

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

Année 2016

N° 34

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

Présentée et soutenue publiquement

Par Marine Jenny-May LAI WAI

Née le 31 mai 1991 au Port (La Réunion)

Le 10 mai 2016

Etude de l'effet de la vanilline sur des bactéries buccales à l'état planctonique et en biofilm.

Directeur de thèse :

Docteur Marie-Cécile Badet

Membres du jury :

Président	Mme Véronique DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Mme Marie-Cécile BADET	Maître de conférences des Universités
Rapporteur	Mme Darrène NGUYEN	Assistante Hospitalo-Universitaire
Assesseur	M. Christophe BOU	Maître de conférences des Universités

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ 01/02/2016

Président M. TUNON DE LARA Manuel
Directeur de Collège des Sciences de la Santé M. PELLEGRIN Jean-Luc

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES ODONTOLOGIQUES

Directrice Mme BERTRAND Caroline 58-02
Directrice Adjointe – Chargée de la Formation initiale Mme ORIEZ-PONS Dominique 58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche M. FRICAIN Jean-Christophe 57-02
Directeur Adjoint – Chargé des Relations Internationales M. LASSERRE Jean-François 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. 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. Jean-Christophe COUTANT Sciences anatomiques et physiologiques 58-03
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
M. Adrien NAVEAU Prothèse dentaire 58-02
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.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Julien	BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Cédric	FALLA	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	58-01
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
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
M.	Ali	NOUREDDINE	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
			Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Jean-Philippe	PIA	Prothèse dentaire	58-02
M.	Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
Mme	Charlotte	RAGUENEAU	Prothèse dentaire	58-02
M.	Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-02
M.	François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01
			Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
			Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

Remerciements

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 mon profond respect.

A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences biologiques 56-02

Je vous suis infiniment reconnaissante de m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette expérience au sein de votre laboratoire. Tout au long de cette étude vous avez répondu présente à chacune de mes interrogations avec patience, disponibilité et gentillesse. Merci de m'avoir guidé, encouragé lors des travaux d'expériences mais aussi lors de la rédaction de cette thèse.

Veillez trouver ici l'expression de ma plus vive reconnaissance, ainsi que la marque de mes sentiments les plus respectueux.

A notre Rapporteur de thèse

Madame le Docteur Darrène NGUYEN

Assistant Hospitalo-Universitaire

Sous-section Sciences biologiques 57-03

Je vous remercie vivement pour votre aide, vos précieux conseils et votre gentillesse tout au long de l'élaboration de ce travail. Vous avez très aimablement accepté d'être mon rapporteur de thèse.

Veillez trouver dans cette thèse le témoignage de toute ma gratitude.

A notre Assesseur

Monsieur le Docteur Christophe BOU

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Prévention épidémiologie _ Economie de la Santé _ Odontologie légale 56-03

Je vous suis reconnaissante de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail en qualité d'assesseur.

Soyez assuré de mon profond respect.

Je dédie cette thèse,

A mes parents, pour leur confiance et leur soutien sans faille tout au long de mes études, pour leur amour sans limite au quotidien. Pour leur générosité et les sacrifices qu'ils ont du faire pour que je puisse réussir. Je ne vous le dirais jamais assez mais merci de tout cœur.

A Caroline, pour sa force de caractère et sa joie de vivre. Elle qui a toujours été là durant mes études pour me soutenir.

A Valérie, même si la distance nous sépare, tes conseils sont toujours les bienvenus. Merci à la « petite technicienne de la famille » pour ton soutien et ton aide.

A vivien, merci pour ta patience, ton soutien, ta gentillesse et ton amour. Depuis le début tu es présent à chaque instant. Merci pour tout.

A popor, qui n'a de cesse que de m'encourager encore et encore. Je te dis merci beaucoup..

A ma famille, merci pour votre soutien et vos encouragements.

A mes amis, pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble. Merci à vous.

Merci à Martine pour son aide si précieuse lors de mes expériences au laboratoire.

Table des matières

Introduction	10
Partie 1 : état des connaissances.....	11
I. La maladie carieuse	11
1. Epidémiologie	11
2. Etiopathogénie.....	13
➤ Mécanisme de la carie (8, 11)	13
➤ Les bactéries impliquées dans le processus carieux (7, 15)	14
➤ Le biofilm.....	15
II. Les maladies parodontales (18, 19 et 26).....	18
1. Définitions	18
2. Généralités (21).....	18
3. Classifications	18
➤ Flore des parodontites chroniques.....	19
➤ Flore des parodontites agressives	19
➤ Flore des parodontites associées à des maladies systémiques ou infectieuses	20
➤ Flore des maladies parodontales nécrotiques	20
➤ Flore des parodontites réfractaires	20
4. Les complexes microbiens	21
III. L'halitose.....	22
1. Définitions	22
2. Etiologies (37, 40).....	22
➤ Origine buccale	22
➤ Autres origines	23
IV. La vanilline (50, 51, 52, 53).....	24
1. Historique (53, 54, 55, 56)	24
2. Généralités (50, 51, 53).....	24
3. Propriétés physicochimiques de la vanilline (57, 59)	25
4. Les propriétés physiologiques de la vanilline (63).....	25

5.	Propriétés et utilisations de la vanilline (52)	25
➤	Propriétés anti-cancer : (1, 65)	26
➤	Antioxydants : (64, 66,67,68).....	26
➤	Anti-dépresseur (69).....	26
➤	Lutte contre l'insomnie : (69).....	26
➤	Relaxative :	26
➤	Aphrodisiaque : (70).....	26
➤	Beauté (69)	27
➤	Pharmaceutique	27
V.	Les bactéries étudiées	28
1.	Streptococcus mutans	28
2.	Lactobacilles rhamnosus (6, 73, 23, 16,74, 75).....	28
3.	Actinomyces viscosus (7).....	29
4.	Tannerella forsythia (6, 12, 81)	30
	Partie 2 : Protocole expérimental	31
I.	Matériels et méthodes.....	31
1.	Le matériel.....	31
➤	Les substances utilisées	31
➤	Les souches utilisées	32
➤	Les milieux de culture	32
	Les milieux liquides.	32
	Les géloses.	33
2.	Méthodes	33
➤	Test d'inhibition de croissance : méthode par dilution	34
➤	Test d'adhérence sur tube de verre inclinés (83).....	35
➤	Test d'adhérence bactérienne : biofilm pluri-espèces (84)	35
	Biofilm	36
➤	Préparation de la salive	36
➤	Le support du biofilm.....	36
➤	Préparation du biofilm	36
II.	Résultats (voir annexe 4).....	38
1.	Inhibition de croissance : Méthode par dilution.....	38

