



HAL
open science

Étude expérimentale de l'action de trois édulcorants sur deux bactéries buccales potentiellement cariogènes

Mathieu Sallaberry

► **To cite this version:**

Mathieu Sallaberry. Étude expérimentale de l'action de trois édulcorants sur deux bactéries buccales potentiellement cariogènes. Chirurgie. 2015. dumas-01220450

HAL Id: dumas-01220450

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01220450>

Submitted on 26 Oct 2015

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.

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2015

N° 65

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Par Monsieur Mathieu SALLABERRY

Né le 8 Janvier 1988 à Libourne

Le 13 octobre 2015

**ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ACTION DE TROIS
EDULCORANTS SUR DEUX BACTERIES BUCCALES
POTENTIELLEMENT CARIOGENES**

Directeur de thèse

Madame le Docteur Cécile BADET

Membres du Jury

Président	Madame V. DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Madame C. BADET	Maître de Conférence des Universités
Rapporteur	Madame J. NANCY	Maître de Conférence des Universités
Assesseur	Madame D. NGUYEN	Assistant Hospitalo-Universitaire

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2015

N° 65

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Par Monsieur Mathieu SALLABERRY

Né le 8 Janvier 1988 à Libourne

Le 13 octobre 2015

**ETUDE EXPERIMENTALE DE L'ACTION DE TROIS
EDULCORANTS SUR DEUX BACTERIES BUCCALES
POTENTIELLEMENT CARIOGENES**

Directeur de thèse

Madame le Docteur Cécile BADET

Membres du Jury

Président	Madame V. DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Madame C. BADET	Maître de Conférence des Universités
Rapporteur	Madame J. NANCY	Maître de Conférence des Universités
Assesseur	Madame D. NGUYEN	Assistant Hospitalo-Universitaire

UNIVERSITE DE BORDEAUX

Président M. Manuel TUNON de LARA

Directeur de Collège des Sciences de la Santé M. Jean-Luc PELLEGRIN

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Directrice	Mme Caroline BERTRAND	58-02
Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale	Mme Dominique ORIEZ	58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M. J-Christophe FRICAIN	57-02
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales	M. J-François LASSERRE	58-02

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme Caroline BERTRAND	Prothèse dentaire	58-02
Mme Marie-José BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Véronique DUPUIS	Prothèse dentaire	58-02
M. Jean-Christophe FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme Elise ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme Cécile BADET	Sciences biologiques	57-03
M. Etienne BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Michel BARTALA	Prothèse dentaire	58-02
M. Cédric BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Jean-Pierre BLANCHARD	Prothèse dentaire	58-02

M. Christophe BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme Sylvie BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Sylvain CATROS	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Stéphane CHAPENOIRE	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Jacques COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Reynald DA COSTA NOBLE	Parodontologie	57-01
M. François DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. François DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Yves DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Raphael DEVILLARD	Odontologie conservatrice- Endodontie	58-01
M. Emmanuel D'INCAU	Prothèse dentaire	58-02
M. Bruno ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Dominique GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François LASSERRE	Prothèse dentaire	58-02
M. Yves LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme Odile LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-02
M. Jean-Marie MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme Javotte NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme Dominique ORIEZ	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François PELI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Philippe POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Patrick ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Johan SAMOT	Sciences biologiques	57-03
Mme Maud SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Cyril SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme Noélie THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M. Eric VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Mme Audrey AUSSEL	Sciences biologiques	57-03
M. Terence BARSBY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme Aurélie BARSBY- EL-KHODER	Prothèse dentaire	58-02
M. Julien BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu CLINKEMAILLIE	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M. Guillaume CRESTE	Prothèse dentaire	58-02
Mme Clarisse DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Hélène DENOST	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Guillaume FENOUL	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme Elsa GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Nicolas GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme Sandrine GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Olivia KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
Mme Alice LE NIR	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme Karine LEVET	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Alexandre MARILLAS	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Matthieu MEYER	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme Darrène NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
Mme Virginie PANNEREC	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme Chloé PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Candice PEYRAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Jean-Philippe PIA	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu PITZ	Parodontologie	57-01
M. Clément RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. François VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

A notre Présidente de thèse

Madame le professeur Véronique DUPUIS
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Sous-section Prothèse dentaire 58-02

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Voyez en ce travail l'expression de ma sincère considération et de mes remerciements les plus respectueux.

A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Cécile BADET
Maitre de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
Sous-section Sciences biologiques 57-03

Je vous remercie d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Merci infiniment pour votre disponibilité, vos conseils et votre soutien tout au long de la réalisation de ma thèse. Travailler à vos côtés pendant près de deux ans a été un vrai plaisir !

A notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Javotte NANCY
Maitre de Conférence des Universités - Praticien Hospitalier
Sous-section Odontologie pédiatrique 56-01

Je vous remercie d'avoir accepté de lire et relire ma thèse afin de traquer les erreurs et fautes de frappe résiduelles, et ce, en un laps de temps très court. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.

A notre Assesseur

Madame le Docteur Darrène NGUYEN
Docteur en Chirurgie Dentaire - Assistant Hospitalo-Universitaire
Sous-section Sciences biologiques 57-03

Je te remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Merci également pour tes conseils et ta bonne humeur au laboratoire ! Reçois ici toute ma gratitude.

A Ajinomoto Co, Inc

A Stéphanie MOUTON et Jean-François CORREIA

Merci de nous avoir offert un échantillon d'aspartame pour nos études. Sans vous, les expérimentations sur l'aspartame n'auraient pas pu être réalisées. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance.

A Martine

Merci pour ta gentillesse et ton aide au laboratoire. Et merci de t'être occupée de mes petites bactéries durant mes absences !

A mes parents

Maman, Papa, merci du fond du cœur pour tout ce que vous avez fait pour moi. C'est grâce à vous que j'ai pu faire ces (longues..) études, et je sais que cela n'a pas été facile pour vous. Merci pour l'éducation et les valeurs que vous m'avez transmises, merci pour votre confiance, votre soutien, et votre amour. Merci infiniment d'avoir contribué à faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime !

A ma famille

A mon frère, mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines. On ne choisit pas sa famille mais je n'échangerai la mienne pour rien au monde ! Même s'il est de plus en plus difficile de se voir, vous aurez toujours une place dans mon cœur !

A ma belle-famille

A Jacqueline, Marc et Patrice, que je considère aujourd'hui comme ma famille. Merci pour votre gentillesse, toutes vos attentions et votre sympathie !

A mes amis

A tous mes proches et en particulier à la DT ! La fine équipe que j'ai rencontrée il y a de ça maintenant 9 ans ! Merci pour votre amitié et tous ces bons moments qui resteront gravés dans ma mémoire !

Au Dr Lecocq Frédéric

Merci pour ton accueil chaleureux, ton soutien et ton aide précieuse (surtout quand le stress commence à monter !). Et merci à Sylvie pour ses bons petits plats du midi qui nous redonnent de l'énergie !

A Sonia

Sonia, ma meilleure amie, la femme de ma vie et maintenant la mère de mon futur enfant. Merci de ton soutien indéfectible durant toutes ces années, je sais que je peux compter sur toi dans les moments les plus difficiles. Et c'est avec toi que j'ai partagé les moments les plus agréables. Merci pour tout, je t'aime !

Table des matières

Introduction	1
Première partie : CARIOLOGIE	2
I - L'hôte	3
1. Facteurs génétiques et maturation des tissus dentaires	3
2. Facteurs de défense.....	3
3. Facteurs de rétention de plaque.....	4
II- Les bactéries cariogènes	5
1. Ecosystème buccal.....	5
2. Métabolisme des glucides.....	7
3. Adhérence / formation du biofilm.....	7
4. Production d'acides.....	10
5. Bactéries cariogènes étudiées : <i>Streptococcus mutans</i> et <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	12
III - L'alimentation et les glucides :	18
1. Généralités	18
2. Nature du sucre.....	19
3. Quantité de sucres ingérés.....	20
4. Fréquence d'ingestion.....	21
IV - Les édulcorants : une solution ?	22
1. Acésulfame K (E950)	22
2. Sucralose (E955)	24
3. Aspartame (E951).....	25
Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE	27
I - Matériel	27
1. Souches bactériennes	27
2. Milieux de culture	28
3. Edulcorants et sucres	29
II - Méthode	30
1. Culture over-night.....	30
2. Croissance bactérienne.....	30
3. Production d'acidité.....	31
4. Adhérence.....	31

III - Résultats	33
1. Croissance bactérienne.....	33
2. Production d'acidité.....	37
3. Adhérence.....	41
IV - Analyse et discussion	43
Conclusion	46
Bibliographie	47
Annexes	50
Annexe 1 : Fiches produits des édulcorants utilisés	50
Annexe 2 : Résultats des mesures de ph détaillés	54

Introduction

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime à 5 milliards le nombre de personnes dans le monde présentant des lésions carieuses, classant la carie au rang de 3^e fléau mondial, après les maladies cardio-vasculaires et le cancer. [1]

Certains glucides, dits fermentescibles, présents dans notre alimentation sont impliqués dans la formation de ces lésions. En effet, des bactéries buccales, comme *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus* ont la capacité d'utiliser ces glucides, pour produire leur énergie, grâce à un processus de fermentation. Les produits du métabolisme de ces glucides, des acides, sont alors excrétés dans le milieu environnant, conduisant à une déminéralisation des tissus dentaires. [2-3]

L'un des objectifs des programmes de prévention bucco-dentaire pourrait être de remplacer ces glucides fermentescibles par des agents sucrants non-fermentescibles (les édulcorants). [4] Ces édulcorants sont également appréciés en substitution aux sucres dans les régimes alimentaires des diabétiques et dans les produits dits « lights ».

En effet, ils présentent l'avantage de donner un goût sucré aux aliments, tout en évitant une hausse de la glycémie et en ayant un apport calorique très faible.

Leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire est de plus en plus fréquente, parfois même en association avec des glucides fermentescibles. [5]

Enfin, ils sont de plus en plus utilisés pour remplacer le saccharose dans les médicaments.

De nombreuses études existent sur l'intérêt des édulcorants de charges, notamment le xylitol et le sorbitol, dans la prévention des caries. [6-7] Cependant, les travaux concernant les édulcorants intenses (comme l'acésulfame K, le sucralose et l'aspartame) sont plus rares.

Dans ce contexte, l'objectif de notre étude est de déterminer expérimentalement l'impact de ces trois édulcorants sur la croissance, la production d'acides ainsi que la capacité d'adhérence de *S. mutans* et *L. rhamnosus*.

La première partie de cette thèse sera consacrée aux mécanismes du processus carieux, dont l'étiologie est multiple et complexe. Les deux bactéries utilisées ainsi que les trois édulcorants étudiés seront également présentés.

Dans la seconde partie, le matériel et les méthodes employés seront détaillés, suivis des résultats et de leur analyse.

Première partie : CARIOLOGIE

L'OMS a défini la carie comme étant « un processus pathologique localisé, d'origine externe, apparaissant après l'éruption des dents, qui s'accompagne d'un ramollissement des tissus durs et évoluant vers la formation d'une cavité » [1]

Cette cavité se forme suite à la déminéralisation des tissus dentaires (émail puis dentine) par les acides excrétés par les bactéries présentes dans le milieu buccal environnant. [3]

Il se produit une alternance de phases de déminéralisation et de reminéralisation des tissus durs. Ce processus, dans un premier temps réversible, devient irréversible lorsque la balance déminéralisation/reminéralisation est déséquilibrée de façon durable dans le temps. [3]

Le processus carieux est complexe et son étiologie est multifactorielle. Elle met en jeu un nombre considérable de facteurs regroupés en 3 familles : l'hôte, les bactéries, et les glucides, interagissant à travers le temps. [2]

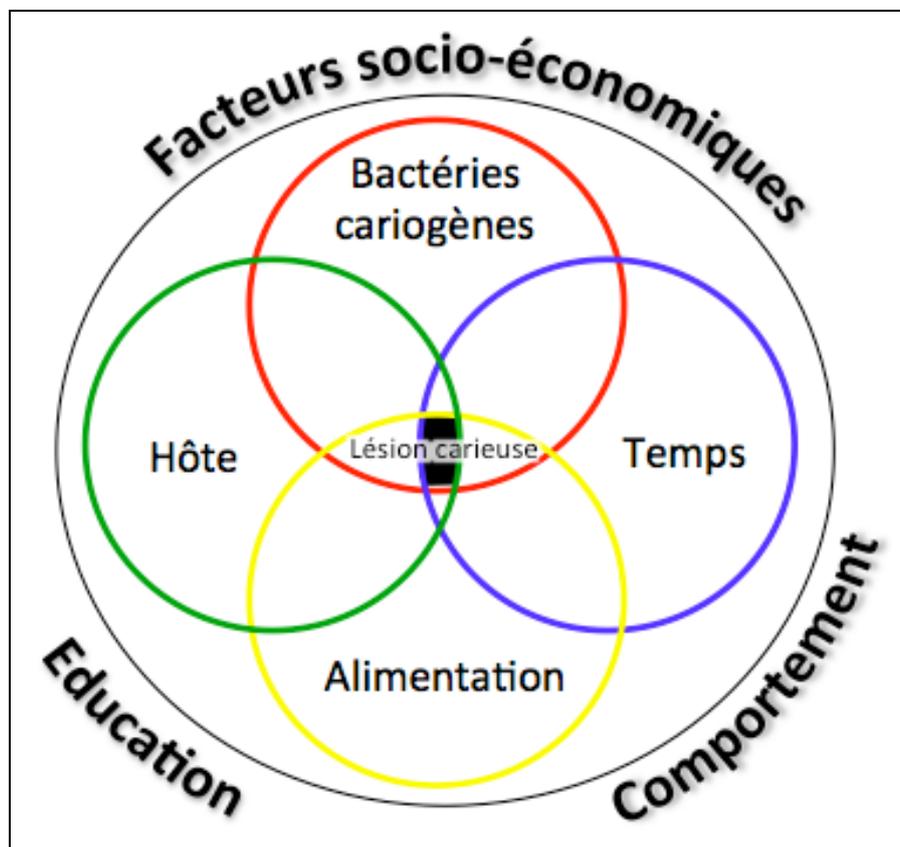


Figure 1 – Schéma de Keyes, modifié par Newbrun et revu par Reisine et Douglas [8]

I - L'hôte

Chaque individu possède un terrain particulier, déterminé par son patrimoine génétique d'une part et par son environnement d'autre part ; et concernant la santé orale en particulier, par la mise en place ainsi que par la préservation des structures bucco-dentaires.

Tous ces éléments vont jouer un rôle dans le déroulement du processus carieux (en le freinant ou au contraire en le favorisant).

1. Facteurs génétiques et maturation des tissus dentaires [2-3]

La qualité des tissus dentaires (en particulier de l'émail) impacte directement sur leur résistance aux attaques acides. Après l'éruption de la dent au sein de la cavité buccale, l'émail entre en phase de maturation. Durant cette période, l'émail immature reste fragile.

En outre certaines pathologies (héréditaires ou acquises) peuvent entraîner des anomalies de structures permanentes, installant cette faiblesse de façon durable dans le temps.

De plus, ces défauts de structure entraînant des irrégularités de surface vont favoriser la rétention de la plaque dentaire et la colonisation bactérienne.

2. Facteurs de défense [2-3]

La salive joue un rôle crucial dans la protection des tissus buccaux.

Elle contient un nombre important de protéines à action bactéricide (mucines, lysozyme, peroxydases, lactoferrine, histamines, défensines, cathélicidines ...). Ces substances antimicrobiennes ont une action non spécifique.

Des immunoglobulines, dotées d'une action spécifique pour une espèce bactérienne donnée, sont aussi présentes dans la salive.

La salive exerce également un pouvoir tampon grâce aux carbonates, aux phosphates et à certaines protéines, entraînant une remontée du pH buccal.

Enfin, la salive constitue une réserve d'ions (calcium, phosphates, fluor), indispensable au processus de reminéralisation de l'émail.

Une réduction du flux salivaire entraîne une diminution de la défense contre les bactéries cariogènes et favorise leur métabolisme en milieu acide.

Cette baisse est observée durant la phase de sommeil mais peut également être due à certaines pathologies (xérostomie, aplasie, sclérodermie, syndrome de Sjögren...) ainsi qu'à certaines thérapeutiques (irradiation des glandes salivaires, anxiolytiques, diurétiques...).

3. Facteurs de rétention de plaque [2-3]

Tout élément favorisant la rétention de la plaque dentaire (malpositions dentaires, restaurations iatrogènes, appareillage d'orthodontie..) entraîne des conditions favorables aux bactéries cariogènes.

De même, une élimination insuffisante de la plaque dentaire (handicaps, fréquence de brossage insuffisante, technique inadéquate..) est un élément en faveur du processus carieux.

Dans le cadre de cette thèse, orientée vers l'étude du comportement des bactéries cariogènes en présence d'édulcorants intenses, ces caractéristiques propres à chaque individu ne sont pas prises en compte.

II- Les bactéries cariogènes

1. Ecosystème buccal [2]

Le corps humain est composé d'environ 10^{13} cellules, et coexiste avec plus de 10^{14} micro-organismes.

Dans le milieu buccal, on compte plus de 700 espèces bactériennes différentes qui cohabitent, il s'agit de la flore dite commensale, compatible avec l'état de santé bucco-dentaire. Les bactéries pathogènes spécifiques y sont relativement rares.

La carie dentaire ainsi que la majorité des parodontopathies sont la conséquence d'un déséquilibre au sein de l'écosystème buccal, menant à la prédominance d'une ou de plusieurs espèces bactériennes.

Tous les organismes de cet écosystème sont dépendants du milieu abiotique (nutriments, pH..) mais sont aussi dépendants les uns des autres.

Une véritable compétition s'installe entre les différentes espèces, mais également au sein de chaque espèce afin de s'approprier l'espace et les ressources disponibles.

