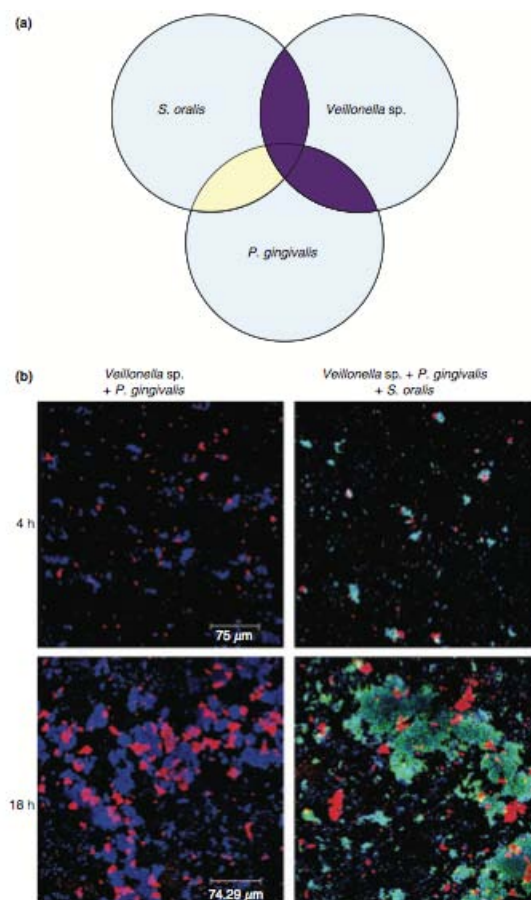


Figure 24: interactions mutualistes entre trois espèces au sein d'un biofilm baigné par la salive. (Periasamy et al, 2010)

### Figure 24 :

Periasamy et al en 2010 ont étudié le mutualisme entre 3 espèces dans un biofilm produit à partir de salive.

(a) Les monocultures de *S. oralis*, *Veillonella sp.* ou *P. gingivalis* ont une croissance médiocre.

Si on cultive ensemble *S. oralis* et *Veillonella sp.* ou *P. gingivalis* et *Veillonella sp.*, dans les 18 heures, la biomasse de chaque espèce a considérablement augmentée. Cela n'a pas été observé dans l'association des deux espèces *S. oralis* et *P. gingivalis* (représenté en jaune). Toutefois, si on y inclut *Veillonella sp.* cela entraîne une croissance mutualiste de ces trois espèces.

(b) Les interactions mutualistes dans les biofilms sont ensuite observées par microscopie confocale. Dans les panneaux de gauche, *Veillonella sp.* apparaît en bleu et *P. gingivalis* en rouge. Dans les panneaux de droite, *S. oralis* apparaît en bleu, *Veillonella sp.* en vert et *P. gingivalis* en rouge. Une forte croissance de chaque organisme est observée entre 4 h et 18 h.

- **Exemple de *P. gingivalis***

- Un exemple de communication métabolique entre *P. gingivalis* et *T. denticola* a été étudié. Ces échanges métaboliques impliquent l'utilisation par *P. gingivalis* du succinate produit par *T. denticola*, et, à son tour, la croissance de *T. denticola* est stimulée par l'acide isobutyrique généré en tant que produit final métabolique de *P. gingivalis*. (Grenier, 1992) La croissance de *T. denticola* peut également être améliorée par des substrats protéiques produits par *P. gingivalis*.

- L'apport de métabolites de *P. gingivalis* provient également de par *F. nucleatum*, un micro-organisme qui peut tolérer des niveaux plus élevés d'oxygène que *P. gingivalis*. Lorsqu'elles sont cultivées ensemble dans les mêmes conditions gazeuses, *F. nucleatum* peut créer un micro-environnement confiné qui est optimal pour la croissance de *P. gingivalis*. (Bradshaw, 1998, Diaz, 2002)

*F. nucleatum* peut également générer de l'ammoniac à partir des acides glutamique et aspartique - acides aminés présents dans le fluide gingival – et ainsi élever le pH à des niveaux mieux tolérés par *P. gingivalis*. (Kobuniwa, Lamont, 2010)

- L'accumulation de bactéries au niveau gingival à la suite d'une mauvaise hygiène buccale peut aussi conduire à l'inflammation dans les tissus environnants. Les globules rouges contenant de l'hémoglobine peuvent être une source importante d'hémine pour certaines bactéries buccales, telles que *P. gingivalis*. Une telle fuite peut être un facteur important dans la conversion de la plaque dentaire, dominée par

les organismes à Gram positif, en biofilm formé de fortes proportions de bactéries anaérobies à Gram négatif telles que *P. gingivalis*, qui sont associées à la parodontite. (Bramanti, et Holt. 1991)

- **Rôle du pH**

- Certaines interactions métaboliques peuvent modifier le microenvironnement local, le rendant plus adapté à la croissance d'autres espèces. Par exemple, il a été observé que *F. nucleatum* et *P. intermedia* peuvent croître dans une large gamme de pH de 5,0 à 7,0, tandis que *P. gingivalis* est sensible à des niveaux de pH inférieurs à 6,5. Une étude récente a montré que *F. nucleatum* et *P. intermedia* fermentent l'acide glutamique et aspartique, deux principaux acides aminés produits à partir de molécules issues du fluide gingival et de la salive, et génèrent de l'ammoniac et des acides organiques. Cela contribue à obtenir un pH plus neutre dans la plaque dentaire et empêche l'acidification du pH même en présence de bactéries produisant de l'acide lactique et des glucides fermentescibles. Ainsi, les espèces se développant à pH neutre, telles que *P. gingivalis*, sont protégées contre l'attaque acide. (Takahashi, 2003)

- **Autres exemples**

- L'hydrolyse des glycoprotéines de la PEA par *S. oralis* et l'utilisation ultérieure des monosaccharides libérés sont importants pour la survie et la subsistance de cette espèce et d'autres bactéries orales. (Byers et al. 1999)

De même, la désialylation de l'immunoglobuline A1, isotype dominant d'anticorps dans la cavité buccale, par les bâtonnets à Gram positif oraux, peut faciliter les activités protéolytiques d'autres bactéries de la bouche et peut influencer positivement la survie de bactéries dans la communauté. (Hojo et al, 2009)

- Les auteurs Periasamy et al en 2009 observent la croissance de *Fusobactérium nucléatum* dans un modèle de biofilm in vitro, multi espèce, avec pour seul nutriment la salive. Dans ce biofilm à flux cellulaire, la quantification du nombre de cellules est évaluée par la fluorescence des anticorps dirigés spécifiquement contre chaque espèce bactérienne. *F. nucleatum* est incapable de se multiplier dans un biofilm

mono espèce. Mais, en présence de *A. naeslundii*, et non en présence de *S. oralis*, *F. nucleatum* prolifère. Néanmoins, l'augmentation de la croissance de *F. nucleatum* est observée dans un biofilm tri espèce, indiquant la présence de coopération multi espèce. Ainsi, la biomasse de *F. nucleatum* est multipliée par 18 dans un biofilm tri espèce.

Les auteurs concluent que l'intégration de *F. nucleatum* dans des communautés commensales multi espèce étaient une preuve de l'interaction de *F. nucleatum* avec les bactéries co agrégées *A. naeslundii* et *S. oralis*, et du développement majoré de *F. nucleatum* (et ceci en présence de *A. naeslundii*). (Periasamy et al, 2009)

Ces études ont montré qu'il existe de nombreuses interactions positives qui se développent entre les bactéries buccales, mais à l'heure actuelle, il est difficile de prédire quels sont les micro-organismes capables de former des partenariats mutuellement bénéfiques.

### b) Echanges métaboliques néfastes et compétition

On observe que des produits métaboliques secondaires (métabolites) d'un organisme peuvent avoir des effets sur d'autres organismes dans le même biofilm.

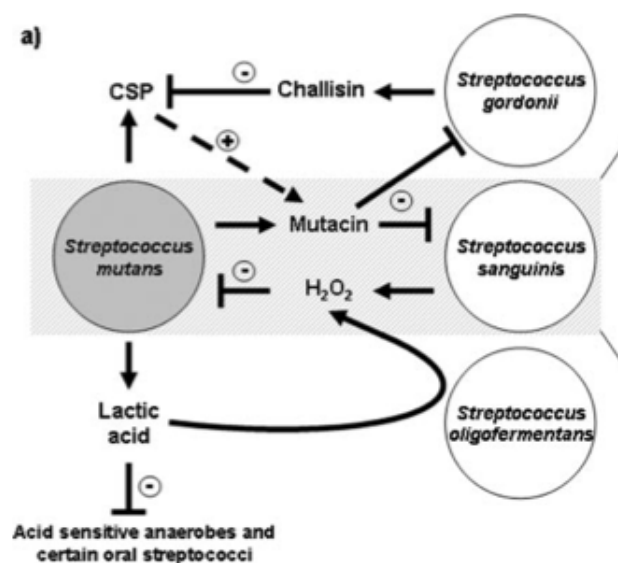


Figure 25: interactions de *Streptocoque mutans* avec d'autres bactéries. (Kuramitsu et al, 2007)

- **Rôle du peroxyde d'hydrogène**

Plusieurs bactéries anaérobies, y compris celles qui sont associées à la parodontite humaine, sont également sensibles aux phénomènes oxydatifs provoqués par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Par conséquent, une proportion élevée de *S. sanguinis*, producteur d' $H_2O_2$ , se trouve généralement dans la plaque dentaire avec des niveaux inférieurs de *S. mutans* ou d'organismes parodontopathogènes tels que *P. gingivalis*, qui sont sensibles à l'action de ce  $H_2O_2$ . En outre, la présence de membres du groupe de *S. sanguinis* dans la plaque dentaire est généralement corrélée à de faibles niveaux d'organismes parodontopathogènes et est donc le reflet d'une bonne santé buccodentaire. (Hillman et al, 1985)

- **Les streptocoques**

- La plaque dentaire qui contient des proportions relativement élevées de *S. mutans* favorise généralement peu la croissance des souches de *S. sanguinis*. *S. mutans* métabolise les sucres en acide lactique, l'acide le plus important produit par la plupart des bactéries, et provoque une acidification de l'environnement. *S. mutans* sont généralement plus aciduriques que les membres de la famille des *S. sanguinis*. Cette production d'acide lactique favorise alors la croissance de *S. mutans* par rapport à celle des autres streptocoques oraux (Figure 25). (Kuramitsu et al, 2007)

- D'autre part, les membres du groupe de *S. sanguinis* sont des producteurs de peroxyde d'hydrogène, un agent antimicrobien non spécifique qui a un effet antagoniste sur d'autres corésidents, tels que *S. mutans*, qui n'exprime pas de système efficace pour métaboliser ce produit toxique. En réponse à cette agression, *S. mutans* produit la mutacine qui inhibe *S. sanguinis* et *S. gordonii*. Ce dernier sécrète la challusine qui via une interaction avec la CSP (Competence Stimulating Peptide) inhibe le *S. mutans* (Kreth et al, 2005).

- Il a été observé récemment que *S. oligofermentans* peut également métaboliser l'acide lactique produit par *S. mutans* (Figure 25). *S. oligofermentans* a d'abord été isolé de la plaque dentaire de sujets humains sans caries, et son abondance dans la

plaque dentaire a été jugée négativement corrélée avec celle de *S. mutans*. Ce streptocoque oral non cariogène semble capable d'inhiber la croissance de *S. mutans*. Le mécanisme de cet effet inhibiteur est tout à fait unique. *S. oligofermentans*, en utilisant l'activité enzymatique de la lactate oxydase, convertit l'acide lactique, un inhibiteur de croissance normalement sécrété par *S. mutans*, en peroxyde d'hydrogène, une substance qui est très toxique pour ce dernier. (Tong et al, 2007)

- Les organismes du biofilm capables de réduire les concentrations relatives des molécules régulatrices pourraient aussi avoir des effets importants sur la pathogénicité des biofilms. Par exemple, la production de bactériocines par *S. mutans* dépend des niveaux relatifs de son CSP. Les bactériocines peuvent être considérées comme des facteurs de virulence, car elles peuvent moduler la croissance des streptocoques non cariogènes. Par conséquent, la réduction de la concentration du CSP de *S. mutans* dans les biofilms pourraient conduire à un biofilm moins cariogène. Les souches non cariogènes de *S. gordonii* peuvent inactiver la CSP de *S. mutans*, ce qui pourrait moduler la virulence du biofilm. (Kuramitsu et al, 2007)

- Dans le cas de caries dentaires, la modification de la population entraîne une diminution de la diversité des micro-organismes sur les sites de caries actives (Aas et al, 2008), en raison de la production d'ions d'hydrogène par des bactéries acidogènes. La chute du pH est un facteur essentiel qui favorise la survie et la croissance des organismes acidogènes tels que les *Streptocoques mutans*, les *Lactobacilles* et les *Bifidobactéries*. Bien que la concurrence due au changement de pH est plus facile à constater dans la plaque dentaire mature associée à des lésions carieuses actives, l'apparition de la concurrence se pose probablement beaucoup plus tôt. Le début de la colonisation par les streptocoques tels que *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. mitis* et *S. oralis* produisent de l'acide à partir de sucres, mais généralement dans une moindre mesure par rapport à *S. mutans* ou *S. sobrinus*. Il a été spéculé que de faibles niveaux de production d'acide par les *Streptocoques* n'appartenant pas à l'espèce *mutans* préparent le terrain pour l'intégration des organismes plus acidogènes dans le biofilm.