➤ Pour <i>Streptococcus mutans</i> ATCC.....	38
➤ Pour <i>Tannerella forsythia</i> ATCC.....	38
➤ Pour <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC et l'isolat clinique	39
Pour <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC.....	39
Pour <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (isolat clinique)	40
➤ Pour <i>Actinomyces viscosus</i> ATCC et l'isolat clinique	41
2. Inhibition d'adhérence : test des tubes de verre inclinés mono espèce	43
➤ L'isolat clinique <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	43
➤ Pour <i>Actinomyces viscosus</i> ATCC	43
➤ Pour l'isolat clinique <i>Actinomyces viscosus</i>	44
3. Inhibition d'adhérence : test sur biofilm pluri-espèces	45
III. Discussion	46
Conclusion.....	48
Annexes.....	49
Références	55

Introduction

Les maladies bucco-dentaires sont probablement les maladies bactériennes les plus fréquentes survenant chez l'homme. Elles sont provoquées par un développement excessif de bactéries pathogènes au sein du biofilm dentaire. Il existe plusieurs méthodes permettant d'éliminer ce biofilm adhérent aux surfaces dentaires, qu'elles soient mécaniques (brosse à dents, soie dentaire) et / ou chimiques (chlorhexidine, fluor ...). Cependant, un bain de bouche ayant une activité inhibitrice sur la plaque dentaire sans détruire les bactéries orales indigènes pourrait être une alternative à des molécules antiseptiques agressives pour l'équilibre de l'écosystème buccal. Ainsi, de nouveaux principes actifs sont constamment testés.

La vanilline constitue l'un des composants multiples de l'arôme naturel de la vanille. Cette molécule est caractéristique et émet un parfum agréable, d'où son utilisation très répandue dans l'industrie agro-alimentaire. Mais elle présente aussi diverses propriétés qui, à ce jour, n'ont été que partiellement étudiées. Des recherches antérieures ont toutefois montré son activité anticancéreuse et son pouvoir cicatrisant (1,2). Son activité antibactérienne a déjà été prouvée dans le domaine agro-alimentaire sur *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. (3,4). En 2009 au sein de notre laboratoire, des travaux ont été effectués sur l'activité de la vanilline sur quatre bactéries buccales : *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum* ainsi que sur un biofilm pluri-espèces statique (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum*). Cette étude a montré le potentiel inhibiteur cette molécule sur des souches de collection.

L'objectif de ce travail est de tester l'efficacité de la vanilline à différentes concentrations sur les bactéries potentiellement pathogènes pour la cavité buccale (isolats cliniques des espèces précédemment testées et nouvelles espèces). Nous testerons aussi son efficacité sur un modèle de biofilm dentaire.

Dans une première partie nous ferons un point sur l'état des connaissances sur la maladie carieuse, la maladie parodontale, la vanilline et le biofilm dentaire ainsi qu'un rappel sur les quatre bactéries que nous allons étudier, *Tannerella forsythia*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus* et *Streptococcus mutans*.

Puis nous expliquerons nos méthodes et nos résultats obtenus en laboratoire pour réaliser nos expériences.

Partie 1 : état des connaissances

90 % de la population mondiale souffrira, au cours de sa vie, de maladies bucco dentaires allant de caries et maladies parodontales jusqu'aux cancers de la cavité buccale. Bien qu'il existe plus d'un million de dentistes qualifiés dans le monde, seulement 60% de la population mondiale bénéficie d'un accès aux soins buccodentaires. Ce dernier chiffre peut s'expliquer par la répartition inégale de ces dentistes sur le territoire mondial. En effet, il n'y a que 300 000 dentistes qui occupent les régions les plus pauvres. (5,6)

I. La maladie carieuse

1. Epidémiologie

La carie dentaire est une maladie infectieuse multifactorielle, qui même si on observe une diminution de sa prévalence dans les pays industrialisés (7) reste un problème de santé publique majeur, car en 2014 elle concernait 60 %-90 % des enfants d'âge scolaire dans le monde (5). Elle touche également la grande majorité des adultes. (8,9)

L'indice CAOD (dents cariées, absentes et obturées) a été mis au point par Klein et Palmer en 1940. C'est un indice de sévérité de l'atteinte carieuse qui permet de mesurer les antécédents carieux de la dentition permanente. (10, 11)

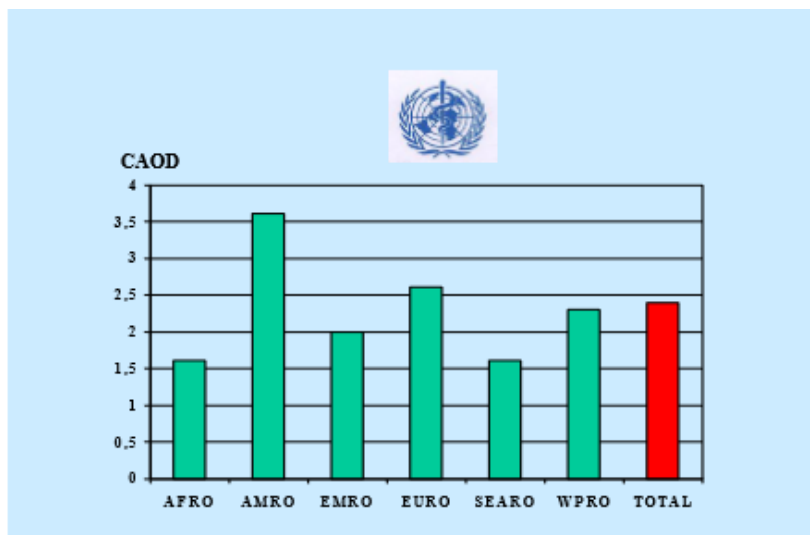


Figure 1 : Caries dentaires (indice CAOD) chez les enfants âgés de 12 ans selon les bureaux régionaux OMS (Source: Banque de données de l'OMS sur la santé bucco-dentaire et Programme OMS sur les profils de santé bucco-dentaire par pays/région, 2000).

Grâce à de nombreuses études épidémiologiques qui ont été réalisées précédemment, il est prévu pour les années à venir une augmentation de l'indice CAOD dans des pays en développement et une baisse dans de nombreux pays industrialisés (10).