La prédominance d'une espèce sur les autres va avoir deux conséquences principales :

- le rejet en abondance de produits métaboliques (dont des acides)
- la diminution voire la disparition d'autres populations bactériennes, entraînant une diminution de la lutte inter-espèces et favorisant l'accroissement de la population dominante.

La croissance d'une population bactérienne est donc corrélée à sa capacité à s'adapter à certaines conditions de façon plus optimale que les autres.

Conditions physiques :

- **Température** : elle est en moyenne de 37°C dans le milieu buccal, mais présente des variations qui peuvent différer d'un site anatomique à l'autre. Par exemple, elle oscille et entre 30 et 38°C au niveau du sillon gingival. Ceci a un impact sur le type de population bactérienne rencontrée au niveau de ces sites.

La grande majorité des bactéries buccales sont mésophiles, leur croissance est optimale entre 25 et 40°C .

- **Humidité** : dans des conditions classiques, le milieu buccal est saturé en humidité. Une baisse du flux salivaire (hyposialie voire asialie) entraîne une modification considérable de la flore buccale.

- **pH** : la croissance optimale de la majorité des bactéries buccales se fait entre un pH de 6

et 7,8. Il existe également des variations de pH en fonction du site anatomique observé. Au niveau des poches parodontales, il est plus alcalin. Au contraire, les zones dentaires au niveau desquelles un processus de carie est en cours revêtent un pH plus acide, entraînant une sélection parmi les espèces bactériennes présentes. Les bactéries cariogènes sont dites acidophiles, elles prospèrent dans un milieu où le pH est inférieur à 5,5 (niveau d'acidité à partir duquel l'émail dentaire se déminéralise de façon irréversible).

- **Potentiel d'oxydo-réduction** : il s'agit de la faculté du milieu à capter ou à libérer des électrons. L'oxygène est très facilement réduit (entraînant une oxydation du milieu) et très présent en bouche. Les variations de sa concentration entraînent des variations de l'oxydation du milieu, et donc une sélection des espèces présentes. Ce potentiel d'oxydo-réduction s'exprime en mV. A titre d'exemple, ce potentiel est de +200mV à la surface de l'émail (favorisant les bactéries aérobies) contre -300mV au niveau des poches parodontales, où la concentration en oxygène peut tomber à 1 ou 2% (favorisant les bactéries anaérobies).

- **Gaz** : les variations de concentration de certains gaz au niveau des sites anatomiques ont également un impact sur la croissance des bactéries. L'oxygène, le CO₂ mais également les composés sulfurés volatils rejetés par les bactéries ont un pouvoir nocif ou avantageux en fonction de l'espèce bactérienne.

Conditions nutritionnelles :

La croissance d'une population bactérienne dépend également des ressources nutritionnelles disponibles. Ces ressources sont renouvelées de façon endogène ou exogène.

Les éléments endogènes proviennent des tissus de l'hôte (acides aminés, protéines), de la salive et du fluide gingival (vitamines, facteurs de croissance).

Les apports exogènes proviennent essentiellement des aliments ingérés par l'individu (en particulier les sucres fermentescibles).

A cela s'ajoutent les métabolites rejetés par certaines bactéries et qui vont être utilisés par d'autres.

Facteurs d'inhibition :

Comme vu précédemment, un grand nombre de facteurs peuvent inhiber la croissance bactérienne. La salive et le fluide gingival jouent un rôle important dans la régulation de cette croissance par un pouvoir tampon qui alcalinise le milieu ainsi que par l'apport des nombreux facteurs bactéricides (voir partie I : l'hôte). La compétition inter- et intra-espèces est le 2^e mécanisme de régulation des populations bactériennes.

2. Métabolisme des glucides [2-3]

Les bactéries cariogènes ont la capacité de métaboliser les glucides fermentescibles issus de l'alimentation.

Le transport intracellulaire des glucides est possible grâce à deux systèmes :

- un système de transport actif, lorsque l'apport en glucide est abondant.

Des protéines de transport (perméases) permettent le passage du glucide à travers la membrane. Ce système (force proton-motrice) utilise l'adénosine triphosphate (ATP), produit lors de la glycolyse.

- un système par phosphorylation, lors d'une pénurie en glucides.

Le glucide est ici transporté à l'intérieur de la cellule sous forme de sucre-phosphate, suite à l'action d'un système phosphotransférase (PTS), composé de protéines et d'enzymes cytoplasmiques et membranaires. L'énergie et le phosphate utilisés ici proviennent d'un phospho-énol-pyruvate (PEP), produit intermédiaire de la glycolyse.

Une fois à l'intérieur de la cellule bactérienne, le glucide peut être :

- utilisé directement pour créer de l'énergie par la voie de la glycolyse (voie d'Embden Meyerhof), produisant des déchets acides.

- stocké sous forme de polysaccharides intracellulaires (polymères de glucose et de fructose), pouvant être décomposés en molécules de sucres simples lors d'une pénurie en sucres exogènes.

- utilisé pour créer des polysaccharides extracellulaires (permettant l'adhésion aux tissus durs ainsi qu'aux autres bactéries).

3. Adhérence / formation du biofilm

L'adhérence est la capacité d'une bactérie à se fixer à un substrat. Il s'agit d'un phénomène actif, mettant en jeu des liaisons fortes, contrairement à la rétention qui est un phénomène passif.

Les bactéries cariogènes (et en particulier *S. mutans*) synthétisent à partir du saccharose des polysaccharides extracellulaires (glucanes et fructanes) grâce à aux enzymes glycosyltransférase et fructosyltransférase. [3]

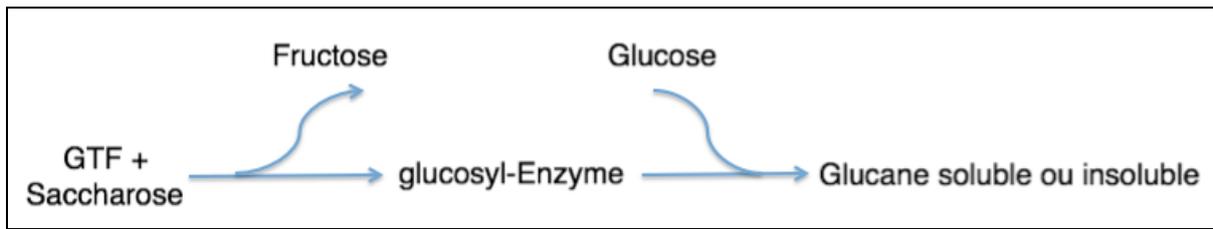


Figure 2 – Synthèse de Glucane à partir de Saccharose [2]

Ces polysaccharides forment un réseau (appelé glycocalyx) fortement adhésif aux surfaces dentaires par le biais d'interactions spécifiques de type enzymes-substrats.

Les *fimbriae*, appendices extracellulaires composés de sous-unités protéiques disposées en hélices, sont responsables d'un autre type d'interaction, de type ligand-récepteur, due à la présence de protéines appelées adhésines sur les chaînes glycoprotéiques latérales des *fimbriae*. [3]

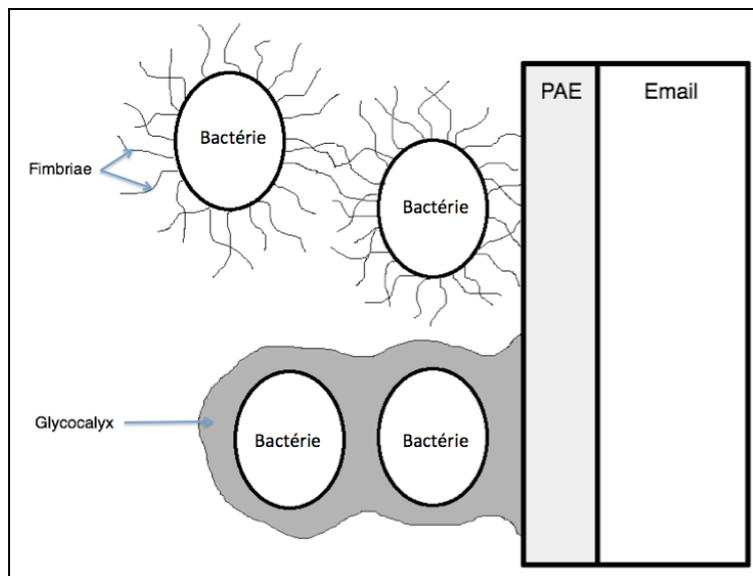


Figure 3 – Adhérence bactérienne aux tissus dentaires grâce aux *fimbriae* et au glycocalyx [2]

Dans la cavité buccale, trois types de substrats sur lesquelles les bactéries peuvent adhérer sont présents :

- la surface dentaire (émail, ciment)
- la surface des cellules épithéliales (moins stable en raison de la desquamation des cellules les plus superficielles)
- la surface de bactéries déjà en place.

Cette propriété d'adhérence est primordiale car il s'agit d'une condition obligatoire aux

bactéries pour pouvoir se multiplier et créer ainsi des colonies. Elle détermine si une espèce bactérienne est de passage dans le milieu buccal ou si elle peut s'installer de façon durable. [3]

Cette capacité à se fixer à leur environnement va permettre aux bactéries de créer un biofilm, appelé plaque dentaire.

Ce biofilm est constitué d'une matrice, fortement hydratée, riche en nutriments, qui enveloppe plusieurs centaines d'espèces de bactéries.

Il se forme selon un processus en 5 étapes : [2-3]

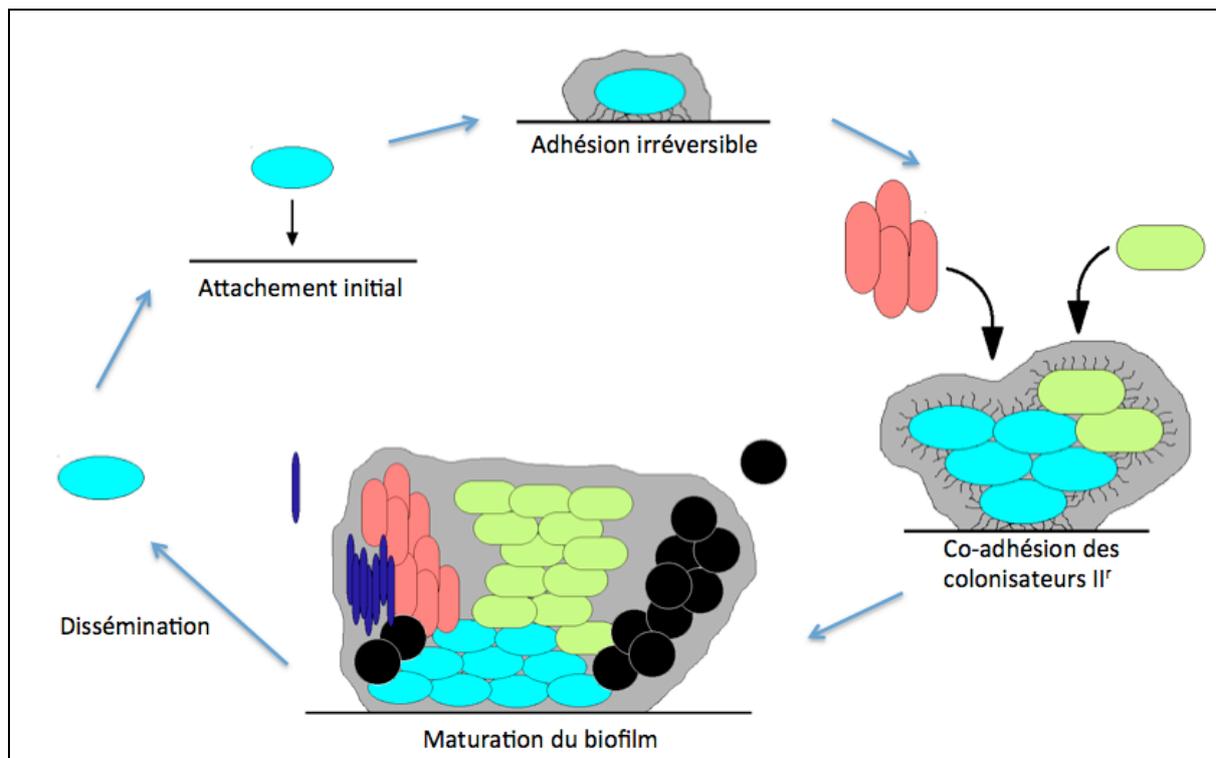


Figure 4 – Formation du biofilm [2]

- Attachement réversible des colonisateurs primaires.

Il est dû à un déséquilibre dans les interactions non spécifiques entre la bactérie et la surface proche, lorsque les forces attractives (hydrophobie) sont supérieures aux forces répulsives (électrostatisme et agitation brownienne). La bactérie se rapproche de la surface à coloniser.

- Adhésion irréversible.

Cet attachement peut être temporaire mais peut également entraîner l'expression de facteurs responsables de l'adhérence chez certaines bactéries, dites pionnières.

A la surface des dents, une fine couche organique appelé Pellicule Acquise Exogène (PAE) se forme naturellement et spontanément par absorption sélective de glycoprotéines salivaires.

L'adhésion des bactéries pionnières est renforcée par l'interaction entre les glycoprotéines de la PAE et les adhésines des *fimbriae*. Les bactéries, désormais maintenues à proximité de la surface dentaire, également sécrètent une matrice de biopolymères (glycocalyx) qui comble l'espace entre celles-ci et le substrat, rendant l'adhésion irréversible.

- Agrégation de micro colonies.

Par la suite, les adhésines permettent une co-adhésion avec d'autres micro-organismes, appelés colonisateurs secondaires. La masse de bactéries constituant le biofilm augmente alors peu à peu.

- Maturation du biofilm.

Ces adhésions inter-espèces sont régies par des récepteurs spécifiques, ce qui entraîne une hiérarchisation au sein du biofilm en fonction des affinités entre espèces bactériennes. Durant la phase de maturation, le biofilm devient une structure tridimensionnelle complexe constituée de différents agrégats bactériens, reliés entre eux par des canaux internes et pores, dans lesquels circulent de l'eau et des nutriments (captés du milieu extérieur ou produits par les bactéries).

Cette structure évolue à travers le temps en fonction des conditions physico-chimiques externes et des métabolismes bactériens.

- Dissémination des cellules du biofilm.

Ainsi, certains agrégats bactériens se détachent du biofilm lorsque les conditions environnementales ne seront plus en leur faveur et adhèrent à d'autres bactéries pionnières à un autre niveau de la cavité buccale, relançant le processus de formation du biofilm.

L'adhérence est donc un facteur essentiel à la colonisation bactérienne, en permettant aux bactéries buccales de s'agréger et de créer un milieu propice à leur développement.

4. Production d'acides

Les glucides peuvent également être utilisés directement par la bactérie afin de créer de l'énergie sous forme d'ATP.

Pour cela, ces molécules sont dégradées en pyruvate lors de la glycolyse (par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof et/ou par la voie hétérofermentaire des pentoses phosphate. [3, 9]

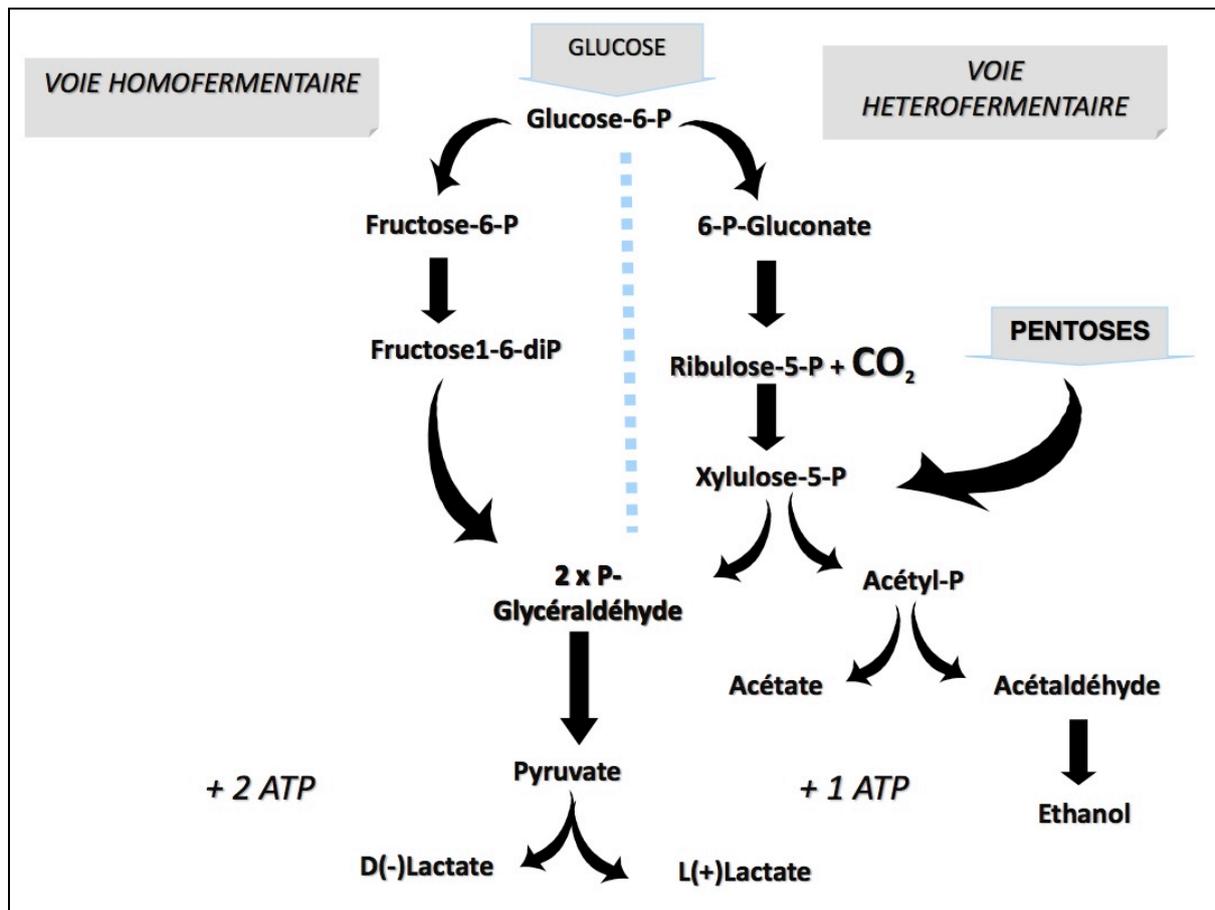


Figure 5 – Glycolyse homofermentaire et hétérofermentaire (d'après C. Badet) [9]

En contrepartie de cette production d'énergie, des déchets métaboliques sont générés, sous forme d'acides. Ces acides (acide lactique, butyrique, acétique, propionique...) varient en fonction des espèces bactériennes présentes dans la plaque dentaire.