- ***A. actinomycetemcomitans***

*A. actinomycetemcomitans*, bactérie à Gram négatif associée à la parodontite agressive, possède un système quorum sensing dépendant d'AI-2 qui régule l'expression de facteurs de virulence, la formation du biofilm et l'acquisition du fer. Dans un modèle animal de parodontite par inoculation d'*A. actinomycetemcomitans*, Novak et al en 2010 ont montré que les souris, présentant entre autre des *A. a* déficients en récepteur de l'AI-2, avaient des pertes osseuses moins importantes. Kuramitsu et al en 2007 proposent une hypothèse de modulation des facteurs de virulence par de interactions inter-espèces dans le biofilm. Ainsi, ces auteurs expliquent que la pathogénicité d'*A.a* pourrait être réduite du fait de l'inactivation de son AI-2 par certaines bactéries co-résidentes. (Kuramitsu et al, 2007)

Récemment, Karim et al en 2013 ont identifié des enzymes, produites par *E. corrodens*, capables de dégrader ou de modifier l'AI-2. Cette bactérie pourrait donc moduler la pathogénicité AI-2 dépendante de certaines espèces.

- **Exemple de l'arginine déiminase**

Contrairement à d'autres streptocoques oraux, des cellules de *S. cristatus* ont tendance à être des colonisateurs plus tardifs de la plaque et sont retrouvés plus fréquemment au niveau des poches parodontales, où ils se lient à *F. nucleatum*. Le contact entre *S. cristatus* et *P. gingivalis*, cependant, déclenche une cascade de signaux de transduction dans *P. gingivalis* qui entraîne une régulation négative de l'expression *fimA* et par conséquent moins de longues fimbriae sont présents à la surface cellulaire (Xie, 2000). Avec la réduction des adhésines fimbriae, *P. gingivalis* est incapable d'adhérer et de rester dans le biofilm.

La signalisation est médiée par l'arginine déiminase (ArcA), une protéine de surface de *S. cristatus*. ArcA est une enzyme impliquée dans la voie métabolique qui convertit l'arginine en ornithine, l'ammoniaque et le CO<sub>2</sub>. (Xie et al, 2007)

Bien que *S. gordonii* exprime également ArcA, la capacité de *S. cristatus* à réprimer la production de FimA est liée à l'expression élevée de ArcA. Les régions du biofilm sous-gingival qui sont riches en *S.cristatus* peuvent empêcher la colonisation par *P. gingivalis*. (Lin, 2008)

### 3. Bactériocines et d'autres métabolites inhibiteurs

Dans le biofilm dentaire, une concurrence serrée avec les antagonistes existe. Les bactéries orales sont en compétition pour l'utilisation d'éléments nutritifs restreints avec d'autres bactéries au sein du biofilm. Les bactériocines, substances bactéricides protéiniques produites par les bactéries pour inhiber la croissance d'espèces étroitement apparentées, sont susceptibles de constituer une arme formidable dans l'arsenal d'une bactérie orale (Hojo, 2009). Contrairement aux antibiotiques traditionnels, ils ont souvent une faible capacité de destruction et inhibent plutôt la croissance de micro-organismes apparentés. (Howard et al, 2007)

- **Exemple de *S. mutans***

Par exemple, *S. mutans* est capable de produire plusieurs types de bactériocines appelées mutacines, appartenant ou non à la famille des lantibiotiques. Les mutacines appartenant aux lantibiotiques comme les mutacines I, II, et III ont un spectre relativement large contre les bactéries streptocoques et autres bactéries à Gram positif. (Qi et al, 1999)

En revanche, les mutacines IV et V sont des molécules non lantibiotiques, et la mutacine IV est spécifiquement active contre les membres du groupe mitis des streptocoques oraux. (Qi et al, 2001)

La production de mutacine est contrôlée par de nombreux facteurs génétiques, ainsi que environnementaux. La mutacine IV est contrôlée par le quorum-sensing via le système comCDE (Kreth et al, 2005), tandis que la réglementation de mutacine I est beaucoup plus complexe et moins bien compris. Nguyen et al. (2009) a suggéré que la production de mutacine est liée à au moins 17 gènes qui sont impliqués dans une variété de fonctions cellulaires, telles que le transport des sucres, la synthèse des nucléotides et d'acides aminés, et l'hydrolyse de protéines et de peptides.



- **Exemple du *Lactobacille***

Les bactériocines sont généralement considérées comme ayant un spectre étroit, mais certaines d'entre elles, produites apparemment par les bactéries buccales, ont un spectre relativement large, comme les lantibiotiques mentionnées ci-dessus. Ainsi, il a été rapporté qu'une bactériocine de 56 kDa produit par *Lactobacillus paracasei* HL32 inhibe la croissance de *P. gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *S. salivarius* et *S. sanguinis*. La bactériocine est stable à la chaleur, survit à 110 ° C sous pression, et possède une activité sur une gamme de pH de 6.8 à 8.5. (Hojo, 2009)

Koll-Klais et al. (2005) ont étudié la distribution du *Lactobacille* dans la cavité buccale chez les personnes souffrant de parodontite chronique et les personnes présentant une bonne santé parodontale. Ils ont rapporté que les *Lactobacilles*, en particulier *L. gasseri*, étaient significativement plus fréquents chez les personnes en bonne santé par rapport à celles atteintes de parodontite. Une forte activité antimicrobienne contre *S. mutans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* a été détectée en présence de *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* et *L. salivarius*, par des mécanismes biochimiques non caractérisés à ce jour. (Koll-Klais et al, 2005)

- **Régulation de la production des bactériocines**

Plusieurs études moléculaires et génétiques récentes ont révélé que la production de bactériocines, notamment la production de mutacine, est régulée par des facteurs génétiques et des conditions environnementales telles que la densité cellulaire et le pH (Kreth et al, 2005).

Les systèmes de réglementation de la production des bactériocines permettent qu'elles soient produites au bon moment et au bon endroit afin qu'elles puissent être utilisées efficacement au sein d'une communauté microbienne buccale. Les différentes sensibilités aux bactériocines ou bactériocines-like des différentes bactéries buccales pourraient permettre aux micro-organismes producteurs de choisir ses voisins et de promouvoir la création d'une communauté d'espèces bactériennes spécifiques. Ce système de régulation pourrait jouer un rôle important dans l'équilibre écologique de l'écosystème buccal. (Kuramitsu et al, 2007)

## **B. Le mécanisme du Quorum sensing**

### **1. Définition**

Le quorum-sensing est un processus de communication chimique chez les bactéries, qui est défini comme la régulation des gènes en réponse à la densité cellulaire, ce qui influe sur les différentes fonctions, à savoir, la virulence, la tolérance et la formation de biofilms. (Hojo, 2009)

Le premier indice évoquant une communication pour des signaux chimiques entre les bactéries provient d'études de l'organisme marin *Vibrio fischeri*. *V. fischeri* est une bactérie bioluminescente, mais cette lumière est produite principalement quand il existe une haute densité cellulaire bactérienne. Nealson et al. ont d'abord démontré qu'un surnageant exempt de cellules provenant d'une culture de *V. fischeri* contenait une substance (désignée comme un autoinducteur) qui stimulait la production de lumière lorsqu'il est ajouté aux cultures ayant une faible densité cellulaire. (Nealson, Hastings, 1979)

Ce signal a ensuite été caractérisé chimiquement et s'est révélé être un N-acyl homosérine lactone. Le mécanisme sensoriel qui produit et répond au signal est composé de seulement deux protéines : LuxI et LuxR. Les auteurs ont initialement pensé que le système de quorum sensing dépendant de la N-acyl homosérine lactone était un mécanisme de signalisation espèce spécifique ou intra espèce spécifique car chaque espèce produit et répond à une molécule signal de structure distincte. Cependant, des données récentes suggèrent que la communication inter espèce dépendante du N-acyl homosérine lactone peut se produire dans les biofilms *in vivo*. (Shao et Demuth, 2010)

Liljemark et al. en 1997 furent parmi les premiers à montrer la présence de signaux solubles régulant la croissance de biofilms buccaux, à l'aide de biofilms dentaires formés sur des puces en émail. (Liljemark et al, 1997)

Il existe différents types de molécules de signalisation parmi lesquelles:

- l'autoinducteur-2 (AI-2)
- le CSP (Competence-stimulating peptide)

(Hojo et al, 2009)

- **Les différents types d'autoinduceurs produits par les différentes bactéries**

L'autoinducteur-2 est l'une des molécules de signalisation les plus connues et est associée au quorum-sensing. Il a été initialement identifié chez *Vibrio harveyi* et par la suite dans plusieurs espèces bactériennes. La synthèse d'AI-2 est catalysée par LuxS, une enzyme codée par le gène *luxS*. Le gène *luxS* est hautement conservé dans le génome de nombreuses bactéries à Gram positif et à Gram négatif. De nombreuses études suggèrent que les bactéries orales ont un système de quorum-sensing qui dépend de LuxS/AI-2 (Hojo, 2009)

Le gène responsable de la production de l'autoinducteur-2 était resté inconnu jusqu'à ce que Surette et al. en 1999, aient démontré que le produit codé par le gène *luxS* fonctionne comme une synthase pour l'autoinducteur-2. (Shao et Demuth, 2010) D'autres auteurs ont découvert que des gènes ayant une similarité significative de séquence à *luxS* étaient présents dans les génomes de *E. coli*, *Salmonella typhimurium* et de nombreuses autres bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (Shao et Demuth, 2010)

Une souche *Vibrio harveyi*, avec des gènes rapporteurs, développée par le laboratoire Bassler, est capable de répondre à l'autoinducteur-2 mais pas au signal N-acyl homosérine lactone. Un gène rapporteur est un gène qui code pour la synthèse des molécules caractéristiques, facilement observables en laboratoire : fluorescence, activité enzymatique... Frias and al. en 2001, ont montré que le milieu de culture de certaines bactéries appartenant aux espèces *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* induit la production d'une bioluminescence par la souche rapporteur, suggérant que ces micro-organismes produisent des auto-inducteurs 2. Toutes les souches testées n'étaient pas capables de stimuler la souche rapporteur, cela suggère qu'il peut y avoir une variabilité entre les souches de *P. gingivalis*, *P. intermedia* et *F. nucleatum*. (Shao et Demuth, 2010)

D'autres études ont montré que *A. actinomycetemcomitans* (Fong et al, 2001) et plusieurs espèces de *Streptocoques oraux*, y compris *Streptococcus gordonii* et *Streptococcus mutans* (Blehert et al, 2003) produisent un autoinducteur-2-like qui

stimule la bioluminescence de *V. harveyi*, le gène *luxS* étant nécessaire à la production du signal de stimulation. Ainsi, ces organismes ne semblent pas posséder des voies de signalisation de quorum sensing basé sur la N-acyl homosérine lactone mais produisent l'autoinducteur-2 et expriment sans doute un circuit de quorum sensing dépendant de cet autoinducteur-2.