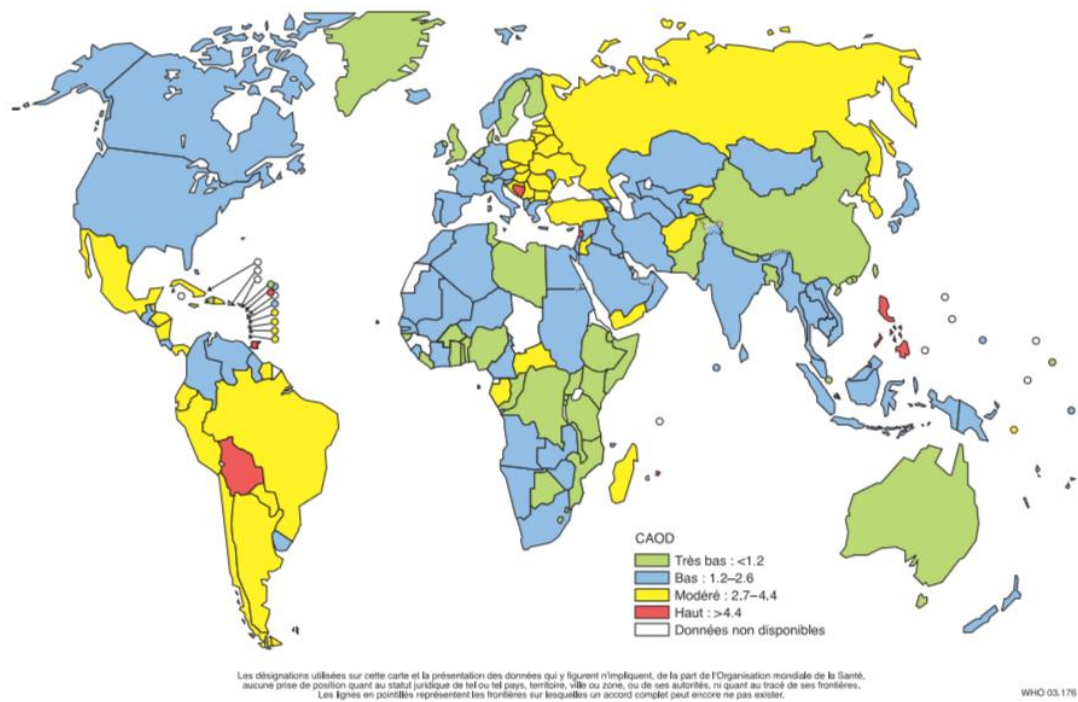


Figure 2 : La carie dentaire (CAOD) dans le monde chez les enfants de 12 ans en 2003. (10)

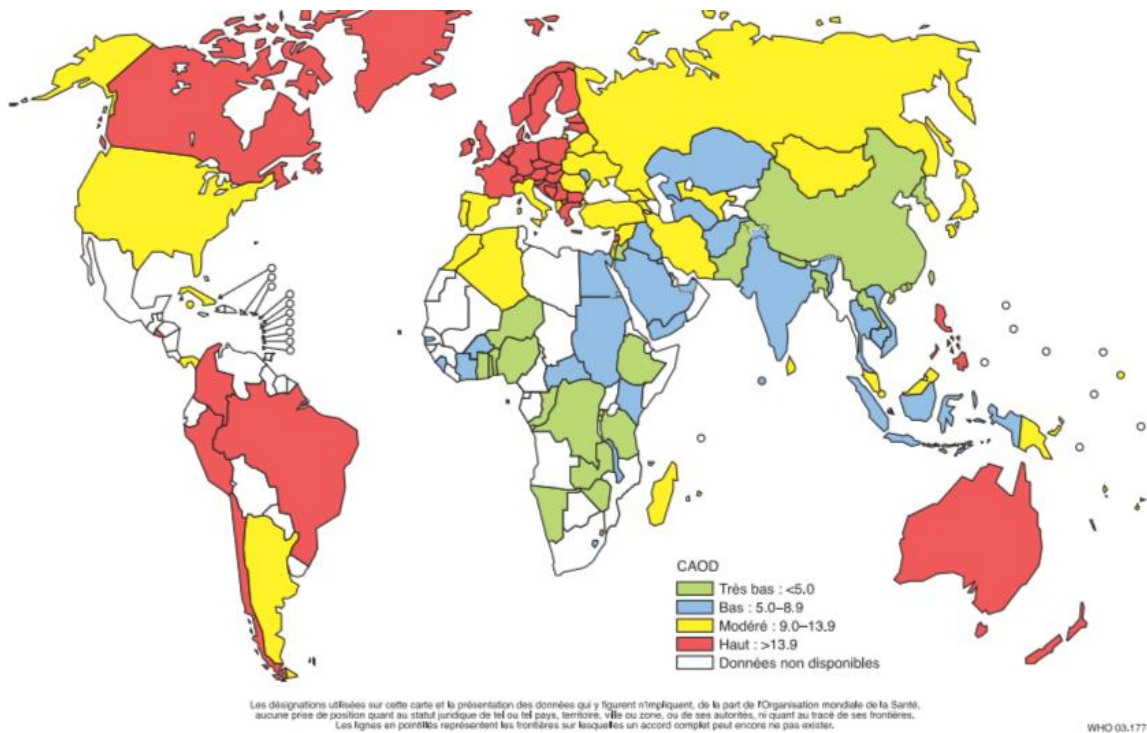


Figure 3 : La carie dentaire (CAOD) dans le monde chez les adultes de 35-44 ans en 2003. (10)

2. Etiopathogénie

La carie dentaire est une maladie infectieuse qui se manifeste par une déminéralisation acide d'origine bactérienne. Trois genres bactériens ont démontré des propriétés cariogènes chez l'homme : *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Actinomyces*. (17)

➤ **Mécanisme de la carie (8, 11)**

Une carie est la conséquence de la production locale d'acides organiques par les bactéries cariogènes (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* et *Actinomyces*) contenues dans la plaque dentaire qui se nourrissent d'hydrates de carbone présents dans les sucres fermentescibles (ex : saccharose) Cette acidité est alors responsable de la baisse du pH et par conséquent des phénomènes de déminéralisation des surfaces dentaires. (12)

Dans des conditions physiologiques, il y a une alternance de phases de déminéralisation et de reminéralisation de l'émail des dents. Cette reminéralisation est possible grâce à la présence de calcium, de phosphate et de fluor dans la salive ; et au **pouvoir tampon de la salive**. Pour qu'une carie se développe il faut qu'il se produise un déséquilibre durable en faveur de la déminéralisation, c'est-à-dire un temps de contact prolongé et/ou répété entre les bactéries, les sucres et l'émail de la dent et/ou une diminution du pouvoir tampon de la salive.