Tous ces acides sont responsables de la déminéralisation des tissus durs dentaires.

Toutefois, l'acide lactique (produit par *S. mutans* et *L. rhamnosus*), est le plus déminéralisant. Les ions acides (H⁺) qui ont pénétré dans les structures de l'émail entraînent la dissolution du calcium et du phosphate des cristaux d'hydroxyapatite.

La déminéralisation devient irréversible lorsque le pH atteint une valeur critique de 5,5.

Le biofilm et la salive vont peu à peu être saturés en ions phosphate et calcium, ce qui fait remonter le pH, avec l'aide du pouvoir tampon de la salive.

Une fois le pH revenu à un niveau neutre, ces ions vont précipiter à la surface de l'émail, favorisant la reminéralisation.

Au niveau de la dentine, la lyse du tissu se fait plus rapidement étant donné sa moindre minéralisation et sa plus grande perméabilité en raison des milliers de *tubuli* qui la traversent. De plus, la surface dentinaire n'est pas en contact direct avec la salive et ne bénéficie donc

pas de son pouvoir tampon. [2]

La nature des sucres ingérés par l'individu influence également sur la vitesse de progression du processus carieux. Cette différence entre les sucres sera développée dans la partie III – L'alimentation et les glucides.

5. Bactéries cariogènes étudiées : *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*

Pour cette thèse expérimentale, nous avons choisi deux bactéries dont le rôle est majeur respectivement dans la mise en place et la progression du processus carieux :

- *Streptococcus mutans* (impliquée dans l'étape initiale d'adhésion irréversible)
- *Lactobacillus rhamnosus* (impliquée dans la suite du processus carieux, lorsque la lésion atteint le tissu dentinaire). [2-3]

Ces deux bactéries font partie du groupe des bactéries lactiques caractérisées par la capacité à dégrader les glucides en acide lactique. [9]

→ *Streptococcus mutans* :

Les streptocoques du groupe *mutans* appartiennent à la famille des *Streptococcaceae*, rassemblant plus de 95 espèces.

Cette famille regroupe les cocci à Gram positif, non sporulés, non capsulés, immobiles, dépourvus de catalase et d'oxydase, ne réduisant pas les nitrates et résistant aux aminosides. Ils ont une forme de cocci ovoïdes ou sphériques dont le diamètre varie entre 0,5 et 2 µm.

Leur division cellulaire dans un seul plan, avec une séparation incomplète forme des chainettes de longueurs variables (de 2 à plus de 50 éléments). [2]

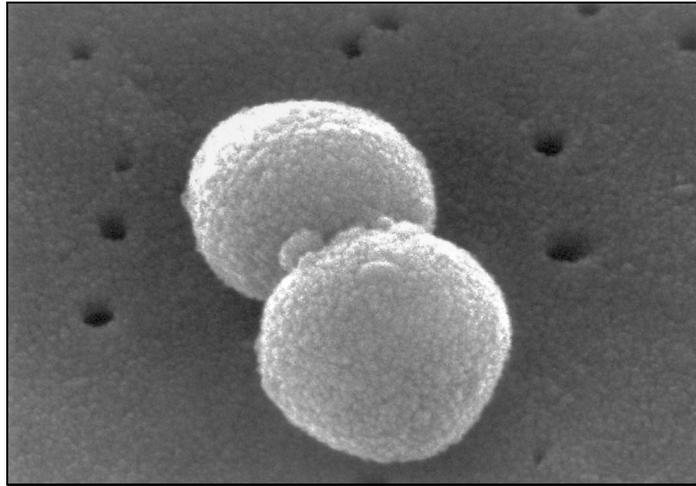


Figure 6 – Vue de *Streptococcus* au microscope électronique à balayage
(image libre de droit disponible à l'adresse suivante :
http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13518330618009)

Plusieurs méthodes de classifications des espèces au sein de cette famille se sont succédées au cours du temps : [2]

- la méthode de l'hémolyse :

Elle est basée sur la capacité des streptocoques à sécréter des substances pouvant lyser des érythrocytes, sur gélose au sang.

Elle classe les streptocoques en 3 groupes : β -hémolytique (lyse complète), α -hémolytique (lyse partielle) et non hémolytique (absence de lyse).

- la méthode de Lancefield :

Elle classe les streptocoques en fonction de la composition et des propriétés antigéniques d'un polysaccharide présent au niveau de la paroi de nombreux streptocoques : le polysaccharide C. Ce polysaccharide présente 19 variables possibles, divisant les streptocoques en 19 sérogroupes distincts. Un dernier groupe rassemble les streptocoques dépourvus de ce polysaccharide.

Ces deux méthodes sont insuffisantes pour classer toutes les espèces de la famille *Streptococcaceae*, car nombre d'entre elles sont non groupables ou peuvent appartenir à plusieurs groupes en même temps.

De plus, des espèces appartenant à un même groupe peuvent avoir une pathogénicité et des caractères chimiotaxonomiques très différents.

- l'étude des propriétés physiologiques et biochimiques :

Cette méthode analyse la fermentation de divers sucres, l'action des bactéries sur certains substrats, l'aptitude à se multiplier dans des conditions physiques hostiles et la sensibilité à divers agents bactériens.

Les streptocoques présentant des caractéristiques similaires sont alors regroupés.

De nos jours, une classification combinant ces trois méthodes est largement acceptée. Elle est complétée par des analyses moléculaires : hybridation ADN-ARN et séquençage de la sous-unité 16S de l'ADN ribosomale. [2]

Les streptocoques oraux représentent 20% de la flore commensale buccale. [3] Ils sont divisés en 4 sous-ensembles : [10]

- le groupe *anginosus*

- le groupe *mitis*

- **le groupe *mutans***

- le groupe *salivarius*

Le groupe *mutans*, compte à ce jour 9 espèces qui partagent des propriétés physiologiques et biochimiques communes : [10]

S. criceti, *S. devriesei*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, ***S. mutans***, *S. orisratti*, *S. ratti* et *S. sobrinus*

L'appellation *Streptococcus mutans* s'applique donc à la fois au groupe *mutans* et à l'espèce appartenant à ce groupe. Par la suite, nous parlerons de l'espèce *Streptococcus mutans* et non du groupe.

L'espèce *Streptococcus mutans* est la plus présente du groupe *mutans* au niveau de la cavité buccale (avec une prévalence de 75 à 90% chez les individus dentés et non indemnes de caries). [3]

Elle apparaît au cours des 12 premiers mois de la vie, la principale source de contamination étant la flore salivaire maternelle. On note une fenêtre d'infectiosité préférentielle lors de l'éruption des molaires temporaires puis des molaires permanentes. [2]

Caractéristiques : [2-3]

- α -hémolytique ou non hémolytique.
- Sérotype C (80%), E (6%) ou F (4%) de la classification Lancefield.
- Capacité de synthèse : limitée, donc un apport de besoins nutritifs complexes est nécessaire pour assurer la croissance de la population (glucose, protéines, minéraux, facteurs de croissance). *S. mutans* ne produit ni catalase, ni nitrate réductase, ni cytochrome oxydase.
- Anaérobiose aérotoleante (peut croître en présence d'oxygène).
- Acidophilie et acidogénicité : l'espèce *S. mutans* peut se développer jusqu'à un pH atteignant 3,5 engendré par l'acide lactique qu'elle relâche dans le milieu environnant. [11]
- Température : croissance optimale de 35 à 37°C.
- Conditions nutritionnelles et métabolisme : *S. mutans* est une bactérie homofermentaire, utilisant la voie d'Embden-Meyerhof pour dégrader le glucose en pyruvate.

Outre le système de transport actif et du système PTS, *S. mutans* possède un système de transport multisucres (Msm) permettant l'assimilation de sucres plus rares (mélibiose, raffinose, isomaltose). Ce système semble être utilisé lors de période de disette en sucres fermentescibles dans le transport intracellulaire de résidus de dégradation des polysaccharides extracellulaires.

- Adhérence : forte grâce à la synthèse de polymères extracellulaires (glucanes) à partir des sucres fermentescibles.
- Pathogénicité : *S. mutans* est une bactérie pathogène opportuniste. En effet, elle fait partie de la flore commensale d'une bouche saine. Mais elle génère des dégâts irréversibles sur les tissus dentaires lorsque sa population croît fortement, en raison de la mise en place des conditions citées ci-dessus.

S. mutans est également impliquée dans des pathologies générales, en particulier du fait de sa forte capacité à adhérer aux tissus (endocardites, septicémies, tendinites).

→ *Lactobacilles rhamnosus* :

Les lactobacilles de l'espèce *rhamnosus* appartiennent à la famille des *Lactobacillaceae*. [10]

Cette famille de bactéries lactiques est divisée en 4 genres :

- ***Lactobacillus*** (le plus grand genre avec plus de 100 espèces dont *Lactobacillus rhamnosus*) [9]
- *Paralactobacillus*
- *Pediococcus*
- *Sharpea*

Le genre *Lactobacillus* regroupe des bâtonnets, parfois des coccobacilles, dépourvus de catalase et de cytochrome, et non sporulant. Ils sont généralement anaérobies facultatifs et donnent de l'acide lactique comme produit de fermentation unique ou majeur. [9]

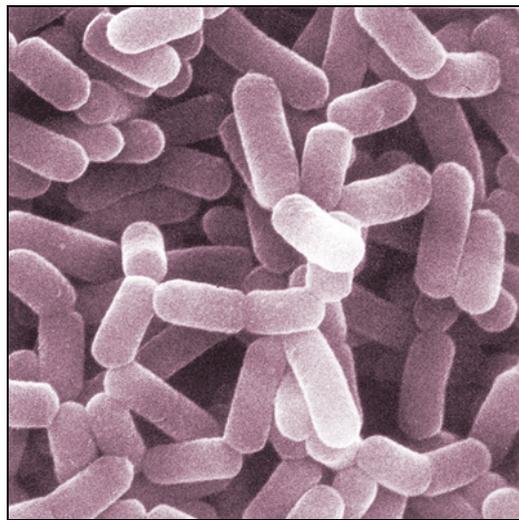


Figure 7 – vue de *Lactobacillus* au microscope électronique à balayage (image libre de droit disponible à l'adresse suivante : <https://www.flickr.com/photos/ajc1/8344600413>)

Les espèces bactériennes appartenant au genre *Lactobacillus* sont classées en 3 groupes en fonction de leurs propriétés fermentaires des hexoses et pentoses :

- Groupe I :

Homofermentaires stricts, produisant du lactate par la voie d'Embden-Meyerhof, ne fermentant ni les pentoses, ni le gluconate.

- Groupe II (dont *Lactobacillus rhamnosus*) :

Hétérofermentaires facultatifs, fermentant les hexoses par la voie d'Embden-Meyerhof et capables de fermenter les pentoses en lactate et acétate par une phosphokétolase inductible (voie des pentoses phosphate).

- Groupe III :

Hétérofermentaires stricts, fermentant les hexoses en lactate, acétate (ou éthanol) et CO₂, fermentant également les pentoses en lactate et acétate. [2] [9]

Lactobacillus rhamnosus est une espèce de la flore commensale buccale.

Ils colonisent la cavité buccale au cours de la 1^{ère} année de vie avec l'éruption des premières dents et sont vite retrouvés dans la salive, sur la langue, et au niveau de la plaque dentaire.

On observe une augmentation de leur taux (passe de 1% jusqu'à 5%) lors de la phase initiale du processus carieux. [2]

Caractéristiques : [2-3]

- capacité de synthèse limitée, donc des besoins nutritifs complexes pour assurer la croissance de la population (glucides fermentescibles, produits d'hydrolyse de protéines, vitamines et nombreux facteurs de croissance).

- Anaérobiose facultative.

- Acidophilie (dénombrés en grande quantité à des pH < 6,9) et acidogénicité.

- Large spectre de température de croissance : 2 à 53°C.

- Conditions nutritionnelles et métabolisme : ils utilisent la voie de la glycolyse mais également la voie des pentoses phosphates.

- Adhérence faible aux surfaces lisses. Ils préfèrent les sites présentant une rétention mécanique (anfractuosités des dents, restaurations débordantes, attaches orthodontiques...).

Ils sont également présents en grand nombre au sein des cavités carieuses et en particulier dans la dentine cariée profonde, en raison de leur affinité pour le collagène de type I.

- Pathogénicité : comme *S. mutans*, *Lactobacillus rhamnosus* est pathogène opportuniste à partir du moment où les conditions environnementales citées ci-dessus sont respectées. Ils sont également impliqués dans des pathologies générales (infections pleurales et urinaires, endocardites, méningites, septicémies...).

Streptococcus mutans et *Lactobacillus rhamnosus*, de par leurs caractéristiques, sont donc deux bactéries fortement impliquées dans le processus carieux.

III - L'alimentation et les glucides :

L'alimentation est un des facteurs de risque cariogène énoncés dans l'introduction de cette première partie.

En effet, c'est par le biais de notre alimentation que les bactéries buccales reçoivent les nutriments nécessaires à leur développement, et en particulier les glucides.

1. Généralités [12]

Les glucides, également appelés hydrates de carbone possèdent une formule chimique basée sur le modèle : $C_n(H_2O)_p$

Ce sont des molécules organiques contenant un groupement carbonyle (C=O) et un ou plusieurs groupements hydroxyles (-OH).

On distingue les oses (sucres simples) des osides (sucres complexes), les osides étant des polymères d'oses.

Les oses (ou monosaccharides) :

On compte plus de 30 oses qui diffèrent en fonction :

- de leur nombre de carbones : de 3 à 8 (trioses, tétroses, pentoses, hexoses...)
- du groupement carbonyle : fonction aldéhyde sur le 1^{er} carbone pour les aldoses ou fonction cétone sur le 2^e carbone pour les cétooses
- de leur pouvoir rotatoire (énantiomères L et D)
- de leur conformation dans l'espace lorsqu'ils peuvent se cycliser (anomères α et β).

Le glucose et le fructose sont les hexoses les plus fréquemment retrouvés dans notre alimentation.

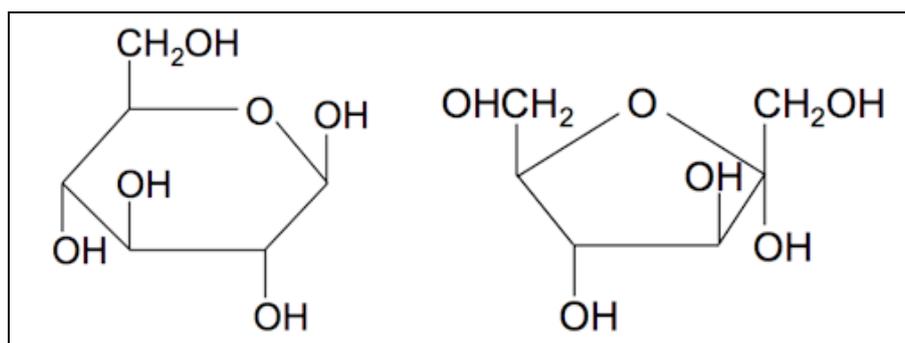


Figure 8 – Projection de Haworth des molécules de glucose (à gauche) et de fructose (à droite) [12]

Les osides :

Il s'agit de polymères d'oses, liés par liaisons covalentes, formant des chaînes de quelques oses (disaccharides, trisaccharides..) jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'oses (polysaccharides).

Les osides les plus présents dans notre alimentation sont :

- les disaccharides saccharose (glucose-fructose), maltose (glucose-glucose) et lactose (glucose-galactose).
- le polysaccharide amidon (formé de glucose).

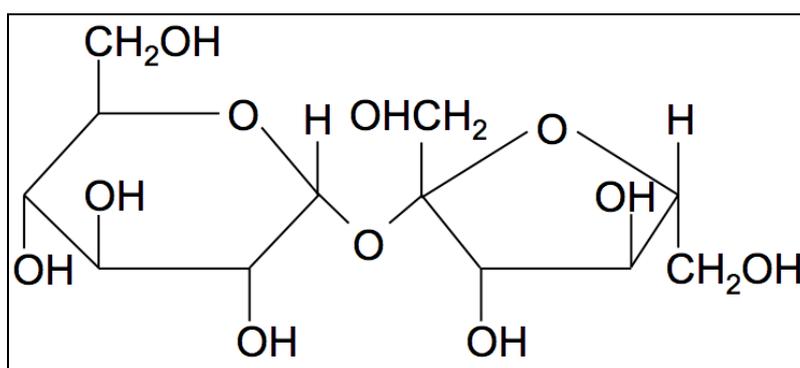


Figure 9 – Projection de Haworth d'une molécule de saccharose [12]

2. Nature du sucre

Un glucide n'est pas forcément impliqué dans le processus carieux. Pour être cariogène, il doit être fermentescible, c'est-à-dire qu'il doit pouvoir être assimilé par une bactérie buccale puis métabolisé dans le but de lui fournir de l'énergie (cette opération produisant des acides).

Les glucides fermentescibles sont sous forme de mono ou disaccharides (glucose, fructose, saccharose, maltose et lactose). Ils sont directement métabolisés par les bactéries buccales.

Les amidons doivent dans un premier temps être scindés, par l'amylase salivaire, en maltose et glucose pour pouvoir être fermentés, ce qui rend leur potentiel carieux plus faible.