Tableau 7 : molécules de signalisation de différentes bactéries. (Hojo, 2009)

Signals	Bacteria	Functions	References	
AI-2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Hemin and iron uptake Protease and hemagglutinin activities Stress gene response	Chung <i>et al.</i> (2001), James <i>et al.</i> (2006) Burgess <i>et al.</i> (2002) Yuan <i>et al.</i> (2005)	
	<i>Streptococcus mutans</i>	Biofilm formation	Yoshida <i>et al.</i> (2005)	
	<i>S. gordonii</i>	Carbohydrate metabolism	McNab <i>et al.</i> (2003)	
	<i>S. anginosus</i>	Biofilm formation	Petersen <i>et al.</i> (2006)	
	<i>S. intermedius</i>	Virulence factors	Pecharki <i>et al.</i> (2008)	
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Biofilm formation	Shao <i>et al.</i> (2007)	
	<i>Eikenella corrodens</i>	Biofilm formation	Azakami <i>et al.</i> (2006)	
	<i>P. gingivalis</i> - <i>S. gordonii</i>	Biofilm formation	McNab <i>et al.</i> (2003)	
	<i>S. oralis</i> - <i>Actinomyces naeslundii</i>	Biofilm formation	Rickard <i>et al.</i> (2006)	
	CSP	<i>S. mutans</i>	Bacteriocin production, competence Biofilm formation Acid tolerance	van der Ploeg (2005), Kreth <i>et al.</i> (2005b) Li <i>et al.</i> (2001a), Aspiras <i>et al.</i> (2004) Li <i>et al.</i> (2001b)
		<i>S. gordonii</i>	Biofilm formation	Loo <i>et al.</i> (2000)
<i>S. intermedius</i>		Biofilm formation	Petersen <i>et al.</i> (2004)	

- **Résumé des rôles du quorum sensing**

- contrôle des fonctions biologiques
- contrôle de la production de facteurs de virulence et d'anti microbiens
- contrôle de la mobilité
- contrôle de la réplication et transcription de gènes
- contrôle du métabolisme du carbone et des acides aminés.

## 2. Quelques rôles de l'autoinducteur-2

### a) Autoinducteur-2 régleme la acquisition du fer

L'étude de la fonction du quorum sensing AI-2 de *A. actinomycetemcomitans* et *P. gingivalis* s'est faite par l'analyse de l'expression différentielle de gènes des souches de type sauvage et des souches mutantes présentant une absence du gène *luxS*, et

de l'analyse de gènes corrélés avec certains facteurs de virulence de ces micro-organismes.

- ***A. actinomycetemcomitans***

- Ces premières études ont montré que l'expression de la leucotoxine de *A. actinomycetemcomitans* a été réduite d'environ trois fois lors de l'inactivation de *luxS* et que le niveau d'expression de cette leucotoxine chez la souche sauvage est restauré par une complémentation avec une copie plasmidique de *luxS*, ainsi que par l'expression du mutant *luxS* avec un milieu contenant AI-2. (Fong et al, 2001) Cette étude a confirmé que l'altération de l'expression de la leucotoxine est plus dépendante de la présence du signal lui même que de l'altération du gène *luxS*.

- Les gènes *luxS* sont nécessaires à la croissance d'*A.a* dans un milieu limité en fer. De plus, l'inactivation de *luxS* altère l'expression des gènes responsables du codage des protéines permettant l'acquisition du fer. En outre, l'expression de *ftnAB*, codant pour la ferritine intracellulaire de stockage des protéines du fer, a été réduite de plus de 50 fois dans le mutant *luxS*. Les gènes codant les récepteurs pour l'hème, la transferrine et de l'hémoglobine de *A. actinomycetemcomitans* ont été régulés à la baisse dans la souche mutante, mais à des niveaux plus modestes (deux à trois fois). (Shao et Demuth, 2010)

- ***P. gingivalis***

*P. gingivalis* obtient du fer surtout à travers l'acquisition d'hémine et exprime plusieurs récepteurs et voies pour accomplir cette tâche. En effet, l'acquisition d'hémine est essentielle pour l'expression de la virulence de *P. gingivalis*.

Un mutant *luxS* de *P. gingivalis* croît difficilement lorsqu'il est cultivé avec des quantités limitées en hémine, molécule qui favorise la croissance des micro-organismes de type sauvage. La souche mutante présentait également une reprise tardive de sa croissance après transfert sur un support riche en hémine. Le mutant *luxS* a également présenté une activité d'hémagglutination réduite. (James et al, 2006)

Les études mentionnées ci-dessus montrent clairement que l'autoinducteur-2 régule l'acquisition de fer (hémine) dans les *A. Actinomycetemcomitans* oraux pathogènes, et dans les *P. gingivalis*. (Shao et Demuth, 2010)

## **b) Régulation par l'autoinducteur-2 de la croissance du biofilm de bactéries buccales**

- ***Streptococcus gordonii* et *P. gingivalis***

Selon certaines études, l'AI-2 contrôle la formation du biofilm. McNab et al en 2003 ont étudié la formation d'un biofilm avec *Streptococcus gordonii* et *P. gingivalis*. Les auteurs ont utilisé une souche mutée de *S. gordonii* (inactivation du gène *luxS*) qui a malgré tout produit un biofilm et prolifère sans problème sur une surface en polystyrène. En revanche, ce mutant est incapable de former un biofilm mixte avec *P. gingivalis* présentant aussi une mutation de *luxS*. La restauration du gène *luxS* à *S. gordonii* a permis d'obtenir un biofilm normal avec *P. gingivalis luxS* déficient. L'expression des protéines de surface SspA et SspB de *S. gordonii* impliquées dans l'adhérence entre *P. gingivalis* et cette bactérie n'est pas affectée par l'inactivation de *luxS*. Finalement, il est suggéré que l'influence de *luxS* sur la formation du biofilm se produit après l'adhésion initiale aux dents (McNab et al, 2003).

- ***A. actinomycetemcomitans***

Le quorum sensing autoinducteur-2 est étroitement lié à la capacité de *A. actinomycetemcomitans* à croître dans un biofilm. Par l'utilisation d'un système de culture de biofilm par flux, Shao et al. en 2007 ont comparé la croissance d'un biofilm de *A. actinomycetemcomitans* de type sauvage et de souches déficientes pour les gènes *luxS* et les récepteurs de l'autoinducteur-2. Les auteurs ont montré que le mutant *luxS* forme un biofilm de biomasse et d'épaisseur significativement plus faibles par rapport au biofilm de la souche de type sauvage. (Shao et Demuth, 2010) La croissance du biofilm du mutant *luxS* est identique à celle des souches sauvages après adjonction du gène muté (plasmide) ou avec de l'AI-2 exogène dans le milieu de culture.

Shao et al. en 2007 ont également identifié deux récepteurs périplasmiques potentiels pour l'autoinducteur-2, qui sont codés par les gènes *lsrB* et *rbsB*. L'inactivation de l'un de ces gènes a généré un mutant qui continue de produire un signal AI-2, mais qui n'était pas capable de répondre à celui-ci. Ces deux mutants ont également affiché une croissance de biofilm réduite. (Shao et al., 2007)

Ce résultat confirme l'importance de la signalisation auto-inducteur-2 pour la formation de biofilm par *A. actinomycetemcomitans* et suggère également que *A. actinomycetemcomitans* peut répondre au signal AI-2 par de multiples récepteurs. Ainsi, un double mutant à qui il manquerait à la fois des récepteurs *lsrB* et *rbsB* serait incapable de former un biofilm. (Shao et Demuth, 2010)

### **c) Autoinducteur-2 : rôle dans la régulation du métabolisme des carbohydrates**

McNab and al en 2003, ont montré que *S. gordonii* possède un gène fonctionnel *luxS* qui contrôle les aspects du métabolisme des glucides et la formation de biofilm d'espèces mixtes avec *P. gingivalis*.

Une analyse des gènes et des voies qui peuvent être contrôlés par *luxS* dans *S. gordonii* a été réalisée en utilisant l'affichage différentiel de l'ARNm de souche sauvage et des souches mutantes. L'absence de *luxS* conduit à une expression modulée d'une variété de gènes dont plusieurs codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des glucides. L'expression de GTF, la protéine YlbN-like, Rgg, et un homologue de exo-béta-D-fructosidase a été réprimée dans le mutant *luxS*, alors que l'expression d'un homologue de tagatose 1,6-diphosphate aldolase a été augmentée. (McNab et al, 2003)

Dans le cas de GTF, une enzyme responsable de la production de glucane à partir de saccharose, on a observé une corrélation entre l'activité de la protéine et l'expression des gènes. Par ailleurs, la complémentation avec une seule copie chromosomique *luxS* a partiellement restauré l'activité GTF.

La fructanase est une enzyme qui dégrade les fructanes issus du fructose. La GTF et la fructanase peuvent cliver le saccharose en fructose ou en glucose et fructose, les constituants monosaccharides des glucanes et fructanes. La régulation négative de

ces protéines va donc aboutir à une utilisation moins efficace du saccharose et à la modification des polymères extracellulaires de glucanes et fructanes. (*Jagusztyn-Krynicka et al, 1992*)

Dans *S. mutans*, cette voie est induite par le lactose. Par conséquent, la présence d'AI-2 peut favoriser l'utilisation du saccharose par *S. gordonii*, alors qu'en son absence ce sont le lactose et les autres sucres contenant du galactose qui sont métabolisés de manière préférentielle.

Les données présentées ici indiquent que l'AI-2 de *S. gordonii* peut influencer l'utilisation des glucides, et par conséquent son activité métabolique cellulaire. (*McNab et al, 2003*)

#### **d) Communication inter espèce**

Plusieurs bactéries parodontales (*F. nucleatum, P. inter-média, P. gingivalis et Aggregatibacter*) sécrètent un signal lié à AI-2.

Le défaut de production de l'AI-2 de certaines bactéries peuvent être compensé par des molécules presque similaires produites par certaines espèces. AI-2 produit par *A. actinomycetemcomitans* peut pallier à *P. gingivalis luxS* mutant. De même que AI-2 sécrété par *P. gingivalis* pourrait stimuler la formation de biofilm par *F. nucleatum*, ce qui suggère un rôle majeur de ces molécules dans la communication et la coordination des activités intra et inter-espèces. (*Marsh et al, 2011*)

### **3. Le CSP**

CSP est une molécule qui, comme tous les autres induceurs, permet aux bactéries de communiquer entre elles. La CSP est un petit peptide soluble ayant de 14 à 23 acides aminés et est potentiellement produit par plusieurs espèces de streptocoques oraux. La CSP est impliquée dans la production de bactériocine, certains facteurs de virulence et la formation de biofilm. En outre, CSP améliore la compétence génétique (= état physiologique dans lequel la bactérie développe la capacité d'intégrer un ADN exogène), ce qui permet le transport de l'ADN exogène dans des cellules.

La CSP dérivée de *S. mutans* peut induire le gène de la bactériocine (mutacine IV), et il a été montré que *S. mutans* utilise éventuellement cette bactériocine pour



acquérir la capacité de transformer l'ADN d'autres espèces de *Streptocoques*, tels que *S. gordonii*, vivant dans la même niche écologique (Kuramitsu et al, 2007).

Un système d'interaction entre *S. mutans* et *S. gordonii*, semble affecter la susceptibilité de chacun aux antimicrobiens. Il a récemment été démontré que *S. gordonii* peut contrarier plusieurs mécanismes de quorum sensing dépendants de *S. mutans* par l'inactivation du peptide stimulant sa compétence (CSP) (Wang et Kuramitsu, 2005). En outre, il a été montré récemment que la résistance de *S. mutans* à une variété d'agents antimicrobiens a été diminuée par l'inactivation du CSP. Ainsi, la présence de *S. gordonii* dans les biofilms peut jouer sur la localisation de *S. mutans* dans ces structures en augmentant la sensibilité de ce dernier à des agents antimicrobiens endogènes telles que les histatines, un groupe de peptides antimicrobiens souvent trouvé dans la salive. (Matsumoto-Nakano et Kuramitsu 2006)

Si un tel mécanisme d'antagonisme n'a pas encore été directement démontré in vivo, elle laisse supposer l'existence de telles interactions entre résidents du biofilm.