Le schéma de Keyes modifié résume bien l'étiologie de la carie dentaire. Il existe 3 facteurs de risque principaux qui interagissent pour créer une carie dentaire :

- Le facteur **bactérien** (une flore riche en bactéries cariogènes (*S. mutans*) augmente la production d'acides.(13)
- Le facteur **alimentaire** (une consommation de sucres fermentescibles trop importante ou trop fréquente (grignotage) augmente le risque carieux.) (13)
La consommation élevée de sucres est le principal facteur de risque de carie dentaire (5)
- Et le facteur de la **personne / hôte** (qualité de la salive, qualité de l'émail, anatomie dentaire, sillons anfractueux)

D'autre part, les facteurs **comportementaux** (bonnes habitudes de brossage et des contrôles réguliers), sociaux et **environnementaux** (exposition appropriée aux fluorures) sont aussi des déterminants à prendre en compte dans le développement carieux. (5, 10, 14)

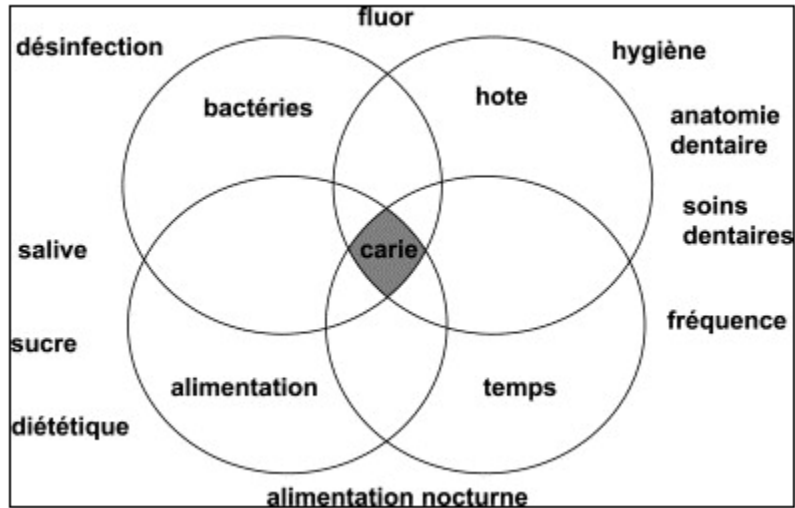


Figure 4 : Schéma de Keyes modifié. (8)

➤ **Les bactéries impliquées dans le processus carieux (7, 15)**

Les espèces directement impliquées dans les processus carieux sont : *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Actinomyces naeslundii*. (12)

	Fosses Sillons	Surfaces lisses	Surfaces radiculaires	Dentine
<i>Streptococcus mutans</i>	+++	+++	++	+
<i>Streptococcus sanguis</i>	+	-	+	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	+	-	+	-
<i>Streptococcus mitis</i>	+	-	-	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	+	-	-	-
<i>Actinomyces sp.</i>	+	-	+	++
<i>Lactobacillus sp.</i>	++	-		++

Tableau 1 : Capacité cariogène des principales bactéries de la flore buccale en fonction de leur localisation. (12)

- Le **groupe *Streptococcus mutans*** : il est impliqué dans les premiers stades du développement des caries.
- Le **groupe *Lactobacillus sp*** : intervient surtout dans la progression et l'évolution de la carie.
- Le **groupe *Actinomyces sp*** : se retrouve essentiellement dans les caries radiculaires et cémentaires.

➤ Le biofilm

Un biofilm est une communauté de microorganismes, adhérents à une surface et englués dans une matrice de polymères. Les relations spatiales y sont prédéterminées dans un cycle coordonné par les molécules de signal.

Dans la cavité buccale, les microorganismes colonisent et adhèrent aux surfaces dentaires et sont englués dans une matrice d'exopolysaccharides formant ainsi le biofilm dentaire communément appelé **plaque dentaire**.

L'adhérence est primordiale pour que les bactéries persistent, survivent et puissent par la suite former un biofilm.

Ce biofilm dentaire peut contenir des espèces de bactéries cariogènes. Les acides produits par les bactéries (fermentation lactique) sont maintenus au contact de l'émail. De plus, le pouvoir tampon de la salive est beaucoup moins efficace car le biofilm dentaire agit comme une barrière empêchant l'action des systèmes tampons.

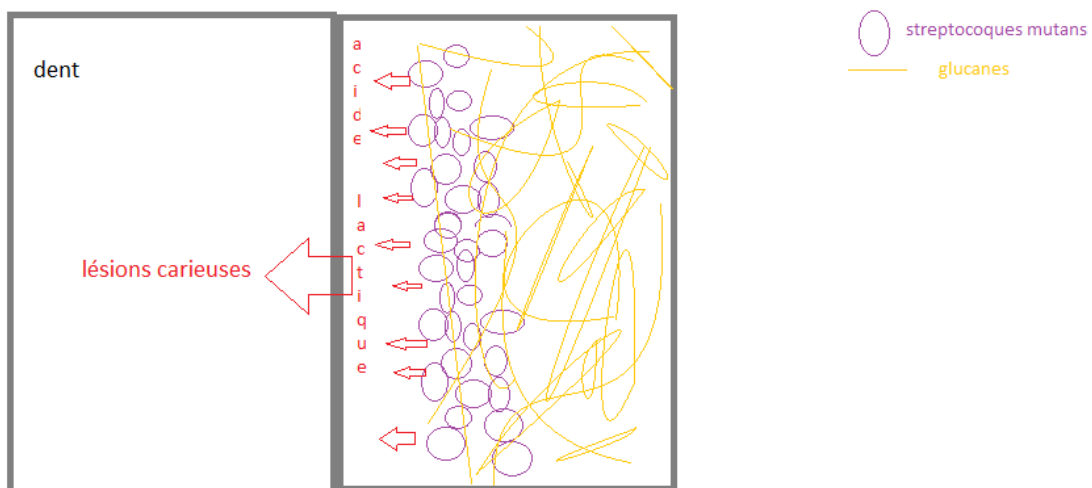


Figure 5 : biofilm dentaire au contact de la dent.

La structuration du biofilm dentaire se déroule en plusieurs étapes (6, 15, 16) :

La formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

La PAE est un élément primordial de la constitution du biofilm dentaire puisqu'elle permet la fixation des bactéries pionnières.

Il s'agit d'un film protéique d'une épaisseur d'environ 0.1 µm à 1 µm, qui est composé de protéines salivaires (ex : Ig A, Ig G, albumine) et de sucres (ex : galactose, mannose...) . Elle ne possède aucun élément cellulaire.

Les glycoprotéines jouent le rôle de récepteurs aux adhésines bactériennes.

La PAE se forme spontanément sur les surfaces bucco-dentaires quelques secondes après le brossage des dents !

La colonisation bactérienne

Les **bactéries pionnières** sont les premières à adhérer à la PAE et peuvent s'y **fixer directement**. Le nombre d'espèces bactériennes pionnières est restreint : On retrouve, entre autres, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii*. Ces bactéries possèdent à leur surface des adhésines qui reconnaissent spécifiquement des récepteurs de la PAE.

La colonisation par ces bactéries pionnières n'assure pas la diversité du biofilm à ce stade mais est tout de même indispensable, car elle permettra, dans un deuxième temps, la fixation d'autres espèces bactériennes par **adhérence interbactérienne hétérotypique**.

La maturation du biofilm dentaire

Après quelques heures grâce à la **multiplication** des bactéries pionnières l'adhérence des **colonisateurs secondaires, tardifs est possible**. On parle de **co-adhérence** de nouvelles espèces, c'est-à-dire la liaison d'une bactérie libre sur une autre déjà fixée.

Ex: *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*.