En revanche, certains dérivés hydrolysés de l'amidon (sirop de glucose, sirop de fructose) se présentent sous la forme de chaînes glucidiques beaucoup plus courtes qui peuvent être fermentés par les bactéries buccales.

Enfin, les techniques de purification du sucre, de plus en plus utilisées dans l'agro-alimentaire, consistent à retirer les protéines, les graisses et les fibres associées et/ou à

concentrer les sucres, ce qui augmente grandement le risque carieux de ces sucres transformés. [2]

Le saccharose représente le sucre de l'alimentation le plus « redoutable » pour plusieurs raisons :

- il constitue la forme sucrée la plus courante.
- 90% du saccharose disponible dans l'environnement de la bactérie pénètre à l'intérieur de celle-ci.
- une invertase, permet de le scinder en glucose et fructose, utilisés par la suite dans le processus de glycolyse.
- il permet la biosynthèse de polysaccharides extracellulaires favorisant l'adhérence et donc la colonisation des *S. mutans*. [2-3]

3. Quantité de sucres ingérés [2]

Plus la quantité de glucides fermentescibles est importante, plus les bactéries obtiennent des ressources nutritives.

Cependant, une forte quantité de glucides a également un impact sur le métabolisme des streptocoques et lactobacilles impliqués dans le processus carieux. Par exemple, *L. rhamnosus* modifie son métabolisme en fonction des quantités de glucides fermentescibles disponibles. Dans des conditions d'abondance, elle est majoritairement homofermentaire, produisant des acides lactiques, fortement déminéralisant. Mais lorsque les glucides deviennent rares, elle privilégie un métabolisme hétérofermentaire, produisant des acides organiques moins déminéralisants.

De même, lorsque la concentration en glucides disponibles augmente, les bactéries cariogènes utilisent le système de transport actif pour incorporer ces glucides, plus rapide que le système par phosphorylation.

Une consommation importante de glucides fermentescibles augmente donc les nutriments à disposition des bactéries mais a également un impact sur le fonctionnement métabolique de celles-ci, accélérant le processus carieux.

4. Fréquence d'ingestion [2]

L'ingestion d'un sucre provoque une forte et rapide baisse du pH de la plaque dentaire, stable et proche de la neutralité en temps normal. Le pH passe sous la valeur critique de 5,5, entraînant la déminéralisation irréversible des tissus dentaires.

Une fois les sucres épuisés, la production acide s'arrête et les acides restants sont progressivement éliminés.

Trois processus permettent cette élimination :

- la diffusion des acides hors de la plaque, par le flux salivaire.
- la neutralisation des acides par le pouvoir tampon de la salive et de la plaque, ainsi que par les amines et l'ammoniaque, produits du catabolisme des composés azotés par certaines bactéries.
- la transformation des acides lactiques, fortement déminéralisants en acides organiques, moins déminéralisants, par certaines bactéries.

Le pH remonte ainsi peu à peu jusqu'à la neutralité, et la phase de reminéralisation débute.

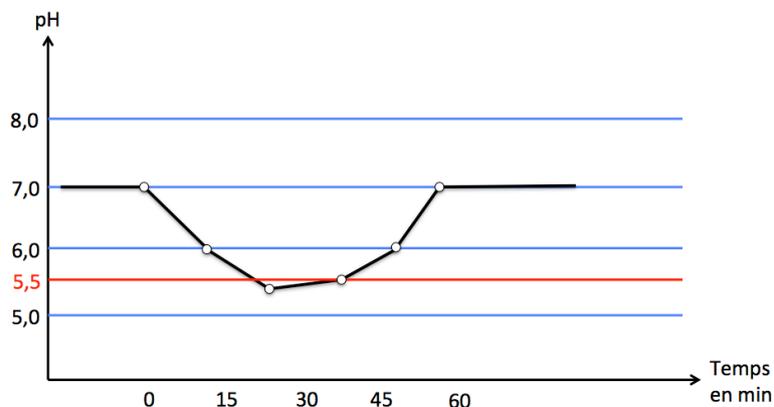


Figure 10 – Variation du pH de la plaque dentaire après ingestion de sucre à T_0 (d'après Stephan) [3]

En augmentant la fréquence de prise alimentaire, on déséquilibre la balance déminéralisation/reminéralisation.

A titre d'exemple, si on considère qu'une prise alimentaire dure 30 minutes et que le pH buccal revient à la neutralité en 30 minutes, un individu prenant 4 repas dans la journée expose ses dents pendant 4 heures à la déminéralisation et pendant 20 heures à la reminéralisation. S'il passe à 7, 8 voire 10 prises alimentaires dans la journée, la déminéralisation devient le processus dominant. La capacité du corps à restaurer les tissus lésés est dépassée.

IV - Les édulcorants : une solution ?

Les édulcorants sont des substances ayant un goût sucré. Ils peuvent être naturels (miel, sirop d'érable, sirop d'agave, stévia, xylitol) ou artificiels (acésulfame K, aspartame, sucralose...).

Ils sont classés en deux groupes :

- édulcorants de charges : ils ont un pouvoir sucrant proche de celui du sucre de table (saccharose). Ils sont obtenus par hydrogénation de sucres, une fonction alcool remplaçant la fonction aldéhyde ou cétone. Ils sont utilisés dans beaucoup de produits alimentaires en substitution au saccharose.

- édulcorants intenses : ils présentent l'avantage de posséder un pouvoir sucrant très élevé (jusqu'à plusieurs milliers de fois celui du saccharose), ce qui permet de les utiliser en quantité très faible dans les denrées alimentaires, et donc de diminuer fortement l'apport calorique. Les édulcorants étudiés dans cette thèse expérimentale appartiennent à cette catégorie. [5,12]

Présentation des édulcorants étudiés :

1. Acésulfame K (E950)

Découvert en 1967 par Clauss et Jensen du laboratoire allemand Hoerchst, l'acésulfame K appartient à la famille des dioxydes d'oxathiazinones.

Formule chimique brute : $C_4H_4NO_4KS$ [5]

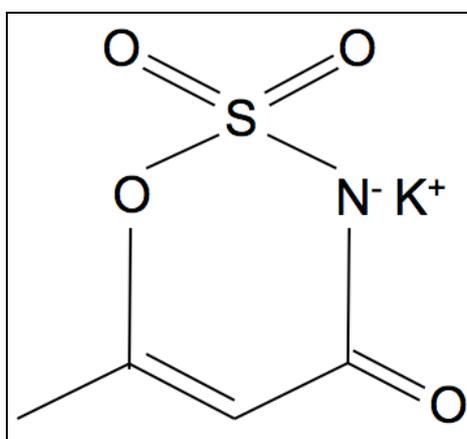


Figure 11 – Projection de Haworth d'une molécule d'acésulfame K [5]

L'acésulfame K est obtenu par synthèse à partir de fluorosulfonylisocyanate et d'ester butylique de l'acide acétoacétique. Le composé résultant est transformé en amide fluorosulfonyle de l'acide acétoacétique, qui est ensuite cyclisé en présence d'hydroxyde de potassium pour former le système cyclique de dioxyde d'oxéthazaine. En raison de la forte acidité de ce composé, le sel de potassium est produit directement. [5,13]

Son pouvoir sucrant est égal à 200 fois celui du saccharose.

Il est très stable à des températures élevées (température de fusion = 225°C) dans des milieux de pH > 3.

En raison de son arrière-goût amer, il est souvent associé à d'autres édulcorants, notamment l'Aspartame. [5]

Il est non métabolisé et très résistant à toute transformation. [14]

Après administration orale, l'acésulfame potassium est rapidement distribué et éliminé sans aucun signe de bioaccumulation dans les tissus. Le pic plasmatique est atteint en 1h - 1h30, puis la concentration diminue avec une demi-vie $T_{1/2} = 2h30$.

L'élimination se fait à 98,4% par voie urinaire et le restant par voie fécale. [15]

Il est autorisé la 1^{ère} fois en 1983 en Grande-Bretagne, et en 1988 en France et aux Etats-Unis.

La dose journalière admissible fixée par l'Union Européenne est de 0 à 15mg/kg de poids corporel / jour, soit un maximum de 1,050g pour une personne de 70kg.

[5-12]

2. Sucralose (E955) [5-12]

Développé par Tate & Lyle au laboratoire du Queen Elizabeth College de Londres en 1976, le sucralose est breveté en 1979.

Formule chimique brute : $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$

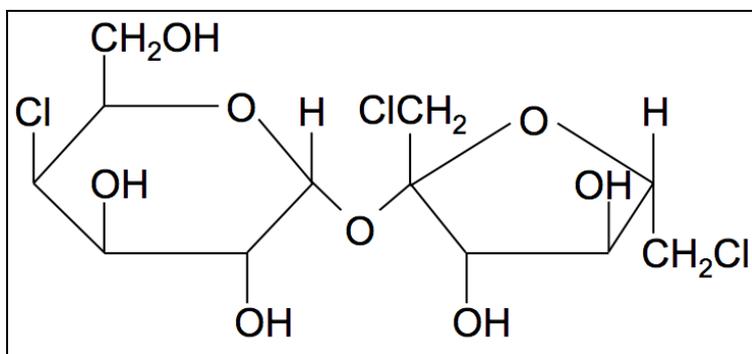


Figure 12 – Projection de Haworth d'une molécule de sucralose [5]

Il s'agit d'un trichlorogalactosucrose, obtenue lors d'une synthèse en cinq étapes à partir du saccharose. Trois fonctions hydroxydes (OH) sont alors substituées par trois fonctions chlore (Cl), au niveau des carbones 1', 4 et 6'.

Son pouvoir sucrant est égal à 500 fois celui du saccharose. Le goût apporté par le sucralose est voisin de celui du saccharose, avec une après-saveur sucrée plus prolongée.

Le sucralose présente une grande stabilité vis-à-vis des températures élevées (température de fusion = 125°C) et des variations de pH (stable jusqu'à 40 semaines à pH = 3).

Sa valeur énergétique est de 0 kcal/g (ou 0 kJ/g). 4/5 du sucralose ingéré est éliminé par voie fécale sans modification. Seuls 20 à 30% du 1/5 absorbé est métabolisé, le restant est éliminé par voie urinaire sans modification.

Il est autorisé pour la 1^{ère} fois au Canada en 1991, aux Etats-Unis en 1998 et en Europe en 2003. Toutefois, la présence d'atomes de chlore suscite quelques inquiétudes chez certains chercheurs sur les effets toxiques possibles, ce qui fait toujours l'objet d'études aujourd'hui.

La dose journalière admissible fixée par l'Union Européenne est de 0 à 15mg/kg de poids corporel / jour, soit un maximum de 1,050g pour une personne de 70kg.

3. Aspartame (E951) [5-12]

Découvert en 1965 par James Schlatter du laboratoire Searle & Co, lors de la synthèse d'un tétrapeptide, testé comme médicament anti-ulcère.

Formule chimique brute : $C_{18}H_{19}N_2O_5$

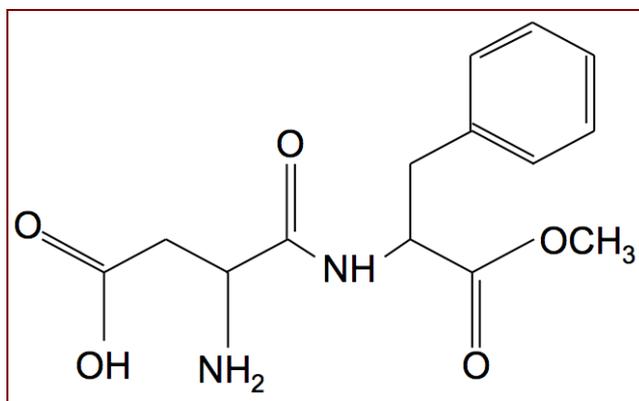


Figure 13 – Projection de Haworth d'une molécule d'aspartame [5]

L'aspartame est un dipeptide obtenu par condensation chimique ou enzymatique de 2 peptides : la L-phénylalanine (sous forme d'esther méthylique) et l'acide L-aspartique.

Le pouvoir sucrant de l'aspartame est égal à 200 fois celui du saccharose pour un profil de goût proche de ce dernier.

L'aspartame est relativement instable en solution. Il libère un groupement hydroxyméthyl (méthanol), puis se décompose en aspartyphénylalanine qui donnera de la phénylalanine et de l'acide aspartique.

L'aspartyphénylalanine peut également, sous l'effet de la chaleur, se recombinaison en dicétopipérazine. Ces deux molécules sont dénuées de pouvoir sucrant.

Le temps de stockage, l'humidité, la température ainsi que le pH sont des paramètres qui vont intervenir dans la décomposition de l'aspartame, et qui doivent donc être contrôlés.

En effet, l'aspartame est stable lorsque le pH est situé entre 3 et 5. C'est pourquoi il est majoritairement utilisé dans des boissons très acides.

Il est également souvent associé à d'autres édulcorants plus stables afin de pallier cette perte de pouvoir sucrant.

Sa valeur énergétique est de 4 kcal/g (ou 17 kcal/g).

Il est autorisé depuis 1974 au Etats-Unis et depuis 1988 en France.

Toutefois, la polémique autour de la toxicité de l'aspartame, des produits dérivés de son métabolisme (acide aspartique, phénylalanine et méthanol) et de sa dégradation (dicétopipérazine) est toujours d'actualité.

A ce jour, l'autorité européenne de sécurité des aliments considère la dose journalière admissible comme une protection adéquate et l'aspartame sûr pour la population générale.

Elle reconnaît toutefois que la phénylalanine constitue un risque pour les personnes souffrant de phénylcétonurie. L'étiquetage des produits contenant de l'aspartame doit présenter la mention obligatoire « contient une source de phénylalanine ».

La dose journalière admissible fixée par l'Union Européenne est de 0 à 40mg/kg de poids corporel / jour, soit un maximum de 2,800g pour une personne de 70kg.

Deuxième partie : ETUDE EXPERIMENTALE

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le processus carieux est un phénomène complexe impliquant un déséquilibre dans la flore bactérienne buccale, entraînant une surpopulation de certaines bactéries. Du fait de cette surpopulation, les déchets acides produits par l'utilisation des sucres provoquent une déminéralisation de l'émail dentaire, supérieure à la capacité de l'organisme à le reminéraliser. Si cette situation perdure dans le temps, la perte tissulaire est irréversible.

Afin d'empêcher ces productions acides, une solution est de remplacer les sucres fermentescibles utilisés dans l'industrie agro-alimentaire ainsi que dans la production de médicaments par des sucres de synthèse.

Si de nombreuses études existent sur la non cariogénicité des édulcorants de charge (xylitol, sorbitol...), rares sont celles sur les édulcorants intenses, pourtant de plus en plus présents.

C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les trois sucres de synthèse les plus utilisés : l'acésulfame K, le sucralose et l'aspartame.

Nous avons donc choisi d'étudier les trois paramètres contribuant à la mise en place du processus carieux (la croissance bactérienne, la production d'acidité et l'adhésion des bactéries aux tissus durs) lorsque le saccharose est substitué par ces trois édulcorants.

I - Matériel

1. Souches bactériennes

Nous avons étudié deux bactéries principalement impliquées dans le phénomène carieux : *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*.

Pour chaque bactérie, nous avons utilisé des souches de collection ATCC (American Type Culture Collection) :

- *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Nous avons également utilisé des souches provenant d'isolats cliniques prélevés sur plaque

chez un adulte, conservées dans notre laboratoire :

- *Streptococcus mutans* n°193, identifié par PCR
- *Lactobacillus rhamnosus* n°18, identifié par galerie API.

Concernant les tests d'adhérence, nous avons utilisé pour l'isolat clinique de *Lactobacillus rhamnosus* la souche BAP₃, particulièrement adhérente. Cette souche a été initialement utilisée pour évaluer le potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. [16]

2. Milieux de culture

- milieu FMM (*Fermentation Minimal Medium*) :

Pour ce milieu, on incorpore dans 1L d'eau distillée : 50 mM de chlorure de potassium, 5 mM de chlorure de sodium, 2 mM de sulfate de magnésium, 2 mM de chlorure de manganèse, 8 mM de sulfate d'ammonium, 1,5 µM de thiamine et 8 µM de niacine. [17]

Il présente l'avantage de contenir les éléments nécessaires à la croissance bactérienne (sels minéraux et vitamines) tout en étant dépourvu de sucre. [17]

Ceci nous permet d'apprécier le potentiel fermentaire des bactéries étudiées pour un édulcorant donné. Pour cela, nous avons par la suite ajouté à ce milieu différentes doses d'édulcorants.

- milieu liquide TS (*Trypticase-Soja*) :

Ce bouillon contient un mélange de peptones, de glucose, de chlorure de sodium permettant la croissance de la plupart des micro-organismes non exigeants.

Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH à 7,3 au cours de la croissance bactérienne. [18]

Il a été utilisé pour la culture over-night des streptocoques.

- milieu liquide MRS (*Man, Rogosa et Sharpe*) :

La peptone, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles.

Le Tween 80 est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes.

Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH à 6,2 au cours de la croissance bactérienne.

Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du

développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures. [19]

Ce milieu a été utilisé pour la culture over-night des lactobacilles, pour l'étude de l'adhérence des lactobacilles ainsi que pour la création de géloses (après ajout d'Agar) pour l'étude de la croissance de ces lactobacilles.

- milieu *MITIS Salivarius Agar* :

Ce milieu contient des hydrolysats enzymatiques de caséine et des tissus animaux concentrés, sources de carbone, d'azote, de vitamines et de minéraux. Le dextrose et le saccharose présents dans le milieu sont des glucides fermentescibles. Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH à 7,0 (+/- 0,2). Le cristal violet et le tellurite de potassium inhibent une grande majorité de bacilles à Gram négatif et de bactéries à Gram positif excepté les streptocoques. L'agar permet la gélification de la solution. [20]

Ce milieu a été utilisé pour l'étude de la croissance des streptocoques mutans.