### **C. La régulation de l'expression génique**

Une autre interaction qui pourrait avoir des conséquences importantes sur la physiologie des biofilms ainsi que sur son évolution, est l'échange génétique entre les résidents du biofilm. Certaines interactions ont été mises en évidence. (Marsh et al, 2011)

La co-agrégation des bactéries buccales contribue non seulement à la colonisation bactérienne par des mécanismes physico-chimiques, mais aussi à la communication métabolique et à l'échange génétique, car chaque bactérie peut facilement accéder à une cellule voisine et à ses métabolites. (Hojo et al, 2009)

## **1. Échanges génétiques de facteurs de virulence entre les résidents des biofilms**

Les mécanismes potentiels de médiation d'échange génétique dans les biofilms peuvent comprendre conjugaison, transformation, transduction :

- en conjugaison, une bactérie, le donneur, transfère un plasmide conjugatif à une autre bactérie, le destinataire.
- dans la transduction, le transfert d'ADN a lieu à l'aide de bactériophages.
- dans la transformation, l'ADN qui se trouve en dehors de la cellule est fragmenté et ensuite importé dans la cellule bactérienne. Par la suite, l'ADN remplace un fragment d'ADN dans le chromosome d'origine par l'intermédiaire d'une recombinaison.

La conjugaison impliquant les streptocoques oraux a été démontré il y a 30 ans, mais il n'a pas été démontré directement dans les biofilms. De même, la transformation de plasmides entre les streptocoques oraux à l'état planctonique a été documentée (*Kuramitsu et al, 2007*). Plus récemment, il a été démontré avec des biofilms in vitro qu'un plasmide présent dans le cytoplasme de *T. denticola* pourrait être intégré dans *S. gordonii*. Par conséquent, il est raisonnable de penser que des fragments chromosomiques pourraient être échangés entre des streptocoques oraux naturellement transformables, résidant dans les biofilms. (*Li et al, 2001*).

Bien que la transduction ait été démontrée pour différentes bactéries buccales, des échanges génétiques entre différentes espèces s'effectuant par le biais de bactériophages n'a pas encore été observée. (*Yeung, 1999*)

Les cellules communiquent et interagissent les unes avec les autres au sein d'un biofilm par transfert horizontal de gènes. Les molécules de signalisation, comme CSP, augmentent la capacité de certaines cellules à recevoir de l'ADN par transformation. Le transfert de transposons de conjugaison, codant pour la résistance à la tétracycline, entre streptocoques a été démontré dans des modèles de biofilms. Des observations similaires suggèrent le partage des gènes codant pour des protéines liant la pénicilline chez les bactéries *Neisseria* commensales ou pathogènes. Le transfert de gènes entre *Treponema denticola* et *S. gordonii* a également été démontré in vitro. La présence d'ilots de pathogénicité dans certains

pathogènes parodontaux tels que *P. gingivalis* est également une preuve indirecte de transfert horizontal de gènes qui a eu lieu dans les biofilms de la plaque à un certain moment, et pourrait expliquer l'évolution de la virulence de certaines souches. (Marsh et al, 2011)

#### a) **Exemple de *P. gingivalis***

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de réaliser le séquençage de plusieurs espèces bactériennes et montrent clairement le transfert horizontal de gènes au sein de nombreuses niches écologiques. Il est probable que l'environnement dans les biofilms, y compris la plaque dentaire, est propice à l'échange génétique en raison de la proximité des résidents. Une analyse des séquences génomiques de la souche *P. gingivalis* W83 a révélé un médiateur potentiel de transfert horizontal d'ADN par conjugaison : un homologue du système de sécrétion de type IV présent chez d'autres bactéries à Gram négatif. Tribble et al en 2007 ont démontré par une étude in vitro, que des transferts d'ADN par conjugaison est un mécanisme possible qui expliquerait les variations génétiques dans la population de *P. gingivalis*. (Tribble et al, 2007).

L'identification de transfert horizontal montre chez certains microorganismes, que la proximité de bactéries dans les biofilms facilite ces interactions. L'échange de gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries en est un exemple.

#### b) **Exemple des Streptocoques**

Comme indiqué précédemment, les interactions bactériennes peuvent affecter la croissance des organismes ou groupes d'organismes. En outre, de telles interactions peuvent avoir des effets spécifiques en termes de propriétés de virulence des résidents du biofilm et pourraient influencer le pouvoir pathogène de ces structures. Les organismes de la plaque dentaire qui sont capables de neutraliser les produits finaux acides de *S. mutans* tendraient donc à réduire le pouvoir cariogène de ces biofilms.

Un des exemples les plus fascinants concernant l'échange génétique dans la communauté bactérienne buccale est l'étude récente rapportée par Kreth et al en

2005. Dans ce rapport, il a été observé que la CSP induite de *S. mutans* coordonne l'expression des gènes produisant la mutacine et la compétence (= capacité d'une cellule à prélever une molécule d'ADN libre dans son environnement). Dans les cultures mixtes de *S. mutans* et *S. gordonii* hébergeant un plasmide navette, le transfert du plasmide d'ADN de *S. gordonii* à *S. mutans* est dépendante de la CSP, et de la mutacine IV. Une analyse plus poussée a mis en évidence une libération accrue d'ADN de *S. gordonii* lors de l'ajout de mutacine IV partiellement purifiée. Sur la base de ces résultats, il a été proposé que *S. mutans*, qui réside dans un biofilm multi-espèces, peut utiliser la production des bactériocines induite par la compétence, pour acquérir de l'ADN d'autres espèces vivant dans la même niche écologique. Cette hypothèse est cohérente avec l'observation bien documentée qu'une grande diversité génomique existe entre les différentes souches de *S. mutans*. Cette diversité peut être le résultat d'un transfert horizontal de gène. (Kuramitsu et al, 2007)

### **c) Echange génétique de facteurs de virulence : exemple de *P. gingivalis***

L'expression des facteurs de virulence des bactéries est, en général, étroitement régulée. Dans certains cas, une telle réglementation est dépendante des mécanismes de quorum-sensing. (Kuramitsu et al, 2007)

Dans leur étude, Chen et al en 2004 ont utilisé des puces à ADN pour comparer les génomes de différentes souches de *P. gingivalis* et pour d'identifier les gènes qui étaient présents dans une souche virulente mais absents ou divergent dans une souche non virulente. Les souches W83 et ATCC 33277 ont été sélectionnées comme des souches virulentes et non virulentes, respectivement. Les résultats indiquent de nombreuses différences génétiques entre les deux souches, et plusieurs gènes divergent.

Un groupe de cadres de lecture impliqués dans la synthèse de polysaccharides capsulaire présent dans W83 n'a pas été retrouvé dans la souche ATCC 33277. La gravité de la maladie a été corrélée avec la présence de la capsule dans un modèle d'infection de la souris. La capsule de la souche W83 a été associée à la forme la

plus grave de l'infection, alors que la souche 381, un proche parent de la souche ATCC 33277, qui ne possède pas une capsule, a provoqué une infection minime. L'étude de l'infection des animaux nous montre l'implication de la capsule dans la virulence. (Chen et al, 2004)

## 2. Répression de certains gènes

- **L'expression de fimA est régie par *S. cristatus*.**

La colonisation du biofilm dentaire par *P. gingivalis* est un événement clé dans le passage d'une plaque commensale à une entité pathogène. La colonisation de *P. gingivalis* se fait par l'intermédiaire de fimbriae qui lui permet l'adhérence aux surfaces orales (Lamont et al, 1998). Le gène fimA qui code pour la protéine de sous-unité majeure fimbriae peut être régulé par des signaux provenant de l'environnement (Amano et al, 1994).

Une étude a examiné le passage d'information entre deux bactéries indépendantes de la plaque, *Streptococcus cristatus* et *Porphyromonas gingivalis*. Une protéine de surface de *S. cristatus* semble causer la répression du gène fimbrial (fimA) de *P. gingivalis*. L'activité de signalisation est associée à une protéine de surface de 59 kDa de *S. cristatus* qui a montré une spécificité pour le gène fimA. Ainsi, *S. cristatus* est capable de réprimer l'expression de gènes de virulence de *P. gingivalis* ce qui, en conséquence, module le développement de la plaque pathogène. (Xie et al, 2000)

Ainsi, Xie et al. en 2000, ont montré la capacité d'une protéine de surface CC5A de *S. cristatus* à diminuer de 92% l'expression du gène fimA de *P. gingivalis*. Dans la plaque commensale, *S. cristatus* est capable d'induire la régulation négative de l'expression de fimA et donc d'inhiber la colonisation de *P. gingivalis* dans la plaque. Une diminution de l'expression des adhésines fimbriae peut retarder l'attachement de *P. gingivalis* et rendre l'organisme plus sensible à l'élimination par le flux salivaire. Ces résultats corroborent l'antagonisme de *S. cristatus* concernant la colonisation de *P. gingivalis* et montrent que la signalisation peut se produire entre des cellules entières de ces deux espèces. (Xie et al, 2000)

## **D. La résistance des bactéries du biofilm aux antimicrobiens et aux facteurs de l'hôte**

La résistance des bactéries prises au sein du biofilm est aujourd'hui bien connue.

Elle s'explique par :

- les propriétés intrinsèques du biofilm
- l'acquisition de gènes de résistance par certaines bactéries.

### **1. Propriétés intrinsèques du biofilm**

La vie en communauté des bactéries et leur organisation spécifique au sein du biofilm, permet à un grand nombre de bactéries différentes de se développer.

Ainsi, les bactéries orales peuvent faire face à l'oxygène, délétère pour certaines espèces, à l'immunité de l'hôte et aux agents antimicrobiens à travers la formation de biofilm dentaire qui représente une barrière efficace. En effet, la matrice du biofilm agit en tant que résine échangeuse d'ions qui restreint le flux de molécules chargées ou réactives par l'intermédiaire du film biologique. (Jakubovics, Kolenbrander, 2010)

- **Le biofilm et l'hôte**

Les tissus de l'hôte qui entourent la cavité buccale peuvent également sécréter des agents antimicrobiens tels que les histatines et les défensines. Un certain nombre de bactéries orales, y compris *S. mutans*, se sont avérés être sensibles aux histatines produites par les glandes salivaires. Cependant, certaines bactéries, y compris *T. denticola*, ont montré une résistance aux défensines spécifiques. (Brissette et Lukehart, 2007)

Les cellules hôtes qui tapissent la cavité buccale peuvent également sécréter des modulateurs immunitaires qui pourraient influencer sur les propriétés de la plaque dentaire. Les sécrétions salivaires contiennent des immunoglobulines A, anticorps produits à partir des glandes salivaires tapissant la cavité buccale. Certains d'entre eux peuvent être dirigés contre des antigènes exprimés par les résidents du biofilm oral. Toutefois, il n'est pas encore sûr que ces anticorps puissent pénétrer dans la

matrice de la plaque et interférer avec les propriétés bactériennes. (Howard et al, 2007)

- **Le biofilm et la gestion de l'oxygène**

Le milieu buccal est un milieu aérobie. Dès lors, la survie des bactéries orales anaérobies dépend de la tolérance spécifique de chaque espèce à l'oxygène (par exemple, par la présence d'enzymes telles que la superoxyde dismutase, l'oxydase / peroxydase et la catalase) et des interactions bactériennes au sein de la communauté de biofilm. Ainsi, les bactéries aérobies consomment l'O<sub>2</sub> et protègent les bactéries anaérobies.

Dans un environnement oxygéné et appauvri en CO<sub>2</sub>, *F. nucleatum* soutient la croissance de *P. gingivalis* en fournissant un environnement capnophile (Diaz et al, 2002). Bradshaw et al. en 1998 ont suggéré que lorsque *F. nucleatum* n'est pas présent dans l'inoculum, le nombre de cellules viables de *P. gingivalis* et *P. nigrescens* dans le biofilm a diminué significativement sous des conditions aérobies. (Bradshaw et al, 1998)

- **Biofilm et antimicrobiens**

- Antibiotiques

Les bactéries orales qui se lient à la surface de la dent présentent un motif différent de celles flottantes ou planctoniques. La différence la plus notable entre les bactéries orales dans les biofilms dentaires et la même souche cultivée à l'état planctonique est la tolérance accrue aux agents antimicrobiens dans un biofilm mature. La concentration d'antibiotique nécessaire pour inhiber la croissance des souches bactériennes au sein de leurs biofilms était environ 250 fois supérieure à celle requise lorsque les mêmes souches ont été cultivées en plancton. (Sedlacek et Walker, 2007)

En raison de la nature hétérogène des biofilms dentaires, on pense qu'il existe des mécanismes de tolérance multiples.