Ce phénomène concourt ainsi à **la diversité du biofilm ainsi qu'à son accroissement en nombre de bactéries et en volume**. (Épaisseur >10 µm)

Plus il y a de couches et plus les conditions environnementales vont changer. Le taux d'oxygène diminue dans la profondeur du biofilm, permettant le développement des espèces anaérobies. Parmi ces colonisateurs tardifs ou secondaires on retrouve principalement des espèces Gram négatif : *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Prevotella*.

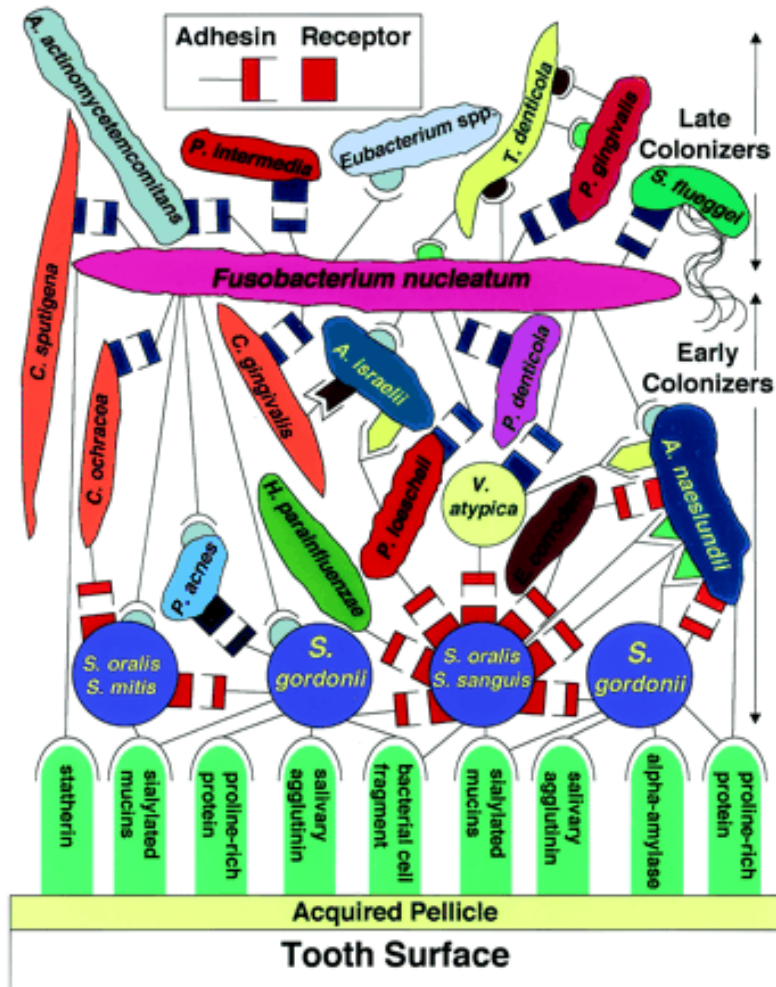


Figure 6 : formation du biofilm dentaire (Kolenbrander et London) (17)

II. Les maladies parodontales (18, 19 et 26)

1. Définitions

Les maladies parodontales sont des maladies **infectieuses polymicrobiennes** (à prédominance anaérobie) et à manifestation **inflammatoire**. Elles atteignent les tissus de soutien et de revêtement de la dent (gencive, cément, desmodonte, os alvéolaire) et entraînent au fur et à mesure une destruction progressive de ces tissus de soutien. (21)

2. Généralités (21)

Les symptômes de la maladie parodontale font suite à **l'exposition chronique à une flore orale pathogène**. (6, 21, 22, 23,82)

Les signes cliniques des gingivites sont une gencive rouge inflammatoire (surtout la papille), saignant lors d'un contact. Ceux des parodontites sont la présence de poches parodontales et de récessions, aboutissant, à terme, à la perte de la dent. Les parodontites constituent la principale cause de perte de dents chez l'adulte. (6, 12, 24, 16 et 21)

Les nombreuses études qui ont été réalisées afin de déterminer les espèces microbiennes impliquées dans les maladies parodontales, ont montré qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Porphyromonas gingivalis* sont prédominants parmi les pathogènes parodontaux (facteurs de virulence, mécanismes pathogènes, forte prévalence partout dans le monde). Ces études ont également montré que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium spp*, *Selenomonas spp*, *Tannerella forsythia* et *Treponema spp* étaient des bactéries associées aux maladies parodontales.

Les souches à **Gram négatif** possèdent un pouvoir **parodontolytique** supérieur à celui des bactéries à Gram positif. Les poches parodontales sont des espaces « clos », il n'y a que très peu d'oxygène et plus la poche sera profonde, moins il y aura de l'oxygène. De ce fait les bactéries qui entraînent et colonisent ces poches parodontales seront surtout des souches **gram négatif anaérobies strictes**. Ainsi, lors du passage de l'état sain à la maladie parodontale, on observe une augmentation importante des **bactéries anaérobies strictes, à Gram négatif, et des organismes motiles**. Les **spirochètes** s'observent dans toutes les pathologies parodontales. (6, 23, 25, 26, 27,)

3. Classifications

De nombreuses classifications des maladies parodontales existent. Néanmoins, la classification d'ARMITAGE de 1999 (28) fait consensus. Cette classification sert de référence pour le diagnostic des maladies parodontales dans les articles scientifiques, dans les communications entre praticiens.

➤ Flore des parodontites chroniques

La parodontite chronique est le type de maladie parodontale le plus commun. Une gingivite précède toujours une parodontite chronique mais l'inverse n'est pas vrai. (15,27, 30)

Elle se caractérise par une inflammation gingivale, une perte d'attache, des mobilités et des migrations dentaires.

Les bactéries qui sont impliquées dans les parodontites chroniques sont *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* et on sait que ces trois dernières sont des indicateurs importants de la maladie parodontale destructrice chez les sujets adultes. (15, 16, 22, 23, 30, 31, 32 et 33)

Pour conclure, environ **75% des bactéries** associées à la parodontite chronique sont à **Gram négatif. 90% sont des anaérobies.** (6, 23)

➤ Flore des parodontites agressives

La parodontite agressive se caractérise par une perte d'attache et une destruction osseuse **rapides**. Elle est le plus souvent retrouvée chez le sujet jeune, de ce fait on la nomme aussi parodontite juvénile. (28, 31)

On retrouve beaucoup d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dans les poches gingivales de patients atteints de parodontites agressives. (16,23 et 33)

Forme localisée

Les parodontites agressives localisées sont quatre fois plus fréquentes que les parodontites agressives généralisées. (16)

Dans la parodontite juvénile agressive localisée on retrouve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, qui est considéré comme le pathogène prédominant mais aussi d'autres espèces anaérobies à Gram négatif tels que : *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*. (6, 16, 23, 31)