- milieu *BHI (Brain Heart Infusion)* :

Ce mélange d'extrait de cœurs et de cervelles, de gélatine de peptones pancréatiques, et de chlorure de sodium permet la croissance en fournissant les éléments nutritifs aux bactéries exigeantes. Le glucose est un glucide fermentescible. Le phosphate disodique contribue à stabiliser le pH à 7,4 (+/- 0,2). [21]

Ce milieu a été utilisé pour l'étude de l'adhérence des streptocoques mutans.

3. Edulcorants et sucres

Nous avons étudié l'impact de trois édulcorants sur la croissance bactérienne, la production d'acidité et l'adhérence aux tissus durs, lorsque ceux-ci étaient utilisés en substitution au saccharose.

Le saccharose, l'acésulfame K et le sucralose utilisés proviennent de la société américaine Sigma-Aldrich. Ces produits sont purs à 99% pour le saccharose et l'acésulfame K et à 98% pour le sucralose.

L'aspartame provient de la société Ajinomoto Sweeteners Europe, il est pur à 100%.

Les fiches descriptives des édulcorants sont disponibles dans l'annexe n°1.

II - Méthode

1. Culture over-night

Chaque protocole expérimental utilisé dans cette thèse a nécessité au préalable la réalisation d'une mise en culture over-night.

Les bactéries sont placées dans un environnement qui fournit tous les éléments favorables à leur croissance (nutriments, température, pH, humidité, présence ou absence d'oxygène...) pendant 24h afin de stimuler le métabolisme cellulaire.

Cette méthode permet d'utiliser des bactéries dans les mêmes conditions pour chaque expérience. En effet, après 24h de culture over-night, les bactéries sont en phase de croissance exponentielle. [23]

On évite ainsi l'utilisation de bactéries en phase de déclin, qui survient lorsque les ressources nutritives et physiques sont épuisées et/ou absentes. Ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme cellulaire et une accumulation de métabolites toxiques, altérant la réponse bactérienne lors de nos expérimentations.

2. Croissance bactérienne

Afin d'étudier l'impact de la substitution du saccharose par un édulcorant sur la croissance bactérienne, nous avons procédé selon le protocole suivant :

Nous avons préparé des flacons contenant 20mL de milieu FMM auxquels nous avons ajouté différentes doses d'édulcorants afin d'obtenir des concentrations de [10g/L], [20g/L] et [30g/L] pour l'Acésulfame K et le Sucralose. Les concentrations testées pour l'Aspartame étaient de [5g/L], [10g/L] et [20g/L]. Le témoin positif contenait une concentration de [2,5g/L] de saccharose.

Chaque combinaison bactérie - sucre a été réalisée en triplicata.

Nous avons ensuite ajouté 1mL de milieu contenant des bactéries, provenant d'une culture over-night, ajusté à une Densité Optique (de longueur d'onde $\lambda=650\text{nm}$) : $DO_{650\text{nm}} = 1$.

Les flacons ont alors été placés dans une étuve à 37°C.

Au bout de 24h, nous avons dilué avec de l'eau distillée stérile chaque culture avant de procéder à l'étalement de 50 μL sur gélose selon la technique dite de râteau.

Pour *Streptococcus mutans*, la dilution finale était de 10^{-4} , et pour *Lactobacillus rhamnosus*, de 10^{-5} .

Les géloses ont alors été placées dans une étuve à 37°C, en anaérobiose.

Après 5 jours d'incubation, nous avons compté le nombre de colonies formées sur chaque gélose. [23-24]

Les résultats obtenus sont présentés dans la partie Résultats.

3. Production d'acidité

Le protocole de mesure des variations du pH reprend les mêmes étapes initiales que celui de l'étude de la croissance bactérienne : préparation des flacons contenant le milieu FMM auxquels sont ajoutés les différents édulcorants à analyser.

Les bactéries sont ensuite lavées dans du sérum physiologique par plusieurs passages en centrifugeuse, afin d'éviter l'apport du milieu servant à la culture over-night, contenant du glucose.

- Pour les streptocoques, deux passages en centrifugeuse à 2500 t/min, pendant 10 minutes, ont été nécessaires afin de séparer les bactéries du milieu TS.

- Pour les lactobacilles, plus difficiles à centrifuger, deux passages à une vitesse comprise entre 3000 et 8000 t/min pendant 15 minutes ont été nécessaires afin de les séparer du milieu MRS.

Une fois la mesure de la DO réalisée, les flacons contenant les bactéries dans du milieu FMM + 1 édulcorant sont placés en étuve à 37°C.

Au bout de 24h, le pH de chaque flacon est mesuré à l'aide du pH-mètre. [23-24]

Les résultats obtenus sont présentés dans la partie résultat.

4. Adhérence

Les propriétés d'adhérence des bactéries sur tissus durs ont été évaluées selon la méthode des tubes de verre inclinés décrite par Mukasa et Slade, [25] puis modifiée par Hamada et Torii. [26]. Cette méthode a déjà été utilisée dans notre laboratoire pour des travaux antérieurs [16].

Pour cela, nous avons rajouté à 10mL de milieu MRS (pour les lactobacilles) ou de milieu BHI (pour les streptocoques) 0,1g du sucre testé (saccharose ou édulcorant).

Nous avons alorsensemencé chaque tube avec 500µL de bactéries, provenant d'une culture over-night, ajustée à une DO_{650nm} de 0,1.

Chaque combinaison bactérie - sucre a été réalisée en triplicata.

Les tubes ont alors été inclinés à 30° sur un portoir, et placés dans une étuve à 37°C.

Les résultats ont été recueillis au bout de 24 et 48 heures, et classés selon l'échelle visuelle de Murchison.

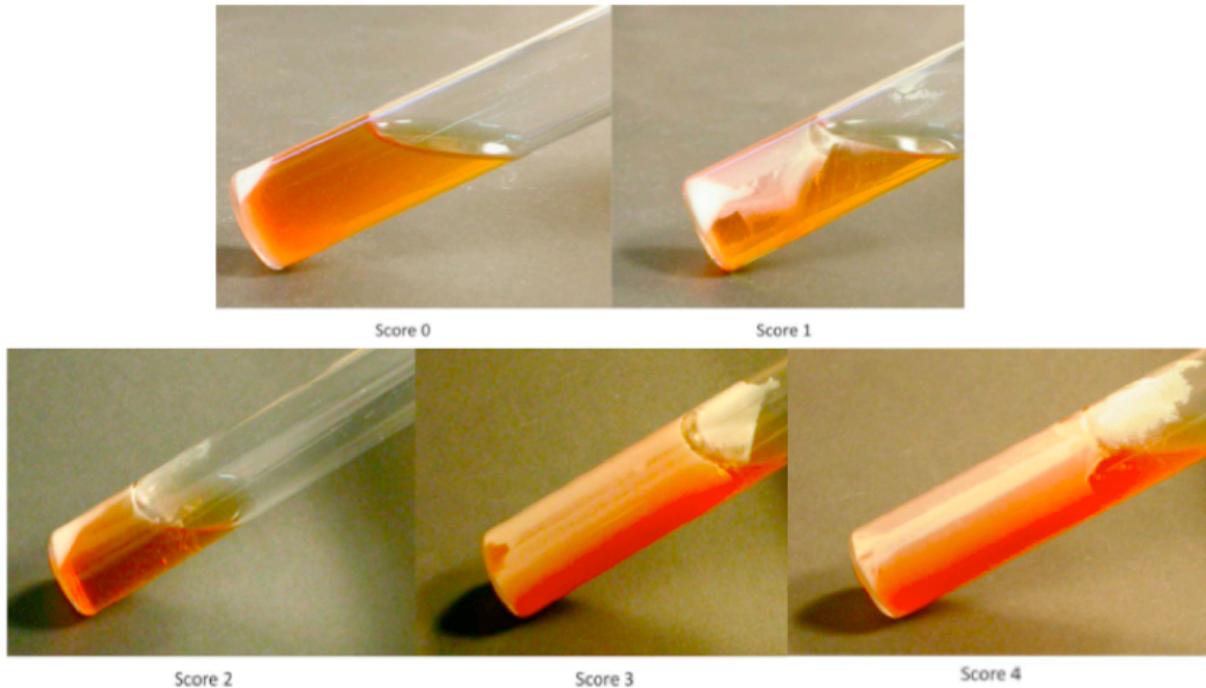


Figure 14 – Présentation des différents scores de l'échelle visuelle de Murchison [16]

- Score 0 : pas d'adhérence visible.
- Score 1 : quelques colonies visibles adhérent au fond du tube.
- Score 2 : formation d'une fine couche de cellules au fond du tube, se dégradant lors de l'agitation du tube.
- Score 3 : formation d'une couche de cellules au fond du tube et d'une fine couche sur les côtés du tube, se dégradant partiellement lors de l'agitation du tube.
- Score 4 : formation d'une couche de cellule large au fond et sur les côtés du tube, ne se dégradant pratiquement pas lors de l'agitation du tube. [27]

III - Résultats

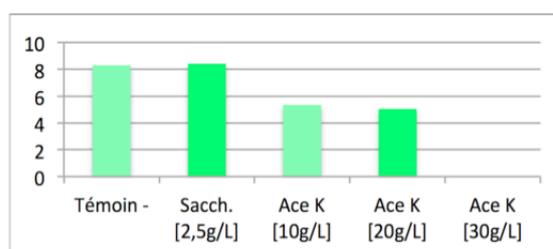
1. Croissance bactérienne

Le comptage des unités formant une colonie (UFC) sur géloses est exprimé en logarithmes décimaux/mL. Les moyennes de chaque triplicata sont utilisées pour les graphiques. En se basant sur des travaux antérieurs effectués au laboratoire [24], nous savons qu'une différence supérieure à 1 log est significative.

→ *S. mutans* – ATCC N°25175 :

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	8,00	8,48	8,41	8,30
Sacch. [2,5g/L]	8,45	8,41	8,34	8,40
Ace K [10g/L]	8,15	7,90	0,00	5,35
Ace K [20g/L]	7,30	0,00	7,90	5,07
Ace K [30g/L]	0,00	0,00	0,00	0,00

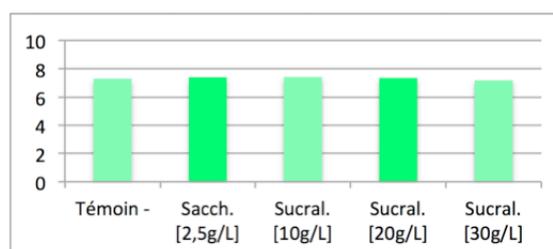
Tableau 1 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Ace K à T_{120h}



Graphique 1 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Ace K à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	7,00	7,48	7,41	7,30
Sacch. [2,5g/L]	7,45	7,41	7,34	7,40
Sucral. [10g/L]	7,38	7,41	7,45	7,41
Sucral. [20g/L]	7,26	7,34	7,45	7,35
Sucral. [30g/L]	7,30	6,90	7,34	7,18

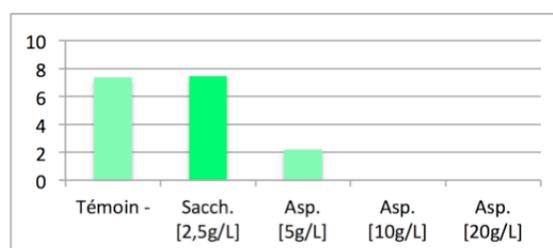
Tableau 2 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Sucralose à T_{120h}



Graphique 2 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Sucralose à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	7,38	7,34	7,34	7,35
Sacch. [2,5g/L]	7,41	7,41	7,56	7,46
Asp. [5g/L]	6,60	0,00	0,00	2,20
Asp. [10g/L]	0,00	0,00	0,00	0,00
Asp. [20g/L]	0,00	0,00	0,00	0,00

Tableau 3 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Aspartame à T_{120h}



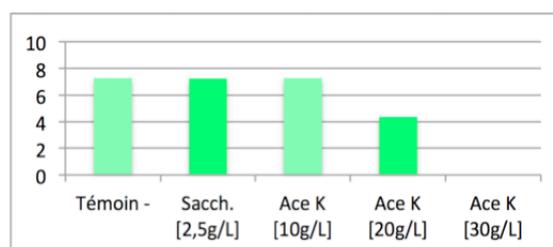
Graphique 3 – comptage des UFC de *S. mutans* (ATCC) / Aspartame à T_{120h}

La croissance de *S. mutans* ATCC n°25175 n'est pas impactée en présence de sucralose. Au contraire, l'acésulfame K et encore plus l'aspartame entraînent une inhibition de cette croissance.

→ *S. mutans* – Isolats cliniques :

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	7,30	7,26	7,26	7,27
Sacch. [2,5g/L]	7,48	7,20	7,00	7,23
Ace K [10g/L]	7,41	7,15	7,26	7,27
Ace K [20g/L]	6,78	6,30	0,00	4,36
Ace K [30g/L]	0,00	0,00	0,00	0,00

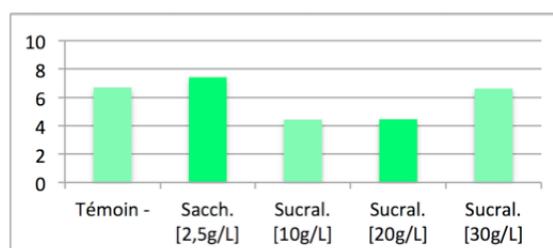
Tableau 4 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Ace K à T_{120h}



Graphique 4 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Ace K à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	6,60	6,60	6,90	6,70
Sacch. [2,5g/L]	7,45	7,26	7,56	7,42
Sucral. [10g/L]	6,30	0,00	7,00	4,43
Sucral. [20g/L]	6,60	0,00	6,78	4,46
Sucral. [30g/L]	6,30	6,78	6,78	6,62

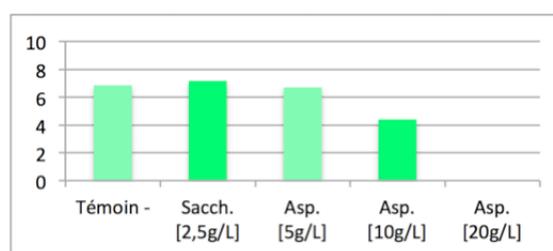
Tableau 5 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Sucralose à T_{120h}



Graphique 5 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Sucralose à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	6,90	7,00	6,60	6,83
Sacch. [2,5g/L]	7,08	7,15	7,26	7,16
Asp. [5g/L]	6,60	6,90	6,60	6,70
Asp. [10g/L]	0,00	6,30	6,90	4,40
Asp. [20g/L]	0,00	0,00	0,00	0,00

Tableau 6 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Aspartame à T_{120h}



Graphique 6 – comptage des UFC de *S. mutans* (Isolat clinique) / Aspartame à T_{120h}

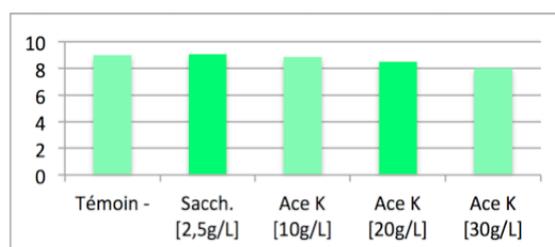
La croissance de l'isolat clinique de *S. mutans* est altérée en fonction de la dose d'acésulfame K et d'Aspartame utilisée. L'inhibition de la croissance est en corrélation avec l'augmentation de la concentration en édulcorant.

Pour le sucralose, nous pouvons noter une inhibition de croissance à 10 et 20g/L. En revanche, la concentration de 30g/L n'entraîne pas d'inhibition.

→ *L. rhamnosus* – ATCC N°7469 :

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	8,96	8,96	9,07	9,00
Sacch. [2,5g/L]	9,05	9,06	9,07	9,06
Ace K [10g/L]	8,82	8,89	8,87	8,86
Ace K [20g/L]	8,38	8,48	8,58	8,48
Ace K [30g/L]	7,6	8,3	8,15	8,02

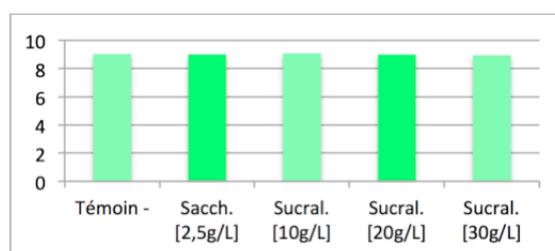
Tableau 7 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Ace K à T_{120h}



Graphique 7 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Ace K à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	8,94	9,02	9,11	9,02
Sacch. [2,5g/L]	9,05	8,89	9,07	9,00
Sucral. [10g/L]	9,04	9,08	9,11	9,08
Sucral. [20g/L]	9,01	9,02	8,95	8,99
Sucral. [30g/L]	8,92	8,99	8,92	8,94

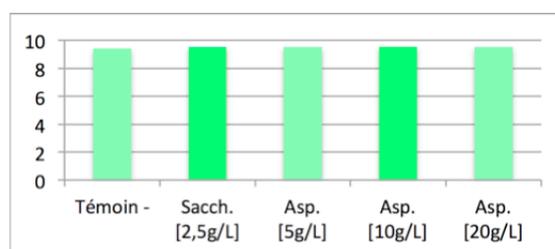
Tableau 8 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Sucralose à T_{120h}



Graphique 8 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Sucralose à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	9,38	9,48	9,4	9,42
Sacch. [2,5g/L]	9,51	9,49	9,56	9,52
Asp. [5g/L]	9,53	9,5	9,56	9,53
Asp. [10g/L]	9,53	9,5	9,56	9,53
Asp. [20g/L]	9,54	9,52	9,51	9,52

Tableau 9 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Aspartame à T_{120h}



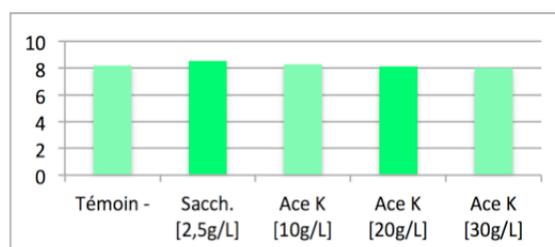
Graphique 9 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (ATCC) / Aspartame à T_{120h}

Il n'y a aucune différence significative pour la croissance de *L. rhamnosus* ATCC N°7469, lors de la présence d'acésulfame K, de sucralose et d'aspartame, et ce, pour n'importe quelle concentration.