- Tout d'abord, il est probable que la matrice extracellulaire limite physiquement la diffusion des agents antimicrobiens.
- Deuxièmement, il semble les bactéries au sein du biofilm dans un environnement stressé (par de modifications de pH, température ou par la présence d'antimicrobiens) peuvent avoir une croissance lente et cela contribue à la résistance. En effet, certains antibiotiques tels que les pénicillines ne pourront être pleinement actifs car leur action n'est efficace que sur les bactéries en cours de multiplication.
- Troisièmement, il existe des facteurs de résistance, tels que les mécanismes d'inactivation des enzymes. Par exemple, certaines bactéries à Gram positif sont capables de produire des  $\beta$ -lactamase et vont libérer cette enzyme dans leur environnement proche, protégeant ainsi leurs voisines non productrices de cette enzyme de l'action des pénicillines. Celle-ci provoque la dégradation de la  $\beta$ -lactamines. Par conséquent, ces enzymes dans le biofilm dentaire amplifient sa fonction de barrière. (Hojo, 2009)

#### - Antiseptiques

\* La croissance des bactéries dans les biofilms, comme la plaque dentaire, affichent une tolérance accrue aux agents antimicrobiens, y compris ceux utilisés dans les dentifrices et bains de bouche (Wilson et al, 1996). Par exemple, les concentrations de chlorhexidine et de fluorure d'ammine nécessaire pour tuer *Streptococcus sobrinus* dans un biofilm établi, était 300 et 75 fois plus importantes, respectivement, que les concentrations minimales bactéricides qui agissent contre les cellules planctoniques. De même, il a été nécessaire d'administrer 10-50 fois la concentration minimale inhibitrice de chlorhexidine pour éliminer *Streptococcus sanguinis* des biofilms (Marsh, 2011).

\* L'âge du biofilm est également un facteur important. Les biofilms de *S. sanguinis* ou d' *A. actinomycetemcomitans* étaient plus tolérants à la chlorhexidine ou aux antibiotiques, respectivement, que les jeunes biofilms. Les biofilms de plusieurs espèces de bactéries orales ont également été montré pour être plus tolérants aux antibiotiques (par exemple, l'amoxicilline, la doxycycline, la minocycline et metronidazole) que les cellules planctoniques (Takahashi et al, 2007), bien que la variation



de sensibilité à ces différents antibiotiques varie en fonction du micro-organisme, le système de modèle et l'inhibiteur utilisé.

\* La microscopie confocale in situ des biofilms a montré que la chlorhexidine affecte seulement les couches externes de cellules, en 24 et 48 h, des biofilms, ce qui suggère soit une élimination de l'agent à la surface du biofilm ou un manque de pénétration. (Marsh, 2011)

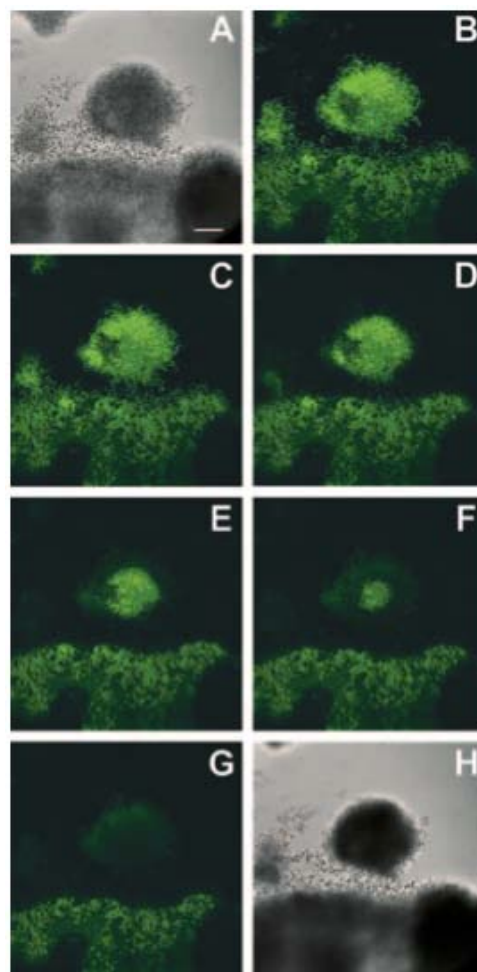


Figure 26: action antimicrobienne de la chlorhexidine à 0,12% sur un biofilm coloré avec fluophore (de couleur verte). (Takenaka et al, 2008)

**Figure 26 :**

*Dans les essais avec des cultures pures de cellules planctoniques, un biofilm de Streptocoques et d'A. actinomycetemcomitans est incubé pendant 2 heures avec un marqueur fluorescent et développe une fluorescence verte (figure 26B).*

Ensuite, on met au contact de la chlorhexidine pendant 8 min et une perte progressive de la fluorescence verte a été observée (Fig. 26C à G). La fluorescence a été perdue à la périphérie des amas de cellules (comparer Fig. 26B et D) puis a progressé vers l'intérieur, après un contact avec la chlorhexidine. Même après 20 min d'exposition, certains endroits du biofilm sont restés lumineux.

## **2. Acquisition de gènes de résistance**

La parodontite est une maladie inflammatoire des tissus de soutien des dents causées par les bactéries de la plaque dentaire. Elle est normalement traitée par élimination du biofilm bactérien à la surface des racines atteintes de poches parodontales. Cependant, chez certains individus, un traitement antimicrobien est indiqué, administré par voie systémique. Une des classes d'antibiotiques les plus couramment prescrits est celle des tétracyclines.

- **Le transfert de gènes**

Plusieurs études récentes ont suggéré que les interactions entre les bactéries du biofilm pourraient influencer sur leur sensibilité aux antimicrobiens.

Les gènes codant pour une résistance à certains antibiotiques et toxines sont connus pour être échangés entre bactéries par transfert horizontal de gènes (*Chen et Novick, 2009*).

Étant donné que chaque bactérie peut facilement communiquer avec une cellule bactérienne voisine, il est raisonnable de penser que le transfert de gène codant une résistance à certains antibiotiques peut se produire dans les biofilms dentaires.

- **Exemples de transfert de gènes de résistance aux tétracyclines**

La résistance aux tétracyclines est très répandue, et la plupart des bactéries acquièrent cette résistance grâce à l'acquisition d'éléments génétiques mobiles transportant des gènes codant la résistance.

Trente-huit de ces gènes ont été décrits à ce jour. Onze de ces gènes codent pour les « ribosomal protection proteins » (RPPs) qui modifient la structure du ribosome

bactérien empêchant ainsi l'action de l'antibiotique. Les gènes RPPs se trouvent généralement sur les transposons qui s'intègrent dans les chromosomes bactériens. Il a été émis l'hypothèse que les bactéries acquièrent une résistance à la tétracycline par le transfert de transposons de conjugaison qui incluent ces gènes RPPs. Ce transfert a été démontré in vitro, mais pas encore in vivo. (Warburton et al, 2007)

- Exemple de *S. sanguinis* et *S. cristatus*

Dans la publication de Warburton et al de 2007, l'étude des populations de streptocoques résistantes à la doxycycline, avant et après traitement avec cet antibiotique, a révélé à la fois l'expansion clonale de la population bactérienne résistante et le transfert par conjugaison d'un transposon codant cette résistance à d'autres bactéries. L'analyse de la séquence du transposon a montré qu'il s'agissait d'un transposon complexe composé de Tn916 et d'un fragment d'ADN codant pour cinq gènes de source inconnue.

Les auteurs ont isolé avant traitement à la doxycycline :

\* *S. sanguinis*, bactérie résistante à cet antibiotique, qui avant antibithérapie est un composant minoritaire de la flore mais qui devient majoritaire après.

\* *S. cristatus*, une bactérie sensible à la doxycycline.

Après traitement antibiotique, ces mêmes souches bactériennes sont isolées et mises en culture. Ces auteurs constatent que *S. cristatus* est devenu non seulement résistante à la doxycycline mais aussi à l'érythromycine suite à l'acquisition du transposon CTn6002. Cet élément a été séquencé et présente la séquence du transposon Tn916 et celle codant pour l'érythromycine. Une souche de *Streptocoque oralis* a été isolée chez ce patient avant traitement qui portait CTn6002 et est donc impliquée en tant que donateur.

Cette étude a montré l'existence de transfert de gènes de résistance aux antimicrobiens d'une espèce de streptocoques oraux à l'autre pendant le traitement par antimicrobiens de la parodontite. Ceci confirme que l'administration d'agents antimicrobiens pour les infections bactériennes chroniques, telles que la parodontite, peut contribuer à l'augmentation des niveaux de résistance bactérienne aux antibiotiques. (Warburton et al, 2007)

#### - Exemple de *Bacillus subtilis* et des streptocoques

Dans l'étude de Robert et al en 1999, un profil de résistance à la tétracycline a été établi à partir d'un isolat de plaque dentaire de profondeur constante. Celui-ci a été inoculé avec une souche de *Bacillus subtilis* contenant le transposon conjugatif, Tn5397, qui confère la résistance à la tétracycline. Après 6 heures et 24 heures, le profil de résistance à la tétracycline du biofilm a été de nouveau examinée et une espèce de streptocoque résistant à la tétracycline a été isolé. Une analyse moléculaire de cette souche a confirmé que Tn5397 était présent dans son ADN génomique. Ces données représentent le premier rapport, de transfert inter-générique d'un transposon de conjugaison dans un biofilm à espèces mixtes et démontre la capacité des transposons de conjugaison à diffuser des gènes de résistance aux antibiotiques.

- **Exemple de transfert de gènes de résistance à l'érythromycine**

#### - Exemple de *T. denticola* et *S. gordonii*

Les streptocoques sont l'un des colonisateurs primaires de la plaque dentaire et sont bien connus pour leur capacité cariogène. *T. denticola*, est un spirochète oral à Gram négatif qui est associé à la pathogénèse des maladies parodontales, et qui contient des gènes qui sont plus semblables à ceux des bactéries à Gram positif.

Certaines bactéries orales à Gram positif telles que *S. gordonii* sont naturellement transformables. Wang et al en 2002 ont étudié la possibilité d'un échange génétique entre les bactéries orales en utilisant une résistance à l'érythromycine (Ermr) avec un plasmide navette, pKMR4PE, comme un indicateur. Les cellules Challis de *S. gordonii* ont été co-cultivées avec un pKMR4PE purifié ou avec *T. denticola* hébergeant pKMR4PE, soit dans un bouillon ou dans un biofilm artificiel.

Le plasmide pKMR4PE, isolé de *E. coli* ou contenu dans des cellules de *T. denticola*, a transformé des cellules Challis de *S. gordonii*, mais à une fréquence relativement basse. Les auteurs ont isolé le plasmide pChallis6 des *S. gordonii* transformés sur un gel d'agarose, et observé qu'ils contiennent deux bandes majeures. Chacune de ces

deux bandes sont plus petites en taille que le plasmide pKMR4PE original, ce qui indique que pKMR4PE a été modifié dans les *S. gordonii* transformés.

*S. gordonii* est une bactérie naturellement transformable qui est susceptible de prendre l'ADN d'autres bactéries de la plaque. Des preuves expérimentales in vitro montrent que *S. gordonii* peut prendre également l'ADN extracellulaire présent dans la salive.

Les résultats obtenus par Wang et al montrent que le transfert de gènes de *T. denticola* à *S. gordonii* peut se produire dans un bouillon et en dans des biofilms artificiels, indiquant alors la possibilité d'un transfert horizontal de gènes dans la plaque dentaire. Cependant, la preuve d'une telle occurrence dans la cavité orale n'a pas encore été obtenue. (Wang et al, 2002)

- **Résistance à la chlorhexidine**

Dans un modèle in vitro, les biofilms, contenant à la fois *S. mutans* et *Veillonella parvula*, ont mieux résisté à l'action de la chlorhexidine, agent antimicrobien, que les biofilms ne présentant qu'une seule espèce. Bien que la base moléculaire de cette résistance accrue n'ait pas été déterminée, il a été suggéré que le regroupement de ces deux organismes au sein de biofilms peut être responsable de cette propriété. (Kara et al, 2007)

## Conclusion

Les nombreuses études sur la plaque dentaire et le biofilm ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de celui-ci. Ainsi, il est aujourd'hui bien reconnu qu'une bactérie prise au sein d'un biofilm présente une capacité d'agrégation et de développement augmentée et peut acquérir des facteurs de virulence notamment l'acquisition de gènes codant des résistances aux antibiotiques. Pour faire face à ces nouvelles propriétés acquises par les bactéries, des stratégies innovantes voient le jour. L'utilisation des antimicrobiens pour l'élimination du biofilm dentaire, responsable des maladies parodontales, était limitée. Une autre approche de traitement est alors apparue, en exploitant d'autres cibles.