Forme généralisée

Dans les parodontites juvéniles généralisées et les parodontites agressives à progression rapide les espèces prédominantes et indispensables au développement de cette pathologie sont *Porphyromonas gingivalis*, mais aussi *Eikenella corrodens*, *Selenomonas* et *Tannerella forsythia*. (15, 16, 22 et 26)

En résumé, dans la parodontite agressive, **65 à 75% des bactéries sont des bacilles à Gram négatif.** (23)

➤ **Flore des parodontites associées à des maladies systémiques ou infectieuses**

Les parodontites observées lors des maladies systémiques sont souvent des parodontites agressives (la flore sous-gingivale de ces parodontites est donc très semblable à celle des parodontites agressives). Ceci s'explique du fait de la moindre efficacité des défenses de l'hôte. (16)

➤ **Flore des maladies parodontales nécrotiques**

La flore des parodontites ulcéro-nécrotiques est constituée essentiellement d'espèces **anaérobies strictes**, telles que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* et *Treponema* (30 ou 40% de la flore). Une des caractéristiques de la maladie parodontale nécrotique est l'importante pénétration des spirochètes et de *Prevotella intermedia* dans le tissu conjonctif gingival, rendant leur élimination impossible par traitement mécanique. (16)

➤ **Flore des parodontites réfractaires**

Il s'agit des parodontites résistantes au traitement parodontal. (26)

La flore des sites réfractaires est souvent organisée en complexes de trois ou quatre bactéries. Certaines espèces prédominent dont *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Wollinella recta*, *Streptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus micros*. (6, 16, 26)

Pour récapituler :

	Parodontite agressive localisée (PJI)	Parodontite agressive généralisée	Parodontite chronique active	Parodontite réfractaire
Aa	+++	++	+	
Pg		++	++	
P intermedia	+	++	++	++
T forsythensis		+	+	+
P micros			+	+
F nucleatum			+	++
Capnocytophaga			+	
C rectus			+	
Treponema		++	+	+
Entérobactéries				+

(Aa : Actinobacillus actinomycetemcomitans, Pg : Porphyromona gingivalis, Prevotella intermedia, Tannerella forsythensis, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum, Campylobacter rectus)

Tableau 2 : d'après Socransky et coll 1982, Slots et coll 1980, 1985, 1986, Sixou 1999, Socransky et Haffajee 2002 (20, 34, 80)

4. Les complexes microbiens

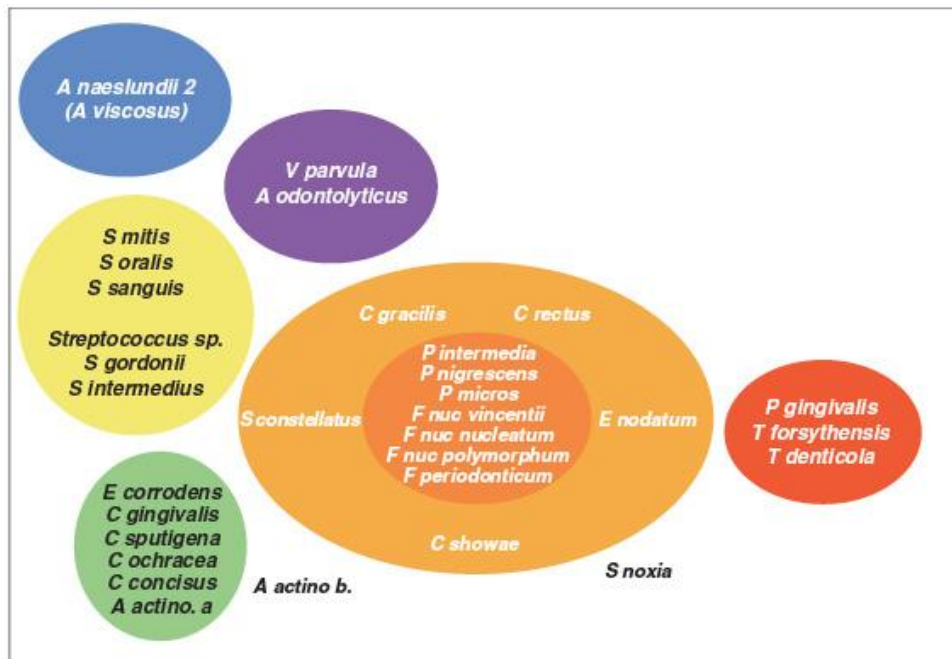


Figure 7 : représentation schématique des rapports des espèces dans les complexes microbiens et entre les complexes microbiens (d'après Socransky et Haffajee, 1998) (34).

Au sein de la plaque dentaire on retrouve souvent les mêmes espèces bactériennes regroupées qui forment ainsi des complexes. Les espèces de chaque complexe ne sont que très rarement retrouvées ensemble. Ceci pourrait s'expliquer par la sécrétion de facteurs de croissance par une bactérie qui serait favorable aux autres bactéries qui composeraient le complexe.

Ces complexes interviennent à différents stade de la pathologie parodontale :

- les bactéries des complexes bleu, vert et jaune sont compatibles avec la santé parodontale ; ce sont les plus nombreuses en pourcentage et en nombre absolu. (35)
- le complexe violet sert de lien entre les deux premiers complexes.

les **complexes rouge et orange se retrouvent dans les poches profondes et surtout dans les phases actives de la pathologie.** Ces 2 complexes sont fortement liés entre eux. (36) Elles ne sont pas compatibles avec la santé parodontale chez les patients à risque même si ce sont les moins nombreuses en pourcentage et en nombre absolu car elles possèdent de très nombreux **facteurs de virulence.**

Porphyromonas gingivalis et *Tannerella forsythia* font partie du complexe rouge et sont en association avec une aggravation de la pathologie. (35)

III. L'halitose

1. Définitions

L'halitose physiologique objective est un terme médical désignant la mauvaise haleine dépassant clairement un niveau socialement acceptable. Le diagnostic repose sur des méthodes objectives, permettant la mesure des composés soufrés volatils (CSV), grâce à l'halimètre. (37, 38, 39) L'halitose concerne près de 50 % de la population (de façon périodique ou chronique). Dans 80 à 90 % des cas, l'halitose trouve son origine au sein de la cavité buccale elle-même. (39)

2. Etiologies (37, 40)

➤ **Origine buccale**

Il s'agit de l'étiologie la plus fréquente (70%). L'halitose est causée par des bactéries qui dégradent les protéines contenant des acides aminés soufrés (ex: méthionine et cystéine) Ces bactéries produisent ainsi des Composés Soufrés Volatils (CSV) responsables de la mauvaise odeur. Le **sulfure d'hydrogène** (H₂S), le **méthyl mercaptan** (CH₃SH), le **sulfure diméthyl** (CH₃SCH₃) représentent les principaux CSV. (25, 32)