→ *L. rhamnosus* – Isolats cliniques :

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	8,08	8,41	8,08	8,19
Sacch. [2,5g/L]	8,38	8,72	8,56	8,55
Ace K [10g/L]	8,34	8,20	8,30	8,28
Ace K [20g/L]	8,26	8,00	8,15	8,14
Ace K [30g/L]	8,00	8,15	7,90	8,02

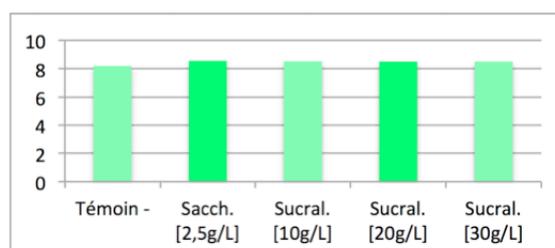
Tableau 10 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Ace K à T_{120h}



Graphique 10 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Ace K à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	8,08	8,41	8,08	8,19
Sacch. [2,5g/L]	8,38	8,72	8,56	8,55
Sucral. [10g/L]	8,48	8,51	8,56	8,52
Sucral. [20g/L]	8,41	8,53	8,56	8,50
Sucral. [30g/L]	8,64	8,53	8,34	8,50

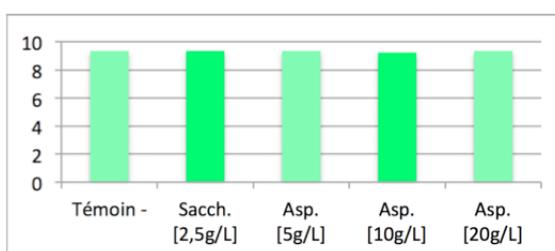
Tableau 11 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Sucralose à T_{120h}



Graphique 11 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Sucralose à T_{120h}

	1	2	3	Moyenne
Témoin -	9,38	9,36	9,33	9,36
Sacch. [2,5g/L]	9,38	9,27	9,38	9,34
Asp. [5g/L]	9,28	9,42	9,33	9,34
Asp. [10g/L]	9,28	9,16	9,25	9,23
Asp. [20g/L]	9,28	9,34	9,40	9,34

Tableau 12 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Aspartame à T_{120h}



Graphique 12 – comptage des UFC de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) / Aspartame à T_{120h}

Il n'y a aucune différence significative pour la croissance de l'isolat clinique de *L. rhamnosus*, lors de la présence d'acésulfame K, de sucralose et d'aspartame, quelle que soit la concentration.

2. Production d'acidité

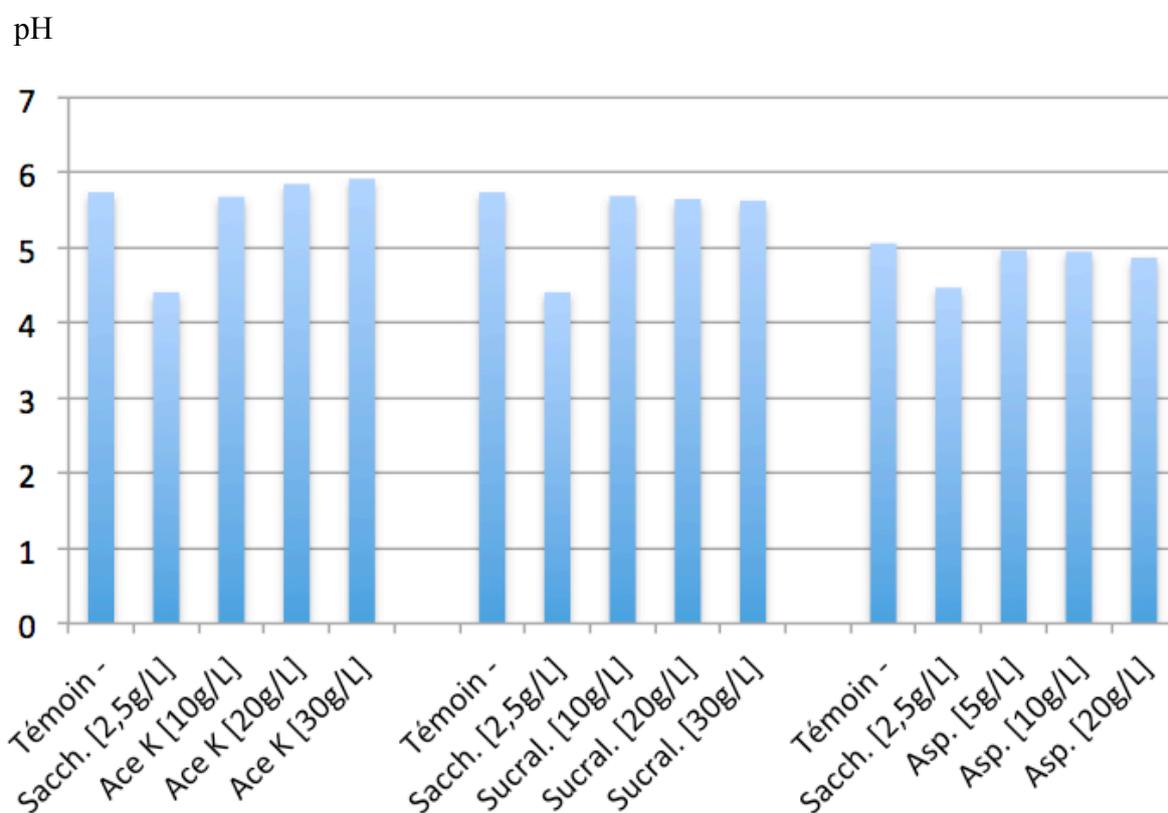
Les tableaux et graphiques exposés dans cette partie représentent les valeurs moyennes de chaque triplicata.

Tous les résultats détaillés sont consignés en annexe n°2

→ *S. Mutans* – ATCC N°25175 :

Ace K	pH	Sucralose	pH	Aspartame	pH
Témoin -	5,74	Témoin -	5,74	Témoin -	5,06
Sacch. [2,5g/L]	4,41	Sacch. [2,5g/L]	4,41	Sacch. [2,5g/L]	4,47
Ace K [10g/L]	5,68	Sucral. [10g/L]	5,69	Asp. [5g/L]	4,97
Ace K [20g/L]	5,85	Sucral. [20g/L]	5,65	Asp. [10g/L]	4,95
Ace K [30g/L]	5,92	Sucral. [30g/L]	5,63	Asp. [20g/L]	4,87

Tableau 13 – pH du milieu de culture de *S. mutans* (ATCC) à T_{=24h}

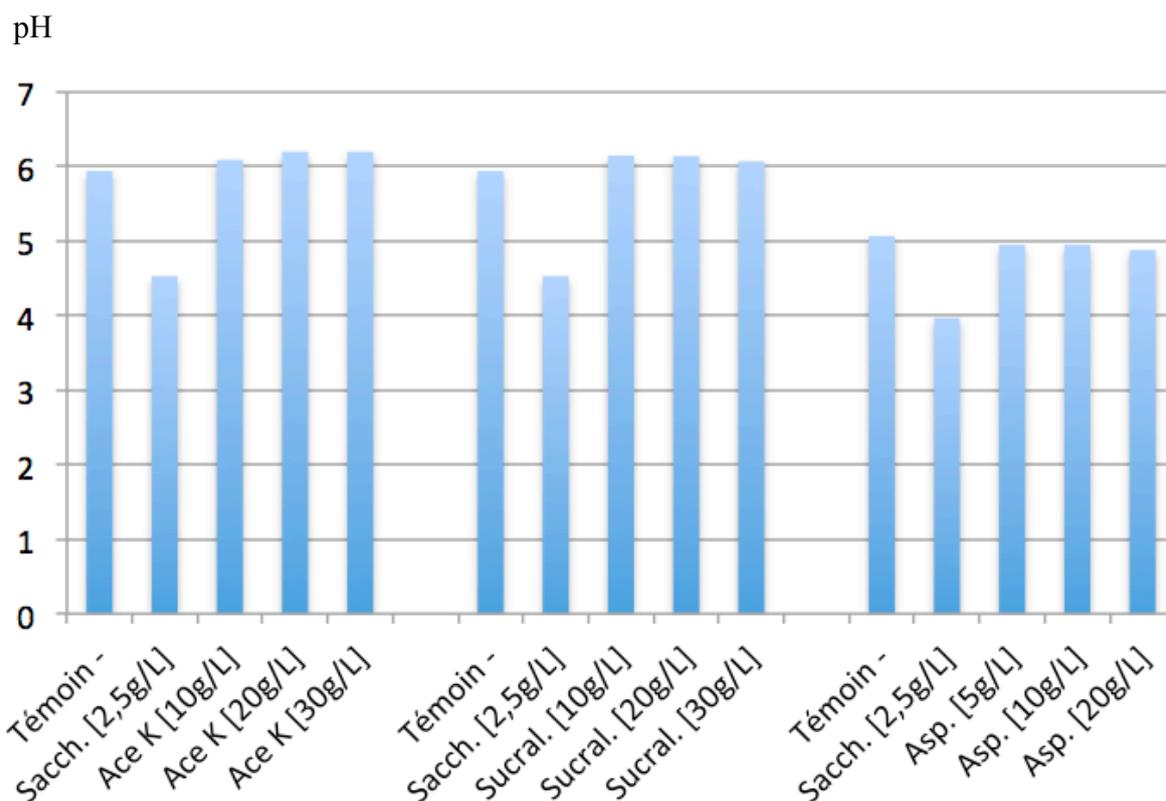


Graphique 13 – pH du milieu de culture de *S. mutans* (ATCC) à T_{=24h}

→ *S. Mutans* – Isolats cliniques :

Ace K	pH	Sucralose	pH	Aspartame	pH
Témoin -	5,94	Témoin -	5,94	Témoin -	5,07
Sacch. [2,5g/L]	4,53	Sacch. [2,5g/L]	4,53	Sacch. [2,5g/L]	3,97
Ace K [10g/L]	6,09	Sucral. [10g/L]	6,15	Asp. [5g/L]	4,95
Ace K [20g/L]	6,20	Sucral. [20g/L]	6,14	Asp. [10g/L]	4,95
Ace K [30g/L]	6,20	Sucral. [30g/L]	6,07	Asp. [20g/L]	4,88

Tableau 14 – pH du milieu de culture de *S. mutans* (Isolat clinique) à T_{=24h}

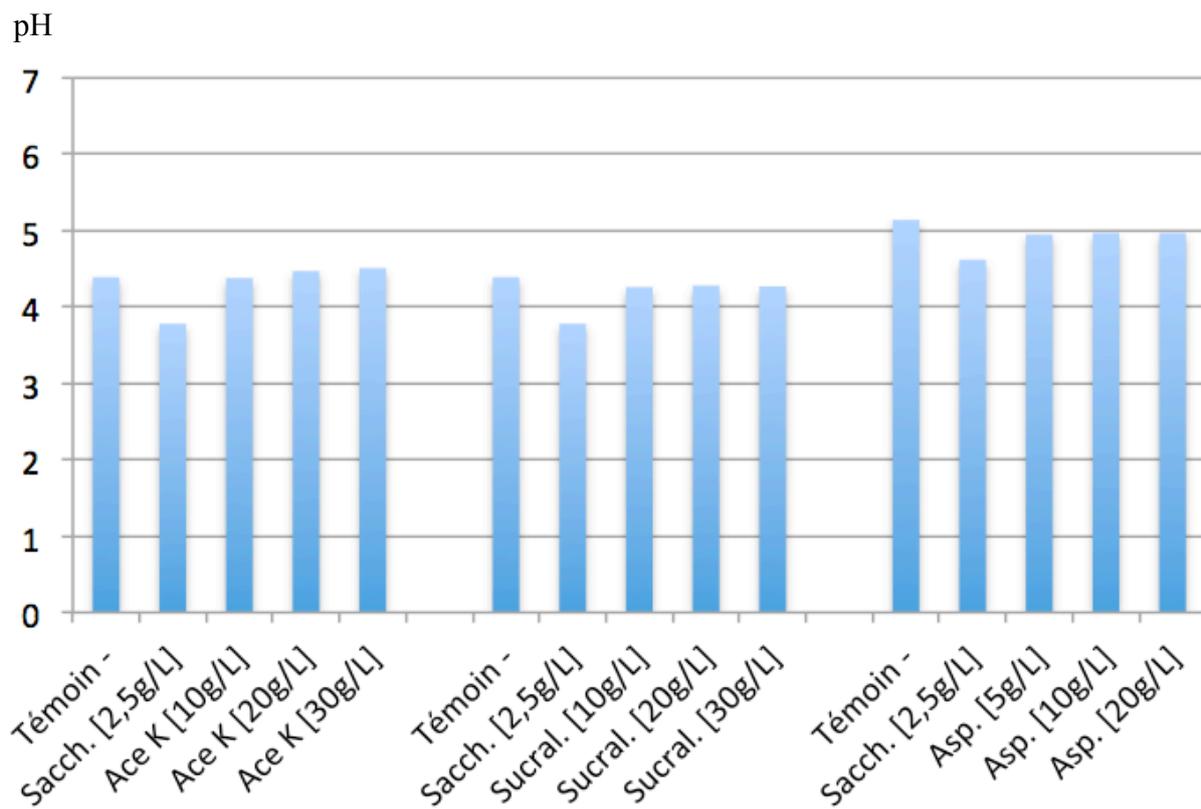


Graphique 14 – pH du milieu de culture de *S. mutans* (Isolat clinique) à T_{=24h}

→ *L. rhamnosus* – ATCC N°7469 :

Ace K	pH	Sucralose	pH	Aspartame	pH
Témoin -	4,39	Témoin -	4,39	Témoin -	5,14
Sacch. [2,5g/L]	3,78	Sacch. [2,5g/L]	3,78	Sacch. [2,5g/L]	4,62
Ace K [10g/L]	4,38	Sucral. [10g/L]	4,26	Asp. [5g/L]	4,95
Ace K [20g/L]	4,47	Sucral. [20g/L]	4,28	Asp. [10g/L]	4,97
Ace K [30g/L]	4,51	Sucral. [30g/L]	4,27	Asp. [20g/L]	4,97

Tableau 15 – pH du milieu de culture de *L. rhamnosus* (ATCC) à T_{=24h}

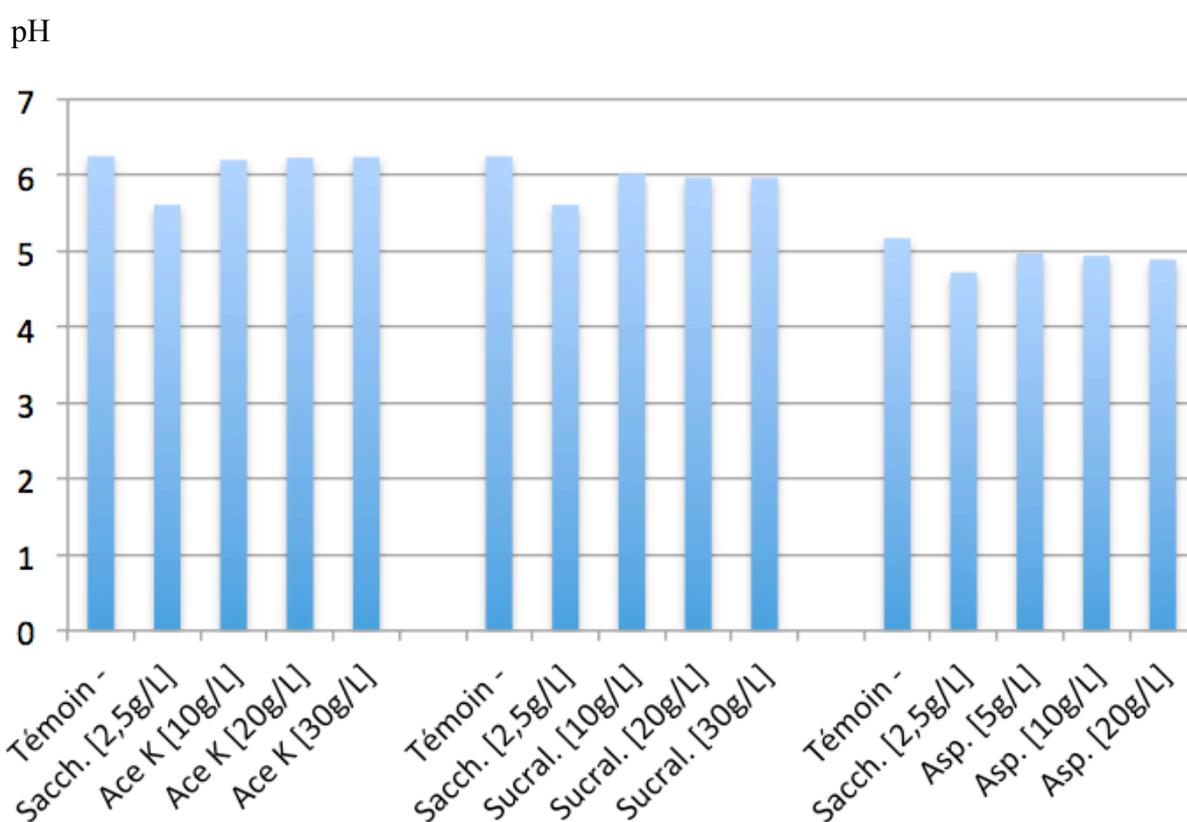


Graphique 15 – pH du milieu de culture de *L. rhamnosus* (ATCC) à T_{=24h}

→ *L. rhamnosus* – Isolats cliniques :

Ace K	pH	Sucralose	pH	Aspartame	pH
Témoin -	6,25	Témoin -	6,25	Témoin -	5,17
Sacch. [2,5g/L]	5,61	Sacch. [2,5g/L]	5,61	Sacch. [2,5g/L]	4,72
Ace K [10g/L]	6,20	Sucral. [10g/L]	6,02	Asp. [5g/L]	4,97
Ace K [20g/L]	6,23	Sucral. [20g/L]	5,97	Asp. [10g/L]	4,94
Ace K [30g/L]	6,24	Sucral. [30g/L]	5,97	Asp. [20g/L]	4,89

Tableau 16 – pH du milieu de culture de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) à T_{=24h}



Graphique 16 – pH du milieu de culture de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) à T_{=24h}

Les mesures de pH ne montrent pas de différences entre les milieux contenant de l'acésulfame K, du sucralose ou de l'aspartame et les milieux témoins négatifs. Le pH des milieux contenant du saccharose est légèrement plus acide mais cette différence n'est pas significative (voir partie IV : analyse et discussion).