Plus récemment, un système de quorum sensing a été identifié au niveau des biofilms buccaux, et la production d'auto-inducteurs par des bactéries parodontales a été mise en évidence. L'étude du quorum sensing aboutit aujourd'hui au développement de futurs traitements, ayant pour cible les systèmes AI-2 et CSP, et ceci afin d'affaiblir la virulence bactérienne en interférant avec la communication de cellule à cellule.

Une nouvelle classe de peptides antimicrobiens spécifiquement ciblés (STAMPS) a récemment été mise au point. Les STAMPS ont une structure à deux faces. La construction des STAMPS est basée sur la fusion d'un domaine peptidique cible espèce spécifique avec un domaine peptidique antimicrobien à large spectre. Le premier domaine permet l'adhérence spécifique du STAMPS sur une bactérie et le second est un peptide antibactérien non spécifique qui est lié chimiquement à la séquence et tue la bactérie ciblée après fixation. Il a été suggéré que les STAMPS, qui ont été construits avec des peptides dérivés de CSP de *S. mutans*, sont potentiellement capables d'éliminer *S. mutans* des biofilms multi-espèces sans affecter les espèces étroitement apparentées tels que *S. gordonii* et *S. sanguinis*. Ainsi, ces STAMPS pourraient devenir des antibiotiques « probiotiques » qui élimineraient sélectivement les pathogènes tout en préservant la flore saine protectrice. (Eckert et al, 2006)

La diversité des possibilités de signalisation au sein des communautés microbiennes, et le rôle important de ces molécules dans la coordination de l'expression des gènes et dans la formation de biofilms, ont donné un nouvel élan aux travaux étudiant le potentiel des inhibiteurs analogues capables de perturber ces réseaux, offrant ainsi des mécanismes pour contrôler ou d'influencer le développement de la plaque dentaire. (*Marsh et al, 2011*)

Il faudra donc orienter les recherches futures sur l'inhibition du quorum mais de manière à ce que les stratégies incluent un plus faible risque de développement de résistances. Ainsi on recherchera des inhibiteurs non compétitifs de quorum sensing plutôt que des inhibiteurs compétitifs, pour éviter la surexpression de gènes de base de quorum sensing.

Quelques analogues existent, permettant de bloquer le quorum sensing dans les cellules de type sauvage ou dans des modèles d'infection d'animaux. Il est à noter, cependant, que les inhibiteurs de quorum sensing à large spectre pourraient interférer avec la flore microbienne commensale de l'hôte, ce qui pourrait conduire à des conséquences indésirables.

Un système potentiel de blocage de LuxR est basé sur des inhibiteurs irréversibles qui se lient de façon covalente et bloquent le site actif de l'homologue de LuxR.

Il est donc prometteur de compter sur l'action de petites molécules activatrices ou inhibitrices qui agiraient sur la communication intercellulaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- **Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE.**

Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.

J Clin Microbiol 2005 ; 43: 5721–5732.

- **AFSSAPS**, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, 2011,  
Disponible à partir de l'URL :

[http://ansm.sante.fr/var/ansm\\_site/storage/original/application/753c041773b2cebeab1ec25bdba06d33.pdf](http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/753c041773b2cebeab1ec25bdba06d33.pdf). (Consulté le 23/09/2013)

- **Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, et al.**

The In Vivo Dynamics Of Streptococcus Spp., Actinomyces Naeslundii, Fusobacterium Nucleatum And Veillonella Spp. In Dental Plaque Biofilm As Analysed By Five-Colour Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization.

J Med Microbiol 2007 ; 56: 681–687.

- **Al-Hashimi I, Levine MJ.**

Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle.

Arch Oral Biol 1989; 34:289–295.

- **Alexander M.** Microbial ecology. New York : Wiley, 1971. 511

- **Amano A, Sharma A, Sojar HT, Kuramitsu HK, Genco RJ.**

Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by Porphyromonas gingivalis.

Infect Immun 1994 ; 62: 4682–4685.

- **Amano A., H. T. Sojar, J.-Y. Lee, A. Sharma, M. J. Levine, and R. J. Genco.**  
Salivary receptors for recombinant fimbriin of Porphyromonas gingivalis.

Infect. Immun 1994 ; 62:3372–3380.

- **Banas JA, Vickerman MM.**

Glucan-binding proteins of the oral streptococci.

Crit Rev Oral Biol Med 2003 ; 14: 89– 99.

- **Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al.**

Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries.

J Clin Microbiol 2002 ; 40:1001-1009.



- **Blehert DS, Palmer RJ, Xavier JB, Ameida JS, Kolenbrander PE.**

Autoinducer 2 production by *Streptococcus gordonii* DL1 and the biofilm phenotype of a luxS mutant are influenced by nutritional conditions.

J Bacteriol 2003; 185: 4851–4860.

- **Bonnaure-Mallet M., Chardin H., Barsotti O.**

Microbiologie en odonto-stomatologie.

Paris : Maloine, 2006. 132-160.

- **Bowden, G. H. W.**

Nutritional influences on biofilm development.

Adv. Dent. Res 1997 ; 11:81–99.

- **Bradshaw DJ, Homer KA, Marsh PD, Beighton D.**

Metabolic cooperation in oral microbial communities during growth on mucin.

Microbiology 1994 ; 140: 3407–3412.

- **Bradshaw DJ, Marsh PD, Hodgson RJ, Visser JM.**

Effects of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms.

Caries Res 2002, 36:81-86.

- **Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C.**

Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration.

Infect Immun 1998 ; 66: 4729– 4732.

- **Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C.**

Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with aerobic / facultative species as a microbial community.

Lett Appl Microbiol 1997 ; 25: 385–387.

- **Brady, L.J., Maddocks, S.E., Larson, M.R. et al.**

The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesions.

Mol Microbiol 2010 ; 77: 276–286.

- **Bramanti, T. E., and S. C. Holt.**

Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50.

J. Bacteriol 1991 ; 173:7330–7339

- **Brissette, C. A., and S. A. Lukehart.**

Mechanisms of decreased susceptibility to beta-defensins by *Treponema denticola*.  
Infect. Immun 2007 ; 75: 2307–2315.

- **Brown SA, Whiteley M.**

A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

J Bacteriol 2007 ; 189: 6407–6414.

- **Busscher H.J and Van der Mei H.C.**

Physico chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation.

Adv Dent Res, 1997 ; 11 : 24-32

- **Busscher HJ, Bos R, Van der Mei HC.**

Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. FEMS Microbiol Lett 1995 ; 128:229-234.

- **Byers HL, Tarelli E, Homer KA, Beighton D.**

Sequential deglycosylation and utilization of the N-linked, complex-type glycans of human alpha1-acid glycoprotein mediates growth of *Streptococcus oralis*.  
Glycobiology 1999 ; 9:469-479.

- **Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Cisar JO, Kolenbrander PE.**

Characterization of a *Streptococcus* sp.-*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque.

J Bacteriol 2008 ; 190: 8145–8154.

- **Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Cisar JO, Kolenbrander PE.**

Characterization of a *Streptococcus* sp.–*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque.

J Bacteriol 2008 ; 190: 8145–8154.

- **Chen J, Novick RP.**

Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes.

Science 2009 ; 323:139-141.

- **Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, Duncan MJ.**

Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*.

J Bacteriol. 2004 Aug; 186(16):5473-9.

- **Costerton J. W., Lewandowski Z., Caldwell D. E., Korber D. R., and Lappin-Scott H. M.**

Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol* 1995 ; 49:711–745.

- **Darenfed H., Grenier D., and Mayrand D.**

Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis.

*Infect. Immun* 1999 ; 67:6439– 6444.

- **Demuth D.R., Irvine D.C., Costerton J.W., Cook G.S. and Lamont R.J.**

Discrete protein determinant directs the species-specific adherence of *Porphyromonas gingivalis* to oral streptococci.

*Infect Immun* 2001 ; 69: 5736–5741.

- **Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH et al.**

Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel.

*Appl Environ Microbiol* 2006 ; 72: 2837–2848.

- **Diaz PI, Zilm PS, Rogers AH.**

*Fusobacterium nucleatum* supports the growth of *Porphyromonas gingivalis* in oxygenated and carbon-dioxide-depleted environments.

*Microbiology* 2002: 148: 467–472.

- **Dige I, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B.**

Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms.

*Oral Microbiol Immunol* 2009 ; 24: 69–75.

- **Donlan R.M. and Costerton J.W.**

Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.

*Clin Microbiol Rev* 2002 ; 15(2): 167-93.

- **Dû L. D., and Kolenbrander P. E.**

Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR.

*Infect. Immun* 2000 ; 68:4834–4837.

- **Eckert R, He J, Yarbrough DK, Qi F, Anderson MH, Shi W.**

Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided “smart” antimicrobial peptide.

*Antimicrob Agents Chemother* 2006 ; 50:3651-3657.

- **Edwards AM, Jenkinson HF, Woodward MJ, Dymock D.**

Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405.

Infect Immun 2005 ; 73:2891-2898.

- **Egland Paul G., Palmer Robert J., Kolenbrander Paul E.**

Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*–*Veillonella atypica* biofilms: Signaling in flow conditions requires juxtaposition.

Proc Natl Acad Sci U S A. **2004**; 101(48): 16917–16922.

- **Eick S, Seltmann T, Pfister W.**

Efficacy of antibiotics to strains of periodontopathogenic bacteria within a single species biofilm – an in vitro study.

J Clin Periodontol 2004; 31: 376–383.

- **Ei-Sabaeny A., Demuth D.R. and Lamont R.J.**

Regulation of *Streptococcus gordonii* sspB by the sspA gene product. I

Infect Immun 2001 ; 69: 6520–6522

- **Ellen R.P., Lepine G., Nghiem P.M.**

In vitro models that support adhesion specificity in biofilms of oral bacteria.

Adv Dent Res, 1997 ; 11(1) : 33-42

- **Enersen Morten, Nakano Kazuhiko, Amano Atsuo**

*Porphyromonas gingivalis* fimbriae.

Published online 2013 May 6. J Oral Microbiol. 2013; 5: 10.3402/jom.v5i0.20265.

- **Fenno JC, Hannam PM, Leung WK, Tamura M, Uitto VJ, McBride BC.**

Cytopathic effects of the major surface protein and the chymotrypsin-like protease of *Treponema denticola*.

Infect Immun 1998 ; 66:1869-1877.

- **Feuille, F., I. L. Ebersole, L. Kesavalu, M. J. Steffen, and S. C. Holt.**

Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*.

Infect. Immun 1996 ; 64:2094–2100.

- **Fine DH, Velliyagounder K, Furgang D, Kaplan JB.**

The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates.

Infect Immun 2005 ; 73:1947-1953.

**- Fong KP, Chung WO, Lamont RJ, Demuth DR.**

Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS.

Infect Immun 2001; 69: 7625–7634.

**- Fong KP, Gao L, Demuth DR.**

LuxS and arcB control aerobic growth of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* under iron limitation.

Infect Immun 2003; 71: 298–308.

**- Gibbons, R. J., and M. Nygaard.**

Interbacterial aggregation of plaque bacteria.

Arch. Oral Biol 1970 ; 15:1397–1400.

**- Grenier D.**

Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*.

Infect Immun 1992 ; 60:5298-5301.

**- Hamada, S., and H. D. Slade.**

Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*.

Microbiol. Rev 1980 ; 44:331–384.

**- Hamada.**

Binding of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to proline-rich glycoproteins in parotid saliva via a domain shared by major salivary components.

Infect. Immun 1998 ; 66:2072–2077.

**- Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, et al.**

Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria.

J Bacteriol 2005 ; 187:5330-5340.

**- Hanjuan Shao and Donald R. Demuth.**

Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens.

Periodontology 2000, 2010 ; Vol. 52, 2010, 53–67

**- Hasegawa, Y., Iwami, J., Sato, K. et al.**

Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2.

Microbiology 2009 ; 155: 3333–3347.