D'après de nombreux auteurs, les **bactéries anaérobies à Gram négatif** possèdent le plus **grand potentiel** de production de CSV. Les deux espèces les plus actives dans cette formation sont *Porphyromonas gingivalis* et *Treponema denticola*. (25, 33, 41- 46)

Campylobacter rectus, est également capable de produire du sulfure d'hydrogène et du sulfure diméthyl. (33)

Dans le biofilm lingual des sujets concernés par l'halitose, on observe non seulement un **nombre total de bactéries significativement plus élevé**, mais **aussi plus de bactéries productrices de sulfure d'hydrogène** (Il existe une corrélation entre la présence de *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola* dans le biofilm lingual, et l'augmentation de la quantité de CSV, notamment de sulfure d'hydrogène et de méthyl mercaptan. *Solobacterium moorei* n'est retrouvé que chez les sujets atteints d'halitose). (25, 32, 42, 46, 47 et 48)

En présence de cystéine et de méthionine, les **bactéries probiotiques** telles que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* peuvent aussi générer des quantités considérables de CSV. (46)

Selon d'autres études, chez les sujets concernés par l'halitose, la proportion de *Tannerella forsythia* était plus élevée que chez les sujets non concernés, et pourrait signer un risque augmenté d'halitose. Il est d'ailleurs possible que *Tannerella forsythia* soit un **facteur de risque important de l'halitose**. (42, 48, 49)

Ainsi, les gingivites, les parodontites, les caries, la présence d'un enduit lingual à dominante bactérienne, ou même les lésions de la muqueuse buccale, comme les aphtes, les ulcérations ou les cancers de la bouche, peuvent être l'élément causal de l'halitose.

➤ **Autres origines**

De nombreux aliments absorbés produisent des substances volatiles qui sont libérées (par voie respiratoire) et seront retrouvées dans l'haleine. Exemples : l'ail, l'oignon, l'échalote, le radis noir, l'alcool, le tabac...

Les infections chroniques ORL ou pulmonaires peuvent se manifester par une mauvaise odeur. Exemples : l'angine de Vincent, une suppuration des amygdales, une suppuration bronchique ou abcès du poumon.

L'halitose d'origine générale concerne le diabète (corps cétoniques en cas d'hyperglycémie), l'insuffisance rénale (odeur ammoniaquée), l'insuffisance hépatique qui produit l'odeur caractéristique du *foetor hepaticus* (odeur de poisson).

La prise de certains médicaments est également connue pour engendrer une mauvaise haleine (anticholinergiques ; dérivés de la phénothiazine ; antibiotiques du fait de la modification de la flore intestinale)

L'halitose d'origine digestive concerne le reflux gastro-œsophagien, les diverticules œsophagiens (fermentation des débris alimentaires).

IV. La vanilline (50, 51, 52, 53)

1. Historique (53, 54, 55, 56)

La vanille est originaire d'Amérique centrale. Les Aztèques l'utilisaient pour adoucir un breuvage à base de cacao et de piment appelé Tlilxochitl qui signifie « gousse noire »! Ce n'est qu'en 1703 qu'on utilise le terme de « vanilla » introduit par le père Plumier (botaniste).

La technique de pollinisation artificielle est le facteur déterminant qui a permis à la vanille d'être ce qu'elle est aujourd'hui. En 1836, le botaniste Morren réussit à réaliser la pollinisation du vanillier dans les serres du jardin botanique de Liège. Mais c'est à Edmond Albius, un jeune esclave de l'île de la Réunion, que l'on doit la maîtrise de la pollinisation artificielle ! (50)

La vanilline fut découverte en 1813 par Bucholtz.

Gobley en 1858, signale la présence de vanilline dans de nombreux végétaux (orchidées, églantiers, écorces de bois...).

En 1874, Tiemann et Haarmaan étudient la structure de la vanilline.

Actuellement l'arôme de vanille est celui qui est le plus utilisé dans l'industrie alimentaire (pâtisseries, vins, lait), (consommation mondiale 20 000 tonnes par an). Mais elle est aussi utilisée dans le domaine cosmétique, parfumerie (parfums, fragrances), et pharmaceutique... 75% de la quantité mondiale est d'origine synthétique. (50, 57, 58)

2. Généralités (50, 51, 53)

Parmi les multiples composants de l'arôme de vanille, la vanilline en est le principal (le plus important et le plus caractéristique). Cette molécule est responsable de l'arôme et de l'odeur caractéristique de la vanille, elle est présente dans la gousse mûre à hauteur de 2 %.

La préparation de la vanille a pour but de favoriser la formation du parfum, la conservation, un bel aspect de la gousse. La préparation se fait en 3 étapes :

- L'échaudage
- L'étuvage
- Le séchage

En effet la vanilline n'est pas encore présente dans la gousse verte, on parle de vanilloside. C'est grâce aux 3 étapes de la préparation sous l'action de l'enzyme β -glucosidase que la vanilloside s'hydrolyse en vanilline et en glucose. (50)

L'arôme de vanille n'a aucun pouvoir nutritif, sa seule fonction caractéristique est son pouvoir odorant. La vanilline est un composé très volatile. (50)

L'extrait liquide de vanille est obtenu par macération des gousses dans l'alcool. (50)

A l'heure actuelle très peu d'études ont été effectuées sur l'action de la vanille sur les bactéries buccales. Par contre, on retrouve des publications concernant la vanilline dans le

domaine agro-alimentaire et de plus en plus des articles concernant la vanilline dans le domaine médical (effet bénéfique contre le cancer, ou pour ses propriétés anti-oxydantes).

Des études ont été réalisées pour observer les propriétés de la vanilline. Il en résulte que c'est un agent **anti-mutagène, anti-bactérien**. Elle pourrait également être utilisée dans le traitement de la drépanocytose. (60, 61)

3. Propriétés physicochimiques de la vanilline (57, 59)

La vanilline (3-méthoxy-4-hydroxybenzaldéhyde) est un aldéhyde phénolique (aromatique) qui :

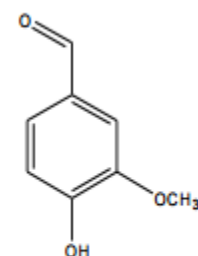
- a pour formule brute : $C_8H_8O_3$
- une masse moléculaire : $152,15 \text{ g.mol}^{-1}$
- se présente sous forme de cristaux (ou aiguilles) blancs sensibles à l'humidité et la lumière
- Précautions : Conserver dans un endroit sec et sombre.
- fond à $81-83^\circ \text{C}$ (point de fusion), son point d'ébullition est à 285°C .
- a une faible solubilité dans l'eau ($1\text{g}/100\text{ml}$) mais est très soluble dans l'éther (acétate d'éthyle), dans l'alcool (l'éthanol), les huiles et le chloroforme. (62)

4. Les propriétés physiologiques de la vanilline (63)

La vanilline exerce un effet dépresseur du tonus et de la motricité des fibres lisses, et surtout des fibres intestinales et utérines. De plus, des bronchospasmes peuvent se déclencher.