3. Adhérence

Résultats classés selon l'échelle visuelle de Murchison [27] :

→ *S. mutans* – ATCC N°25175 :

SM - ATCC	Série	T=24h	T=48h
Sacch.	1	3-4	3-4
	2	3-4	3-4
	3	3-4	3-4
Asp.	1	3-4	3-4
	2	3-4	3-4
	3	3-4	3-4
Ace K	1	3-4	3-4
	2	3-4	3-4
	3	3-4	3-4
Sucralose	1	3-4	3-4
	2	3-4	3-4
	3	3-4	3-4

Tableau 17 – Scores d'adhérence selon l'échelle de Murchison de *S. mutans* ATCC N°25175

→ *S. mutans* – Isolats cliniques :

SM - ATCC	Série	T=24h	T=48h
Sacch.	1	3-4	3-4
	2	3-4	3-4
	3	3-4	3-4
Asp.	1	3	3-4
	2	3	3-4
	3	3	3-4
Ace K	1	3	3-4
	2	3	3-4
	3	3	3-4
Sucralose	1	3	3-4
	2	3	3-4
	3	3	3-4

Tableau 18 – Scores d'adhérence selon l'échelle de Murchison de l'isolat clinique de *S. mutans*

→ *Lactobacillus rhamnosus* – Isolats cliniques BAP₃:

SM - ATCC	Série	T=24h	T=48h
Sacch.	1	3	3
	2	3	3
	3	3	3
Asp.	1	3	3
	2	3	3
	3	3	3
Ace K	1	1	1
	2	1	1
	3	1	1
Sucralose	1	3	3
	2	3	3
	3	3	3

Tableau 19 – Scores d'adhérence selon l'échelle de Murchison de *L. rhamnosus* BAP₃

Les tests d'adhérence sur tubes en verres inclinés ne montrent pas d'inhibition du biofilm en présence d'aspartame, d'acésulfame K et de sucralose pour les *Streptococcus mutans* (de souches ATCC et de souches provenant d'isolats cliniques).

Pour les *Lactobacillus rhamnosus*, cette adhérence est moindre pour l'aspartame et le sucralose mais comparable à celle en présence de saccharose. Cependant, elle est fortement réduite en présence d'acésulfame K.

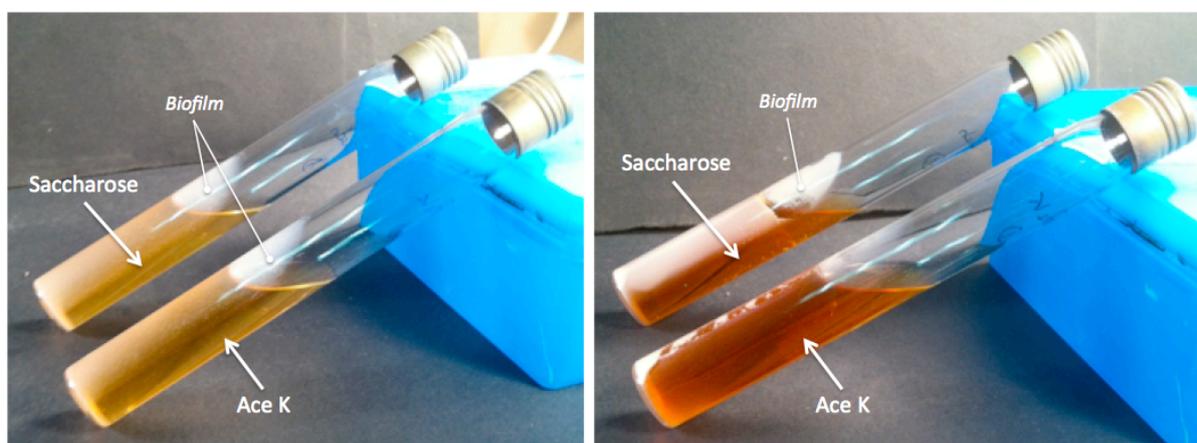


Figure 15 - Vues des tests d'adhérence de *S. mutans* ATCC N°25175 (à gauche) et de *L. rhamnosus* de souche BAP₃ (à droite), en présence d'acésulfame K. (crédit photo : Sallaberry Mathieu)

IV - Analyse et discussion

Le but de cette thèse expérimentale était d'observer l'impact des trois édulcorants intenses les plus utilisés actuellement en substitution au saccharose dans les produits alimentaires ainsi que dans les médicaments (acésulfame K, sucralose et aspartame) sur le potentiel pathogène de deux bactéries fortement impliquées dans le processus carieux.

Pour cela, nous avons utilisé des souches de collection (ATCC) ainsi que des isolats cliniques de *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*.

L'étude portait sur trois paramètres : la croissance bactérienne, l'adhérence et la production d'acides.

Les protocoles mis en œuvre nous ont permis d'atteindre cet objectif.

L'étude de la croissance correspond à un protocole classique, utilisé à de nombreuses reprises dans notre laboratoire, dont les résultats obtenus sont reproductibles.

La méthode de mesure de l'adhérence sur tube en verre [25] [26] est simple et rapide à mettre en œuvre. Celle-ci nous a permis de tester la capacité des bactéries à adhérer sur un support inerte (le verre), qui met en jeu les mêmes processus que ceux de l'adhésion sur l'émail.

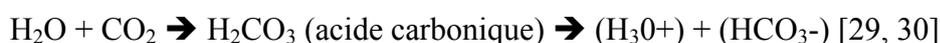
Concernant la production d'acides, les conclusions de l'étude sont moins significatives étant donné que les témoins négatifs (milieu FMM seul + bactéries) ont montré une baisse du pH au cours du temps. Leur pH au bout de 24h pouvait atteindre une valeur inférieure à celle du pH critique (pH=5,5).

Le protocole suivi était inspiré de la méthode initialement décrite par Haukioja et al. [28].

Dans un premier temps, nous avons ajouté une étape de lavage des bactéries dans du sérum physiologique par passage dans une centrifugeuse, afin d'éliminer le glucose contenu dans le milieu servant à la culture over-night.

Malgré cette étape, le pH des témoins négatifs n'a pas cessé de diminuer.

Une 2^e hypothèse sur cette baisse du pH se basait sur le fait que le milieu FMM est préparé à base d'eau distillée. En effet, l'eau distillée dissout le dioxyde de carbone jusqu'à ce qu'il soit en équilibre dynamique avec l'atmosphère selon la formule suivante :



Il se produit alors une augmentation de la concentration en H_3O^+ au cours du temps, lorsque

l'eau distillée est au contact de l'air.

Dans leur expérimentation, Haukioja et son équipe n'ont mesuré le pH que durant 30 minutes [28], ce qui pourrait expliquer qu'il n'y ait pas eu de variations de celui-ci.

Pour notre part, nous avons préféré faire des mesures de pH sur 24h pour mimer une persistance plus longue de l'édulcorant dans la cavité buccale.

Nous avons donc effectué plusieurs mesures de l'eau distillée sur 48 heures. Son pH de base, égal à 7,25 lors de sa production, est resté stable pendant les 30 premières minutes de la mesure. Les flacons ont alors été entreposés dans une étuve à 37°C pour reprendre les mesures le lendemain et le surlendemain.

A T_{24h} , le pH était à 7,23 et à T_{48h} , il a atteint 6,95.

Cette baisse n'est pas assez significative pour expliquer, à elle seule, la forte diminution du pH des témoins négatifs.

Un autre point concerne l'impact des édulcorants sur le pH. La mesure du pH de solutions contenant du milieu FMM et de l'édulcorant, sans ajout de bactérie donne les résultats suivants :

- pH d'une solution FMM seule : à $T_0 = 7,25$; à $T_{24h} = 7,23$
- pH après ajout de saccharose [2,5g/L] : à $T_0 = 7,19$; à $T_{24h} = 6,96$
- pH après ajout d'aspartame [10g/L] : à $T_0 = 5,60$; à $T_{24h} = 5,22$
- pH après ajout d'acésulfame K [10g/L] : à $T_0 = 6,95$; à $T_{24h} = 6,62$
- pH après ajout de sucralose [10g/L] : à $T_0 = 7,02$; à $T_{24h} = 6,82$

Cette variation du pH en fonction de l'édulcorant ajouté est également à prendre en compte, en particulier pour l'aspartame. Sa décomposition en phénylalanine et en acide aspartique peut expliquer cette diminution du pH au cours du temps. [5]

Pour l'acésulfame K et le sucralose, la baisse du pH engendrée n'est pas suffisante pour expliquer les résultats obtenus.

Il existe, à notre connaissance, très peu d'études effectuées sur l'impact de ces trois substituts de sucre sur les bactéries cariogènes, auxquelles nous pouvons comparer nos résultats. Cependant, l'étude de Giacaman et de son équipe sur le potentiel cariogène d'édulcorants [31] démontre une baisse du pH aux alentours de 5,8 pour le sucralose et en dessous de 5,5 pour l'aspartame, au bout de 32 heures.

La numération des UFC sur géloses ne montre pas d'inhibition de croissance pour l'aspartame et le sucralose. Cependant, il est à noter que les UFC formées en présence de

sucralose sont moins viables que celles en présence d'aspartame ou de saccharose. L'acésulfame K n'est pas analysé dans cette étude.

Nous pouvons toutefois également comparer nos résultats avec ceux obtenus avec d'autres substituts tels que le xylitol sur *S. mutans* et *L. rhamnosus*.

Certaines études ont démontré une inhibition de la croissance, due au fait qu'il n'était pas fermenté par les bactéries buccales testées. Une réduction de la production de polysaccharides extracellulaires a également été mise en évidence. [32-34]

En revanche, d'autres études ont démontré la capacité d'adaptation au xylitol de *L. rhamnosus* [35] et de *S. mutans*. [36]

De même, l'absence de propriétés cariogènes du stevioside et du rebaudioside A, composants de la plante stévia a été démontré par l'étude de Das et al. [37], cependant, des études plus récentes remettent en question ce potentiel non cariogène. [24]

Démontrer le pouvoir cariogène ou non-cariogène d'un édulcorant est donc difficile à mettre en évidence, tant les facteurs influençant le processus carieux sont nombreux. Cependant, nos résultats ont pu montrer le pouvoir potentiellement cariogène de ces édulcorants étant donné que la croissance, la production d'acides et l'adhérence ne sont pas inhibées totalement en présence de ces sucres de synthèse. D'autres études seront nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus dans cette thèse. Etudier la possible adaptation des bactéries au cours du temps [35], les interactions entre édulcorants lors de mélanges, ainsi que la synergie entre les différentes espèces bactériennes présentes dans le milieu buccal [38] sont autant de pistes à explorer.

Conclusion

L'utilisation de plus en plus fréquente d'édulcorants intenses dans les produits alimentaires ainsi que dans les médicaments nous a amené à nous questionner sur l'impact de ces sucres de synthèse sur le processus carieux. Peu d'études à ce jour concernent les édulcorants dits intenses. C'est pourquoi nous avons décidé d'étudier *in vitro* le potentiel cariogène de deux bactéries, *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*, en présence des trois édulcorants intenses les plus utilisés actuellement : l'acésulfame K, le sucralose et l'aspartame.

D'après nos résultats, leur caractère non cariogène (inhibition de la croissance bactérienne, de la production d'acides et de l'adhérence) n'a pas été démontré. Cependant, tous les paramètres et conditions caractérisant le milieu buccal n'ont pu être étudiés. Aussi, serait-il intéressant d'analyser ce potentiel cariogène dans des expérimentations *in vivo* ou sur un modèle *in vitro* rassemblant tous ces paramètres : synergies entre les centaines d'espèces bactériennes buccales, présence des facteurs de protection de l'organisme ainsi qu'éléments participant à la digestion du bol alimentaire (enzymes salivaires)...

Une expérimentation sur une période de temps plus grande nous permettrait également d'étudier la possible adaptation des certaines espèces bactériennes à ces nouveaux substrats.

Notre thèse met en évidence le risque cariogène potentiel des trois édulcorants intenses les plus utilisés à l'heure actuelle. D'autres études seront nécessaires afin de s'assurer d'éviter des problèmes de santé publique dans les années et décennies à venir.

Bibliographie

1. Petersen PE. « *Rapport mondial sur la santé bucco-dentaire* » Genève, WHO ; 2003. Disponible sur www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/fr/
2. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M. « *Microbiologie en odonto-stomatologie* » [Ouvrage] Paris, éditions Maloine ; 2006
3. Mouton C, Robert JC. « *Bactériologie Bucco-Dentaire* » [Ouvrage] Paris, éditions Masson ; 1994
4. Collège de la HAS. « *Stratégies de prévention de la carie dentaire – Synthèse et recommandation* » Saint-Denis La Plaine, HAS ; 2010
5. De Reynal B, Multon JL. « *Additifs et auxiliaires de fabrication en industrie agroalimentaire (4^e édition)* » [Ouvrage] Cachan, éditions Lavoisier ; 2009
6. Bradshaw DJ, Marsh PD. « *Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat* » Caries Res. 1994 ; 28(4):251-6
7. Decker EM, Klein C, Schwindt D, et al. « *Metabolic activity of Streptococcus mutans biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose* » Int J Oral Sci. 2014 Dec ; 6(4):195-204
8. Gunepin M, Derache F. « *Impact du xylitol sur le risque carieux - implications militaires* » Médecine Armées. 2010 ; 38(4):369-80
9. Prescott, Harley, Klein et al. « *Microbiologie (3^e édition)* » [Ouvrage] Bruxelles, éditions De Boeck ; 2010
10. Brenner, Don J. « *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2^e édition)* » Int J Syst Evol Microbiol. 2010 ; vol 3, 469-472
11. Quivey RG, Faustoferri RC, Clancy KA, et al. « *Acid adaptation in Streptococcus mutans UA159 alleviates sensitization to environmental stress due to RecA deficiency* » FEMS Microbiol Lett. 1995 ; 126 : 257-262
12. Alais C, Linden G, Miclo L. « *Biochimie Alimentaire (5^e édition)* » [Ouvrage] Paris, éditions Dunod ; 2003
13. Quinn ME, Rowe RC, Sheskey PJ. « *Handbook of Pharmaceutical Excipients (6^e édition)* » [Ouvrage] London, éditions Pharmaceutical Press ; 2009
14. Lotz A, Klug C, Von Rymon Lipinski GW. « *Stability of acesulfame K during high temperature processing under conditions relevant for dairy products* » [Ouvrage] Z. Lebensmtechnol Verfahrenst. 1992 ; 43 (5)

15. National Institutes of Health. « *Toxicity studies of acesulfame potassium* » Bethesda, NIH ; 2005 ; 06-4460
16. Samot J. « *Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux* » [Thèse de Doctorat en Science, Technologie et Santé] Bordeaux 2, Université Victor Ségalen ; 2012
17. Dashper SG, Reynolds EC. « *Characterization of Transmembrane Movement of Glucose and Glucose Analogs in Streptococcus mutans Ingbritt* » J Bacteriol. 1990 ; 172(2):556-63
18. Biokar Diagnostic. « *Fiche produit Gélose Tryptone – Soja* » Disponible sur : [http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/B86A3A73316735D4C1257496003793B8/\\$file/FT_BK014_BM008_114_135_v10.pdf](http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/B86A3A73316735D4C1257496003793B8/$file/FT_BK014_BM008_114_135_v10.pdf)
19. Biokar Diagnostic. « *Fiche produit gélose MRS* » Disponible sur : [http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/92813E7B414F8DE7C12574B80027E8DC/\\$file/FT_BK089_BM089_v7.pdf](http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/92813E7B414F8DE7C12574B80027E8DC/$file/FT_BK089_BM089_v7.pdf)
20. Fluka. « *Fiche produit milieu MITIS Salivarius Agar* » Disponible sur : <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Fluka/Datasheet/01337dat.pdf>
21. Biokar Diagnostic. « *Fiche produit gélose BHI* » Disponible sur : [http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/7386ED76E641D524C12574970025D990/\\$file/FT_BK015_v9.pdf](http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/7386ED76E641D524C12574970025D990/$file/FT_BK015_v9.pdf)
22. Bernard AS, Clède S, Emond M et al. « *Techniques expérimentales en Chimie* » [Ouvrage] Paris, éditions Dunod ; 2014
23. Singleton P. « *Bactériologie – pour la médecine, la biologie et les biotechnologies (6^e édition)* » [Ouvrage] Paris, éditions Dunod ; 2005
24. Mauroux M. « *Etude expérimentale des effets d'un édulcorant à base d'extrait de Stevia Rebaudiana Bertoni sur la croissance de deux bactéries buccales : Streptococcus mutans et Lactobacillus rhamnosus* » [Thèse d'exercice] Bordeaux 2, Université Victor Ségalen ; 2013
25. Mukasa H, Slade HD. « *Mechanism of Adherence of Streptococcus mutans to Smooth Surfaces* » Infect Immun. 1974 Nov ; 10(5):1135-45
26. Hamada S, Torii M. « *Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of Streptococcus mutans and cell adherence to glass surfaces.* » Infect Immun 1978 Jun ; 20(3):592-9
27. Murchison, H, Larrimore S, Curtiss R. « *Isolation and characterization of Streptococcus mutans mutants defective in adherence and aggregation* » Infect Immun. 1981 Dec ; 34(3):1044-55
28. Haukioja A, Söderling E, Tenovuo J. « *Acid Production from Sugars and Sugar Alcohols by Probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria in vitro* » Caries Res. 2008 ; 42(6):449-53