- **Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D.**  
Type V protein secretion pathway: the autotransporter story.  
Microbiol Mol Biol Rev 2004 ; 68:692-744.
- **Herrera D, van Winkelhoff AJ, DelleMijn-Kippuw N, Win- kel EG, Sanz M.**  
B-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands.  
J Clin Periodontol 2000 ; 27: 520–525.
- **Hillman, J. D., S. S. Socransky, and M. Shivers.**  
The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. Arch. Oral Biol 1985 ; 30:791–795.
- **Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., and Maeda N.** Bacterial Interactions in dental biofilm development.  
J Dent Res, 2009 ; 88(11):982-990
- **Holmes, A.R., McNab, R. and Jenkinson, H.F.**  
Candida albicans binding to the oral bacterium Strepto- coccus gordonii involves multiple adhesin–receptor inter- actions.  
Infect Immun 1996 ; 64: 4680–4685.
- **Howard K. Kuramitsu, Xuesong He, Renate Lux, Maxwell H. Anderson, and Wenyan Shi.**  
Interspecies Interactions within Oral Microbial Communities.  
Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2007 ; 71(4) : 653-670
- **Hua Xie, Guy S. Cook, J. Willial Costerton, Greg Bruce, Timothy M. Rose and Richard J.Lamont.**  
Intergeneric Communication in Dental Plaque Biofilms.  
J.Bacteriol. 2000 ; 182(24) : 7067-7069
- **Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK.**  
Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of Treponema denticola.  
Infect Immun 2004 ; 72: 4619–4627.
- **Ishihara, K., A. Nabuchi, R. Ito, K. Miyachi, H. K. Kuramitsu, and K. Okuda.**  
Correlation between detection rates of periodontopathic bacterial DNA in carotid coronary stenotic artery plaque and in dental plaque samples.  
J. Clin. Microbiol 2004 ; 42:1313–1315.

- **Jacob M. ten Cate.**

Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque.

Odontology 2006 ; 94:1–9.

- **Jagusztyn-Krynicka E. K., J. B. Hansen, V. L. Crow, T. D. Thomas, A. L. Honeyman, and R. Curtiss.**

Streptococcus mutans serotype c tagatose 6-phosphate pathway gene cluster.

J. Bacteriol 1992 ; 174:6152–6158.

- **Jakubovics NS, Brittan JL, Dutton LC, Jenkinson HF.**

Multiple adhesin proteins on the cell surface of Streptococcus gordonii are involved in adhesion to human fibronectin.

Microbiology 2009 ; 155: 3572–3580.

- **Jakubovics NS, Kerrigan SW, Nobbs AH et al.**

Functions of cell surface-anchored antigen I / II family and Hsa polypeptides in interactions of Streptococcus gordonii with host receptors.

Infect Immun 2005 ; 73: 6629–6638.

- **Jakubovics NS, Kolenbrander PE.**

The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms.

Oral Diseases, 2010 ; 16, 729–739 doi:10.1111/j.1601-0825.2010.01701.

- **James CE, Hasegawa Y, Park Y, Yeung V, Tribble GD, Kuboniwa M, Demuth DR, Lamont RJ.**

LuxS involvement in the regulation of genes coding for hemin and iron acquisition systems in Porphyromonas gingivalis.

Infect Immun 2006: 74: 3834–3844.

- **Kaplan CW, Lux R, Haake SK, Shi W.**

The Fusobacterium nucleatum outer membrane protein RadD is an arginine-inhibitable adhesin required for inter-species adherence and the structured architecture of multispecies biofilm.

Mol Microbiol 2009: 71: 35–47.

- **Kaplan JB, Meyenhofer MF, Fine DH.**

Biofilm growth and detachment of Actinobacillus actinomycetemcomitans.

J Bacteriol 2003: 185: 1399–1404.

- **Kara, D., S. B. I. Luppens, J. van Marle, R. Ozok, and J. M. ten Cate.**  
Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine.  
FEMS Microbiol. Lett 2007 ; 271:90–97.
- **Kinder SA, Holt SC.**  
Characterization of coaggregation between *Bacteroides gingivalis* T22 and *Fusobacterium nucleatum* T18.  
Infect Immun 1989; 57: 3425–3433.
- **Koga, T., T. Oho, Y. Shimzaki, and Y. Nakano.**  
Immunization against dental caries.  
Vaccine 2002 ; 20:2027–2044.
- **Kolenbrander Paul E., Roxanna N. Andersen, David S. Blehert, Paul G. Egland, Jamie S. Foster, and Robert J. Palmer Jr.**  
Communication among Oral Bacteria. Microbiology and molecular biology reviews. Sept. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2002 ; 66(3) : 486-505
- **Kolenbrander PE, Andersen RN.**  
Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis* by lactose and related sugars.  
Infect Immun 1989; 57: 3204–3209.
- **Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI.**  
Bacterial interactions and successions during plaque development.  
Periodontol 2000, 2006 ; 42:47-79.
- **Kolenbrander, P. E.**  
Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems.  
Annu. Rev. Microbiol 2000 ; 54:413–437.
- **Köll-Klais P, Mändar R, Leibur E, Marcotte H, Hammarström L, Mikelsaar M.**  
Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity.  
Oral Microbiol Immunol 2005 ; 20:354-361.



- **Kosuke Kataoka, Atsuo Amano, Shigetada Kawabata, Hideki Nagata, Shigeyuki Hamada, and Satocshi Shizukuishi.**

Secretion of Functional Salivary Peptide by *Streptococcus gordonii* Which Inhibits Fimbria-Mediated Adhesion of *Porphyromonas gingivalis*.

Infect. Immun. 1999 ; 67(8) : 3780-3785

- **Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F.**

Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species.

Mol Microbiol 2005 ; 57:392-404.

- **Kreth, J., J. Merritt, W. Shi, and F. Qi.**

Coordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species.

Mol. Microbiol 2005 ; 57:392–404.

- **Kreth, J., J. Merritt, W. Shi, and F. Qi.**

Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm.

J. Bacteriol 2005 ; 187:7193–7203.

- **Kroes I, Lepp PW, Relman DA.**

Bacterial diversity within the human subgingival crevice.

Proc Natl Acad Sci USA 1999 ; 96: 14547–14552.

- **Kuboniwa M., G. D. Tribble, C. E. Lamer, A. O. Killic, L. Tao, M. Herzberg, S. Shizukuishi, and R. J. Lamont.**

*Streptococcus gordonii* utilizes several distinct gene functions to recruit *Porphyromonas gingivalis* into a mixed community.

Mol. Microbiol 2006 ; 60:121–139.

- **Kuboniwa Masae, Lamont Richard J.**

Subgingival biofilm formation.

Periodontology 2000, 2010 ; Vol. 52, 2010, 38–52

- **Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ.**

Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis.

J Clin Microbiol 2005 ; 43:3944-3955.

- **Kuramitsu HK, He X, Lux R, Anderson MH, Shi W.**

Interspecies interactions within oral microbial communities.

Microbiol Mol Biol Rev 2007; 71: 653–670.

- **Kuramitsu, H. K., and V. Trapa.**

Genetic exchange between oral streptococci during mixed growth.

J. Gen. Microbiol 1984 ; 130:2497–2500.

- **Lamont R. J., and H. F. Jenkinson.**

Life below the gum line: patho- genic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*.

Microbiol. Mol. Biol. Rev 1998 ; 62:1244–1263.

- **Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, and J. W. Costerton.**

Optical sectioning of microbial biofilms.

J. Bacteriol 1991 ; 173:6558–6567.

- **LeBlanc DJ, Hawley RJ, Lee LN, St Martin EJ.**

“Conjugal” transfer of plasmid DNA among oral streptococci.

Proc Natl Acad Sci USA 1978 ; 75:3484-3487.

- **Lewis, W.**

Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

Antimicrob. Agents Chemother. 2001 ; 45(4) : 999-1007

- **Li Y.H., P. C. Y. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch.**

Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms.

J. Bacteriol 2001 ; 183:897–908.

- **Liljemark WF, Bloomquist CG, Reilly BE, Bernards CJ, Townsend DW, Pennock AT, Lemoine JL.**

Growth dynamics in a natural biofilm and its impact on oral disease management.

Adv Dent Res 1997: 11: 14–23.

- **Lin X, Lamont RJ, Wu J, Xie H.**

Role of differential expression of streptococcal arginine deiminase in inhibition of fimA expression in *Porphyromonas gingivalis*.

J Bacteriol 2008: 190: 4367–4371.

- **Lin X., Wu J. and Xie H.**

*Porphyromonas gingivalis* minor fimbriae are required for cell–cell interactions.

Infect Immun 2006 ; 74: 6011–6015.

- **Madigan M. T. et Martinko J. M.**

Brock Biology of Microorganisms.

13<sup>e</sup> édition, San Francisco : Pearson : B. Cummings, 2002. Pagination multiple.

- **Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y, Tanaka M, Tanaka J, Minamino N, Shizukuishi S.**

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae.

Infect Immun 2004; 72: 1341–1348.

- **Maeda K, Tribble GD, Tucker CM, Anaya C, Shizukuishi S, Lewis JP, Demuth DR, Lamont RJ.**

A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes.

Mol Microbiol 2008; 69: 1153–1164.

- **Marcotte H, Lavoie MC.**

Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A.

Microbiol Mol Biol Rev 1998 ; 62:71-109.

- **Marcotte L., Therien-Aubin H., Sandt C., Barbeau J. & Lafleur M.**

Solute size effects on the diffusion in biofilms of *Streptococcus mutans*.

Biofouling 20, 2004 ; 189–201.

- **Marsh P.D, Annette Moter, Deirdre A. Devine.**

Dental plaque biofilms: communities, conflict and control.

Periodontology 2000, 2011 ; Vol. 55, 2011, 16–35

- **Marsh PD, Martin MV.**

Oral microbiology, 5e édition. Edinburgh, UK: Churchill Livingstone, 2009. 222p.

- **Marsh PD.**

Are dental diseases examples of ecological catastrophes.

Microbiology 2003, 149:279-294.

- **Marsh PD.**

Host defenses and microbial homeostasis: role of microbial interactions.

J Dent Res 1989 ; 68: 1567–1575.

- **Marsh PD.**

Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment.

Oral Diseases 2003 ; 9 (Suppl. 1), 16–22.

**- Marsh Philip D.**

Dental plaque as a biofilm and a microbial community implications for health and disease.

BMC Oral Health 2006, 6(Suppl 1):S14 doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S14

**- Mathers DA, Leung WK, Fenno JC, Hong Y, McBride BC.**

The major surface protein complex of *Treponema denticola* depolarizes and induces ion channels in HeLa cell membranes.

Infect Immun 1996 ; 64:2904-2910.

**- Matsumoto-Nakano M., and H. K. Kuramitsu.**

Role of bacteriocin immunity proteins in the antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans*.

J. Bacteriol 2006 ; 188:8095–8102.

**- McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ.**

LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*.

J Bacteriol 2003 ; 185:274-284.

**- Mishra A, Wu C, Yang J, Cisar JO, Das A, Ton-That H.**

The *Actinomyces oris* type 2 fimbrial shaft FimA mediates co-aggregation with oral streptococci, adherence to red blood cells and biofilm development.

Mol Microbiol 2010 ; 77:841-854.

**- Morou-Bermudez, E., and R. A. Burne.**

Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*.

Infect. Immun 1999 ; 67: 504–512.

**- Nealson KH, Hastings JW.**

Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance.

Microbiol Rev 1979: 43: 496–518.

**- Nguyen T, Zhang Z, Huang IH, Wu C, Merritt J, Shi W, et al.**

Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*.

Microbiology 2009 ; 155:551-556.

**- Nobbs A.H., Jenkinson H.F., and Jakubovics N.S.**

Stick to Your Gums: Mechanisms of Oral Microbial Adherence.

J Dent Res 2011 ; 90(11):1271-1278.

- **Nobbs, A.H., Lamont, R.J. and Jenkinson, H.F.**  
Streptococcus adherence and colonization.  
Microbiol Mol Biol Rev 2009 ; 73: 407–450.
- **Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, Yamaguchi M, et al.**  
Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion.  
Biochem Biophys Res Commun 2010 ; 391:1192-1196.
- **Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE.**  
Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm in situ.  
J Bacteriol 2006 ; 188: 4117–4124.
- **Palmer RJ, Jr., Gordon SM, Cisar JO, Kolenbrander PE.**  
Coaggregation Mediated Interactions Of Streptococci And Actinomyces Detected In Initial Human Dental Plaque.  
J Bacteriol 2003 ; 185: 3400–3409.
- **Park Y, Simionato MR, Sekiya K, Murakami Y, James D, Chen W, Hackett M, Yoshimura F, Demuth DR, Lamont RJ.**  
Short fimbriae of Porphyromonas gingivalis and their role in coadhesion with Streptococcus gordonii.  
Infect Immun 2005: 73: 3983–3989.
- **Paster BJ, Bosches SK, Galvin JL et al.**  
Bacterial diversity in human subgingival plaque.  
J Bacteriol 2001 ; 183: 3770–3783.
- **Perisasamy S, Chalmers NI, Dû-Thumm L, Kolenbrander PE.**  
Fusobacterium nucleatum ATCC 10953 requires Actinomyces naeslundii ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes Streptococcus oralis 34.  
Appl Environ. Microbiol 2009 ; 75: 3250–3257.
- **Perisasamy, S. and Kolenbrander, P.E.**  
Central role of the early colonizer Veillonella sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel.  
J Bacteriol 2010 ; 192: 2965–2972.