29. Bayle JP. « *400 manipulations commentées de chimie des solutions (volume 2)* » [Ouvrage] Paris, éditions Ellipses ; 2014
30. Burrows A, Holman JS, Parson AF et al. « *Chimie : introduction à la chimie inorganique, organique et à la chimie physique* » [Ouvrage] Bruxelles, éditions De Boeck ; 2012
31. Giacaman RA, Campos P, Muñoz-Sandoval C, et al. « *Cariogenic potential of commercial sweeteners in an experimental biofilm caries model on enamel* » Arch Oral Biol. 2013 Sep ; 58(9):1116-22
32. Bradshaw DJ, Marsh PD. « *Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat* » Caries Res. 1994 ; 28(4):251-6
33. Badet C, Furiga A, Thébaud N. « *Effect of xylitol on an in vitro model of oral biofilm* » Oral Health Prev Dent. 2008 ; 6(4):337-41
34. Decker EM, Klein C, Schwindt D, et al. « *Metabolic activity of Streptococcus mutans biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose* » Int J Oral Sci. 2014 Dec ; 6(4):195-204
35. Badet C, Richard B, Castaing-Debat M, et al. « *Adaptation of salivary Lactobacillus strains to xylitol* » Arch Oral Biol. 2004 Feb ; 49(2):161-4
36. Assev S, Stig S, Scheie AA. « *Cariogenic traits in xylitol-resistant and xylitol-sensitive mutans streptococci* » Oral Microbiol Immunol. 2002 Apr ; 17(2):95-9
37. Das S, Das AK, Murphy RA, et al. « *Evaluation of the cariogenic potential of the intense natural sweeteners stevioside and rebaudioside A* » Caries Res. 1992 ; 26(5):363-6
38. Peltroche-Llacsahuanga H, Hauk CJ, Kock R, et al. « *Assessment of acid production by various human oral micro-organisms when palatinose or leucrose is utilized* » J Dent Res. 2001 Jan ; 80(1):378-84

Annexes

Annexe 1 : Fiches produits des édulcorants utilisés

SIGMA-ALDRICH		3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com	
Properties			
Product Name:	SUCROSE ≥99.5% (HPLC)		
CAS Number	57-50-1		
Empirical Formula (Hill Notation)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		
Molecular Weight	342.30		
Beilstein Registry Number	90825		
EC Number	200-334-9		
MDL number	MFCD00006626		
Grade	for molecular biology		
Product line	BioUltra		
Assay	≥99.5% (HPLC)		
Optical activity	[α] ₂₀ /D +66.5±1°, c = 26% in H ₂ O		
Impurities	DNases, none detected RNases, none detected insoluble matter, passes filter test phosphatases, none detected proteases, none detected		
Ign. residue	≤0.01% (as SO ₄)		
Loss	≤0.1% loss on drying, 20 °C (HV)		
pH	5.0-7.0 (25 °C, 1 M in H ₂ O)		
mp	185-187 °C(lit.)		
Solubility	H ₂ O: soluble 1 M at 20 °C, clear, colorless		
Anion traces	chloride (Cl ⁻): ≤50 mg/kg sulfate (SO ₄ ²⁻): ≤50 mg/kg		
Cation traces	Al: ≤5 mg/kg	As: ≤0.1 mg/kg	Ba: ≤5 mg/kg
	Bi: ≤5 mg/kg	Ca: ≤10 mg/kg	Cd: ≤5 mg/kg
	Co: ≤5 mg/kg	Cr: ≤5 mg/kg	Cu: ≤5 mg/kg
	Fe: ≤5 mg/kg	K: ≤50 mg/kg	Li: ≤5 mg/kg
	Mg: ≤5 mg/kg	Mn: ≤5 mg/kg	Mo: ≤5 mg/kg
	Na: ≤50 mg/kg	Ni: ≤5 mg/kg	Pb: ≤5 mg/kg
	Sr: ≤5 mg/kg	Zn: ≤5 mg/kg	
λ	1 M in H ₂ O		
UV absorption	λ: 260 nm Amax: 0.11 λ: 280 nm Amax: 0.08		

Annexe 1 - 1 – Fiche descriptive du saccharose

Certificate of Analysis

Product Name: ACESULFAME K
for food analysis
Product Number: 04054
Batch Number: BCBK3818V
Brand: Fluka
CAS Number: 55589-62-3
Formula: C₄H₄KNO₄S
Formula Weight: 201.24
Quality Release Date: 22 JAN 2013

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER OR CRYSTALS	CRYSTALS
ASSAY (HPLC WEIGHT %)	≥ 99.0 %	100.0 %
CARBON CONTENT	23.87 % (THEORY)	23.94 %
HYDROGEN CONTENT	2.00 % (THEORY)	2.14 %
NITROGEN CONTENT	6.96 % (THEORY)	7.03 %
SULFUR CONTENT (S/C- -ANALYSIS)	15.93 % (THEORY)	15.8 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

Certificate of Analysis

Product Name: SUCRALOSE
Product Number: >= 98.0 % HPLC
69293
Batch Number: BCBK6457V
Brand: Sigma
CAS Number: 56038-13-2
Formula: C₁₂H₁₉Cl₃O₈
Formula Weight: 397.63
Quality Release Date: 27 FEB 2013

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	COLORLESS OR WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	≥ 98.0 %	99.7 %
SPECIFIC ROTATION (20/D)	86.0 ± 2.0 DEGREES	87.1 DEGREES
CONCENTRATION	C=1 IN WATER	C=1 IN WATER
CARBON CONTENT	36.25 % (THEORY)	36.19 %
HYDROGEN CONTENT	4.82 % (THEORY)	4.57 %
PROTON NMR SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS



Dr. Claudia Geitner
Manager Quality Control
Buchs, Switzerland

Sigma-Aldrich warrants that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

TGE305210

Product: AJINOMOTO ASPARTAME FINE GRANULAR DM
 Conditioning: Drums (fûts) 25 Kg
 Lot n°: TGE305210



Manufacturing date: 21-MAY-2013
 Expiration date: 22-MAY-2018
 Description: Crystalline, white fine granular, odourless and sweet, slightly hygroscopic, sparingly soluble or slightly soluble in water and in alcohol, practically insoluble in hexane and in methylene chloride.

Tests:	Method:	Specifications:	Results:
IDENTITY TEST			
Identity test	EP, JPE, FCC, JSfA	Conform to standard	Conform to specification
PURITY			
Assay (Dried basis)	EP, USP, JPE, FCC, JSfA	98.0 - 102.0 %	99,1
Loss on drying	EP, USP, FCC, JSfA, EU, JECFA	≤ 4.5 %	2,63
Diketopiperazine	EP	≤ 1.5 %	0,06
Residue on ignition	EP, USP, JPE, FCC, JSfA	≤ 0.2 %	Conform to specification
Heavy metals (as Pb)	EP, USP	≤ 10 mg/kg	Conform to specification
Arsenic (as As)	ASE	≤ 3 mg/kg	Conform to specification
Lead	ASE	≤ 1 mg/kg	Conform to specification
Specific rotation (at 20°C)	EP, USP, JPE, FCC, JSfA, EU, JECFA	+14.5° to 16.5 °	15,3
Transmittance	USP, EU, JECFA	≥ 95.0 %	99,9
pH	FCC, JPE, JSfA, EU, JECFA	4.5 to 6.0	5,19
Conductivity	EP	≤ 30 µS/cm	Conform to specification
Impurities other than DKP	ASE	≤ 1.0 %	Conform to specification
Related substances (1)	EP	≤ 1.5 %	Conform to specification
L-aspartyl-L-Phenylalanine	EP	≤ 0.25 %	Conform to specification
L-Phenylalanine	EP	≤ 0.5 %	Conform to specification
Residual solvents	ASE	Meets requirements	Conform to specification
Appearance of solution	EP	Clear and not more coloured than GY6	Conform to specification
MICROBIOLOGICAL PROPERTIES			
Total aerobic bacteria	ASE	≤ 250 CFU/g	< 10
Yeast and mold	ASE	≤ 100 CFU/g	< 10
Coliforms	ASE	≤ 10 CFU/g	Conform to specification
E. Coli	ASE	Negative / g	Conform to specification
Salmonella	RAY 32/02-09/08	Negative / 25g	Conform to specification
PHYSICAL PROPERTIES			
Particle size (on 250 µm)	ASE	≤ 5 %	0,4
Particle size (through 150 µm)	ASE	≥ 40 %	46,7
particle size (through 75 µm)	ASE	≤ 10 %	0,5
Bulk density	ASE	0.55 +/- 0.10 g/ml	Conform to specification

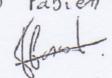
Quality system of AJINOMOTO Sweeteners Europe SAS. is certified ISO 9001(2008) by SGS. This lot is in compliance with specification AJINOMOTO ASPARTAME n° ASE 1035. Methods version = ASE: internal method ; EP: 7 th Ed (2011); USP: USP35-NF30 (2012); FCC: 8th Ed (2012); JSfA: 8th Ed (2007); EU: 231/2012; JECFA: Monography1 (2006). (1) Sum of impurities other than imp A and imp C for EP and other than imp A for USP.

Manufacturer and Distribution :



Ajinomoto Sweeteners Europe SAS.
 Port 7516 Gravelines F-59820
 Tel : +33 (0)3 28 22 74 74
 Fax : +33 (0)3 28 22 75 75

Lot reviewed and released by Quality Manager
 Quality Product Manager JF.CORREIA
 Date : 27-MAY-2013

P.O Fabien Forest


Annexe 2 : Résultats des mesures de pH détaillés

	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Moyenne
Témoin -	5,66	5,72	5,84	5,74
Sacch. [2,5g/L]	4,44	4,40	4,38	4,41
Ace K [10g/L]	5,57	5,72	5,76	5,68
Ace K [20g/L]	5,84	5,85	5,87	5,85
Ace K [30g/L]	5,92	5,92	5,92	5,92
Témoin -	5,66	5,72	5,84	5,74
Sacch. [2,5g/L]	4,44	4,40	4,38	4,41
Sucralose [10g/L]	5,71	5,69	5,66	5,69
Sucralose [20g/L]	5,67	5,64	5,64	5,65
Sucralose [30g/L]	5,64	5,64	5,62	5,63
Témoin -	5,08	5,04	5,06	5,06
Sacch. [2,5g/L]	4,54	4,47	4,41	4,47
Asp [5g/L]	4,98	4,96	4,97	4,97
Asp [10g/L]	4,95	4,96	4,94	4,95
Asp [20g/L]	4,87	4,87	4,87	4,87

Tableau 20 – pH détaillés des milieux de culture de *S. mutans* (ATCC 25175) à T_{=24h}

	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Moyenne
Témoin -	5,792	5,964	6,068	5,94
Sacch. [2,5g/L]	4,486	4,606	4,488	4,53
Ace K [10g/L]	5,977	6,124	6,178	6,09
Ace K [20g/L]	6,170	6,232	6,188	6,20
Ace K [30g/L]	6,174	6,231	6,183	6,20
Témoin -	5,792	5,964	6,068	5,94
Sacch. [2,5g/L]	4,486	4,606	4,488	4,53
Sucralose [10g/L]	6,144	6,161	6,149	6,15
Sucralose [20g/L]	6,165	6,108	6,138	6,14
Sucralose [30g/L]	6,082	6,086	6,047	6,07
Témoin -	5,075	5,072	5,074	5,07
Sacch. [2,5g/L]	4,008	3,99	3,915	3,97
Asp [5g/L]	4,948	4,951	4,954	4,95
Asp [10g/L]	4,937	4,951	4,954	4,95
Asp [20g/L]	4,881	4,875	4,883	4,88

Tableau 21 – pH détaillés des milieux de culture de *S. mutans* (Isolat clinique) à T_{=24h}

	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Moyenne
Témoin -	4,421	4,384	4,361	4,39
Sacch. [2,5g/L]	4,103	3,095	4,128	3,78
Ace K [10g/L]	4,371	4,377	4,378	4,38
Ace K [20g/L]	4,438	4,454	4,507	4,47
Ace K [30g/L]	4,503	4,526	4,502	4,51
Témoin -	4,421	4,384	4,361	4,39
Sacch. [2,5g/L]	4,103	3,095	4,128	3,78
Sucralose [10g/L]	4,296	4,253	4,244	4,26
Sucralose [20g/L]	4,286	4,261	4,286	4,28
Sucralose [30g/L]	4,282	4,267	4,271	4,27
Témoin -	5,157	5,170	5,093	5,14
Sacch. [2,5g/L]	4,595	4,609	4,643	4,62
Asp [5g/L]	4,933	4,950	4,961	4,95
Asp [10g/L]	4,958	4,977	4,982	4,97
Asp [20g/L]	4,934	4,900	4,948	4,93

Tableau 22 – pH détaillés des milieux de culture de *L. rhamnosus* (ATCC 7469) à T_{=24h}

	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Moyenne
Témoin -	6,384	6,227	6,138	6,25
Sacch. [2,5g/L]	5,648	5,575	5,600	5,61
Ace K [10g/L]	6,175	6,229	6,204	6,20
Ace K [20g/L]	6,241	6,231	6,215	6,23
Ace K [30g/L]	6,228	6,237	6,246	6,24
Témoin -	6,384	6,227	6,138	6,25
Sacch. [2,5g/L]	5,648	5,575	5,600	5,61
Sucralose [10g/L]	6,031	6,002	6,019	6,02
Sucralose [20g/L]	5,991	5,969	5,952	5,97
Sucralose [30g/L]	5,978	5,96	5,962	5,97
Témoin -	5,263	5,146	5,106	5,17
Sacch. [2,5g/L]	4,725	4,723	4,709	4,72
Asp [5g/L]	4,989	4,951	4,973	4,97
Asp [10g/L]	4,945	4,942	4,943	4,94
Asp [20g/L]	4,89	4,893	4,895	4,89

Tableau 23 – pH détaillés des milieux de culture de *L. rhamnosus* (Isolat clinique) à T_{=24h}

Vu, le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, la Directrice de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :

Serment d'Hippocrate

En présence de mes Maîtres et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de l'art dentaire.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un honoraire au-dessus de mon travail. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés. Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Mes connaissances et mon état ne serviront ni à diffuser des propos non avérés, ni à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des conditions de croyance, de nation et de race viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je promets et je jure de conformer strictement ma conduite professionnelle aux principes et aux règles prescrites par le code de déontologie.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Discipline : Microbiologie

Etude expérimentale de l'action de trois édulcorants sur deux bactéries buccales potentiellement cariogènes

Résumé :

Les édulcorants intenses, en particulier l'acésulfame K, le sucralose et l'aspartame, sont de plus en plus utilisés en substitution au saccharose dans les produits alimentaires ainsi que dans les médicaments. Cependant, peu d'études ont été publiées à ce jour, sur les effets potentiellement cariogènes de ces édulcorants intenses. L'objectif de cette thèse a été de déterminer si ces édulcorants avaient un impact sur le déroulement du processus carieux. Pour cela, nous avons utilisé deux bactéries particulièrement impliquées dans ce processus : *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus rhamnosus*. L'analyse de la croissance bactérienne ainsi que les mesures de pH ont été réalisées par mise en culture des bactéries dans un milieu de fermentation minimale (FMM), dépourvu de sucre, auquel nous avons ajouté différentes doses d'édulcorants. L'adhérence a été étudiée selon la méthode d'Hamada et Torii, sur des tubes de verre inclinés. Nos résultats montrent une inhibition de la croissance pour *S. mutans* en présence d'acésulfame K et d'aspartame. Le sucralose n'entraîne pas d'inhibition. Concernant *L. rhamnosus*, aucun des trois édulcorants n'a entraîné d'inhibition. La présence des substituts de sucre n'entraîne pas de modifications de pH du milieu. Pour l'étude de l'adhérence, aucune inhibition n'a été constatée, quel que soit l'édulcorant testé, sauf pour l'acésulfame K pour *L. rhamnosus*. D'après nos résultats, le caractère non cariogène de ces édulcorants n'a pas été démontré. D'autres études seront nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer nos résultats.

Mots-clés : Edulcorant intense - Acésulfame K – Sucralose – Aspartame - *Streptococcus mutans* - *Lactobacillus rhamnosus* - Carie dentaire - Bactéries buccales

Experimental study of the action of three sweeteners on two potentially cariogenic oral bacteria

Summary :

High-intensity sweeteners, like acesulfame K, sucralose and aspartame, are more and more used as a substitute for sucrose, in food products and in medication. However, few studies have been published on potentially cariogenic effects of high-intensity sweeteners. The aim of this thesis was to determine if these sweeteners impacted on the caries process. For this, we used two particular bacteria involved in this process : *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus rhamnosus*. Analysis of bacterial growth and pH measurements were carried out by culturing bacteria in fermentation minimal medium (FMM), devoid of sugar, which we added different doses of sweeteners. Adhesion was studied according to the method of Hamada and Torii, on glass tubes inclined. Our results show an inhibition of *S. mutans*' growth in the presence of acesulfame-K and aspartame. Sucralose does not cause inhibition. Concerning *L. rhamnosus*, none of the three sweeteners has led to inhibition. The presence of sugar substitutes do not result in medium pH changes. To study the adhesion, no inhibition was observed, regardless of the tested sweetener, excepted for acesulfame K to *L. rhamnosus*. Based on our results, the non-cariogenic character of these sweeteners has not been demonstrated. Further studies are needed to test the impact of these synthetic sugars on all oral bacteria to confirm or refute our results.

Key-words : Intense sweetener - Acesulfame K – Sucralose – Aspartame - *Streptococcus mutans* - *Lactobacillus rhamnosus* – Tooth decay – Oral bacteria

Université de Bordeaux – Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences odontologiques
16-20 Cours de la Marne
33082 BORDEAUX CEDEX