- **Philip J. Warburton, Richard M. Palmer, Mark A. Munson and William G. Wade.**  
Demonstration of *in vivo* transfer of doxycycline resistance mediated by a novel transposon.

J. Antimicrob. Chemother. 2007 ; 60(5) : 973-980

- **Planet J. Paul, Helen C. Schreiner, Kathy Sinatra, Jeffrey B. Kaplan, David Furgang, Scott C. Kachlany, Brenda A. Perez, David H. Figurski, Daniel H. Fine**  
Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model.

2003 June 10; Proc Natl Acad Sci U S A. 100(12): 7295–7300.

- **Potempa, J., N. Pavloff, and J. Travis.**

*Porphyromonas gingivalis*: a protein/gene accounting audit.

Trends Microbiol 1995 ; 3:430–434.

- **Qi F, Chen P, Caufield PW.**

Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III bio- synthesis genes.

Appl Environ Microbiol, 1999 ; 65:3880-3887.

- **Qi F, Chen P, Caufield PW.**

The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlan- tibiotic bacteriocin, mutacin IV.

Appl Environ Microbiol 2001 ; 67:15-21.

- **Roberts Adam P., Jonathan Pratten, Michael Wilson, Peter Mullany**

Transfer of a conjugative transposon, Tn5397 in a model oral biofilm.

FEMS Microbiology Letters 177 (1999) 63-66

- **Robinson, C., Kirkham, J., Percival, R., Shore, R. C., Bonass, W. A., Brookes, S. J., Kusa, L., Nakagaki, H., Kato, K. & Nattress, B.**

A method for the quantitative site- specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed *in vivo*.

Caries Research 1997 ; 31, 194–200.

- **Rodney M. Donlan and J. William Costerton.**

Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms.

Clinical microbiology reviews 2002 ; p. 167–193.

- **Scannapieco, F. A.** Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit. Rev. Oral Biol. Med 1994 ; 5:203–248.

- **Sedlacek MJ, Walker C.**

Antibiotic resistance in an *in vitro* subgingival biofilm model.

Oral Microbiol Immunol 2007 ; 22:333-339.

- **Shao H, James DM, Lamont RJ, Demuth DR.**

Differential interaction of *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* LsrB and RbsB with autoinducer-2.

J Bacteriol 2007; 189: 5559–5565.

- **Silverman, R.J., Nobbs, A.H., Vickerman, M.M., Barbour, M.E. and Jenkinson, H.F.**

Interaction of *Candida albicans* cell wall Als3 protein with *Streptococcus gordonii* SspB adhesin promotes development of mixed-species communities.

Infect Immun 2010 ; 78: 4644–4652.

- **Siqueira WL, Helmerhorst EJ, Zhang W, Salih E, Oppenheim FG.**

Acquired enamel pellicle and its potential role in oral diagnostics.

Ann N Y Acad Sci 2007; 1098:504–509. [PubMed: 17435160]

- **Siqueira WL, Zhang W, Helmerhorst EJ, Gygi SP, Oppenheim FG.**

Identification of protein components in *in vivo* human acquired enamel pellicle using LC-ESI-MS/MS.

J Proteome Res 2007; 6:2152–2160. [PubMed: 17447804]

- **Slots, J., and R. J. Gibbons.**

Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and periodontal pockets.

Infect. Immun 1978 ; 19:254–264.

- **Socransky S, Haffajee A, Smith C et al.**

Use of checkerboard DNA–DNA hybridization to study complex microbial ecosystems.

Oral Microbiol Immunol 2004: 19: 352–362.

- **Socransky S.S., Haffajee A.D., C. M. A., C. Smith, and R. L. Kent, Jr.**

Microbial complexes in subgingival plaque.

J. Clin. Periodontol 1998 ; 25: 134–144.

- **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL.**

Microbial complexes in subgingival plaque.

J Clin Periodontol 1998: 25: 134–144.

- **Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J.**

New concepts of destructive periodontal disease.

J Clin Periodontol 1984 ; 1:21–32

- **Stoodley, P., Lewandowski Z., Boyle J. D., and. Lappin-Scott H. M.**

Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop.

Biotechnol. Bioeng 1998 ; 57:536–544.

- **Suzuki N., Yoshida A., Saito T., Kawada M., Nakano Y.**

Quantitative microbiological study of subgingival plaque by real-time PCR shows correlation between levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp.

J Clin Microbiol 2004 ; 42: 2255–2257.

- **Suzuki N., Yoneda M., Hirofuji T.**

Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis.

Published online 2013 March 6. Int J Dent. 2013; 2013: 587279.

- **Takahashi N, Ishihara K, Kato T, Okuda K.**

Susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to six antibiotics decreases as biofilm matures.

J Antimicrob Chemother 2007: 59: 59–65.

- **Takahashi, N.**

Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*.

Oral Microbiol. Immunol 2003 ; 18:109–113.

- **Takamatsu D, Bensing BA, Prakobphol A, Fisher SJ, Sullam PM.**

Binding of the streptococcal surface glycoproteins GspB and Hsa to human salivary proteins.

Infect Immun 2006 ; 74:1933-1940.

- **Takenaka S, Trivedi HM, Corbin A, Pitts B, Stewart PS.**

Direct visualization of spatial and temporal patterns of antimicrobial action within model oral biofilms.

Appl Environ Microbiol 2008: 74: 1869–1875.

- **Tang G, Kitten T, Munro CL, Wellman GC, Mintz KP.**

EmaA, a potential virulence determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in infective endocarditis.

Infect Immun 2008 ; 76:2316-2324.



- **Teughels W, Kinder Haake S, Sliepen I, Pauwels M, Van Eldere J, Cassiman JJ, Quirynen M.**

Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization.

J Dent Res. 2007 ; 86(7):611-7.

- **Thurnheer T, van der Ploeg JR, Giertsen E, Guggenheim B.**

Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro.

Caries Res 2006;40:163–71.

- **Tong, H., W. Chen, J. Merritt, F. Qi, W. Shi, and X. Dong.**

*Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition.

Mol. Microbiol 2007 ; 63:872–880.

- **Tribble, G. D., G. J. Lamont, A. Progulske-Fox, and R. J. Lamont.**

Conjugal transfer of chromosomal DNA contributes to genetic variation in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*.

J. Bacteriol 2007 ; 189:6382–6388.

- **Van der Ploeg JR.**

Regulation of bacteriocin production in *Streptococcus mutans* by the quorum-sensing system required for development of genetic competence.

J Bacteriol 2005 ; 187: 3980–3989.

- **Van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, Teughels W, Quirynen M, Busscher HJ, Van der Mei HC.**

Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains.

Oral Microbiol Immunol. 2008 ; 23(1):43-8.

- **Van Steenberghe TJM, van Winkelhoff AJ, de Graaff J. Pathogenic synergy.**

Mixed infections in the oral cavity.

Antonie Van Leeuwenhoek 1984 ; 50: 789–798.

- **Vesey, P. M., and H. K. Kuramitsu.**

Genetic analysis of *Treponema denticola* ATCC 35405 biofilm formation.

Microbiology 2004 ; 150:2401–2407.

- **Walker C, Sedlacek MJ.**

An in vitro biofilm model of subgingival plaque.

Oral Microbiol Immunol 2007: 22: 152–161.

- **Walter L. Siqueira and Frank G. Oppenheim.**

Small Molecular Weight Proteins/Peptides Present in the in vivo formed Human Acquired Enamel Pellicle.

*Arch Oral Biol.* 2009 May ; 54(5): 437–444. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.01.011.

- **Wang BY, Chi B, Kuramitsu HK.**

Genetic exchange between *Treponema denticola* and *Streptococcus gordonii* in biofilms.

*Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 108–112.

- **Wang B.Y., and Kuramitsu H. K.**

Interactions between oral bacteria: inhibition of *Streptococcus mutans* bacteriocin production by *Streptococcus gordonii*.

*Appl. Environ. Microbiol* 2005 ; 71:354–362.

- **Warburton PJ, Palmer RM, Munson MA, Wade WG.**

Demonstration of in vivo transfer of doxycycline resistance mediated by a novel transposon.

*J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(5):973-80.

- **Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE.**

Mechanisms of adhesion by oral bacteria.

*Annu Rev Microbiol* 1996 ; 50: 513–552.

- **Wilson M.**

Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents.

*J Med Microbiol* 1996 ; 44: 79–87.

- **Wright C.J., Burns L.H., Jack A.A., Back C.R., Dutton L.C., Nobbs A.H., Lamont R.J. and Jenkinson H.F.**

Microbial interactions in building of communities.

*Mol. Oral Microbiol.* 2013 ; 28(2) : 83-101

- **Xie H, Cook GS, Costerton JW, Bruce G, Rose TM, Lamont RJ.**

Intergeneric communication in dental plaque biofilms.

*J Bacteriol* 2000; 182: 7067–7069.

- **Xie H, Lin X, Wang BY, Wu J, Lamont RJ.**

Identification of a signalling molecule involved in bacterial intergeneric communication.

*Microbiology* 2007 ; 153: 3228–3234.

- **Xu P, Alves JM, Kitten T et al.**

Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*.

J Bacteriol 2007 ; 189: 3166–3175.

- **Yeung, M. K.**

Molecular and genetic analysis of *Actinomyces* species.

Oral Biol. Med 1999 ; 10:120–138.

- **Zijngel V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, et al.**

Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth.

PLoS ONE 5(2) 2010 ; e9321. doi:10.1371/journal.pone.000932

**HOUVION Elodie** – Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés

Nancy 2013: f: 26; tble: 7; p :129

Th : Chir-Dent : Nancy 2014

Mots-Clés : biofilm, bactérie, co-agrégation, mutualisme, compétition, quorum sensing, résistance

**HOUVION Elodie** – Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés

Th : Chir-Dent : Nancy 2014

Le biofilm dentaire se compose d'espèces bactériennes différentes qui prolifèrent au sein d'une matrice extra cellulaire polysaccharidique. Le biofilm, selon qu'il se localise en supra ou sous gingival, présente des variations touchant tant les espèces bactériennes (aérobies/anaérobies) que les gradients de pH, oxygène... Ce biofilm est directement responsable de maladies buccodentaires telles que la carie ou la parodontite.

La colonisation bactérienne des dents s'effectue dès l'adsorption des protéines d'origine salivaire à la surface de l'émail. Dès lors, différentes espèces bactériennes adhéreront selon un ordre particulier régi par des affinités de récepteurs. Suite au développement du biofilm, il apparaîtra des co-agrégation homo et/ou hétérotypiques.

Les bactéries ainsi agencées vont pouvoir interagir entre elles par des mécanismes de synergie ou de compétition, notamment pour la gestion des nutriments et des métabolites mais aussi pour les sites d'adhérence. Elles communiquent entre elles par des signaux chimiques, comme les auto-induceurs, selon un mécanisme appelé quorum sensing. La biodiversité intrinsèque du biofilm permet des synergies bactériennes qui améliorent leur résistance à certains facteurs de stress tels que la variation de pH, mais aussi facilite des transferts de gènes lui conférant des résistances à certains antibiotiques et l'acquisition de facteurs de virulence.

Ainsi, la compréhension de ces différents systèmes de communication va permettre d'adapter les traitements visant à éliminer le biofilm et la mise au point de nouvelles molécules pour inhiber celui-ci.

**JURY**

PR. C. STRAZIELLE

Professeur des universités

Président

DR. C. BISSON

Maître de conférences

Juge

DR. C. ALAUZET

MCU-PH en bactériologie

Juge

DR. N. PAOLI

Assistante hospitalo-universitaire

Juge

**HOUVION Elodie**

**21 Ruelle des loups**

**88130 CHARMES**