La vanilline est également un excellent anti-oxydant. Dans le corps humain, la vanilline est transformée en **acide vanillique** qui possède des **propriétés fongicides et bactéricides**. (64)

Lors de l'ingestion de préparations culinaires à base de vanille ou lors de manipulation des gousses de vanille, la vanille peut s'avérer **toxique** (le suc de la plante est corrosif et contient de l'acide oxalique sous forme de sel de calcium) et entraîner le vanillisme (dermatose d'origine allergique entraînant des éruptions érythémato-papuleuses). (50, 60)



vanilline

5. Propriétés et utilisations de la vanilline (52)

Autrefois, les Aztèques l'utilisaient comme diurétique, ce qui augmentait la sécrétion urinaire et aussi comme dépuratif, ce qui permettait de purifier l'organisme.

Outre son utilisation dans le domaine de l'industrie alimentaire, la vanille possède d'autres propriétés intéressantes :

La vanilline s'oxyde en acide vanillique qui est un acide hydroxybenzoïque (famille des acides-phénols), et un intermédiaire dans la production de la vanilline.

Le rôle d'antioxydant « naturels » des polyphénols (composé chimique aromatique) suscite de plus en plus d'intérêt pour la prévention et le traitement du cancer, des maladies inflammatoires, cardiovasculaires et neurodégénératives.

➤ **Propriétés anti-cancer : (1, 65)**

L'acide vanillique possède de propriétés « anti-cancer » intéressantes. (63)

Une étude menée sur des souris montre que la vanilline stoppe la propagation des cellules cancéreuses du sein en diminuant leur capacité à envahir de nouveaux tissus. La vanilline pourrait un jour être utilisée pour traiter le cancer.

➤ **Antioxydants : (64, 66, 67, 68)**

L'oxydation est une cause majeure de la plupart de nos troubles et maladies. Elle est provoquée par les radicaux libres qui brûlent les tissus sains. Des études ont suggérées que les effets anti-inflammatoires et anti-oxydants de la vanilline puissent impliquer sa capacité à bloquer des radicaux libres (blessure du foie).

L'huile essentielle de vanille peut neutraliser ces radicaux libres.

➤ **Anti-dépresseur (69)**

La vanille était aussi recommandée pour soigner la mélancolie, les rhumatismes, la fièvre, l'hystérie et la dépression. Connue aussi en tant que stimulant du système nerveux, elle permet de lutter contre la fatigue intellectuelle aussi bien que physique.

La vanilline présente dans l'huile essentielle de vanille est un antidépresseur efficace.

Paradoxalement, on la conseille aussi contre les insomnies.

➤ **Lutte contre l'insomnie : (69)**

L'infusion de vanille peut aider à obtenir un bon sommeil car elle a des propriétés sédatives et relaxantes qui abaissent la pression sanguine et détend le système nerveux.

➤ **Relaxative :**

De nos jours le stress touche énormément d'individus. L'odeur de vanille pourrait aider ces personnes car elle possède un effet relaxant et apaisant sur le cerveau.

➤ **Aphrodisiaque : (70)**

On dit de la vanille qu'elle est un des plus anciens aphrodisiaques. Au Guatemala, la vanille était utilisée pour la réalisation de philtre d'amour !

Aujourd'hui encore la vanilline est inscrite à la pharmacopée. On lui attribue une action stimulante et même aphrodisiaque pour traiter la frigidité, la perte de libido, l'impuissance et d'autres troubles sexuels.

➤ **Beauté (69)**

Utilisée en cosmétique, la vanille serait restructurante, régénérante, purifiante, hydratante, nourrissante et adoucissante.

➤ **Pharmaceutique**

La vanilline est utilisée dans l'industrie pharmaceutique comme intermédiaire de synthèse chimique (propriétés sympathomimétiques dérivant de l'adrénaline et des amphétamines).

Elle sert à masquer le mauvais goût des principes actifs d'un médicament.

En résumé, la vanille possède beaucoup de propriétés qui font que cette épice est utilisée dans de nombreux domaines (alimentaire, pharmaceutique, parfumerie, médical...) et un peu partout dans le monde.

V. Les bactéries étudiées

1. *Streptococcus mutans*

Les streptocoques oraux représentent environ 20% de la flore commensale de la cavité buccale. Parmi ces streptocoques oraux on distingue 4 groupes :

- *anginosus*
- *mitis*
- *mutans*
- *salivarius*

Ce sont des cocci à Gram positif, aéro-anaérobies facultatifs et immobiles, typiquement organisés en chaînettes. Ils sont catalase nitrate-réductase et cytochrome -oxydase négatives.

De nombreuses études ont montré le rôle étiologique de *S. mutans* dans la carie. Il est impliqué dans les premiers stades du développement de cette pathologie, et est un des streptocoques quantitativement dominants de la flore orale humaine. (23, 71)

Il est **acidogène** ; mais aussi **acidophile** : Il se développe à des pH relativement bas (pH < 5) Il synthétise des **polysaccharides extracellulaires** à partir du saccharose. Ces 3 éléments font de cette bactérie une des plus cariogènes de la plaque dentaire. (71)

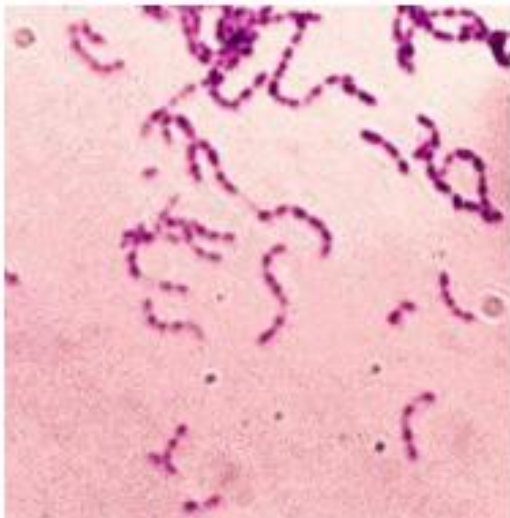


Figure 8 : *Streptococcus mutans*. (72)

2. *Lactobacilles rhamnosus* (6, 73, 23, 16,74, 75)

Les *Lactobacilles sp* constituent moins de 1% de la flore orale. Ce sont des colonisateurs secondaires des cavités carieuses. Leur faible capacité d'adhésion aux surfaces lisses explique leur localisation préférentielle dans les sillons et les faces dentaires triturantes. Ils sont considérés comme des colonisateurs des cavités profondes.

Le genre *Lactobacillus* sp est classé dans les bactéries lactiques c'est-à-dire qu'ils peuvent réaliser la fermentation lactique (production d'acides > pouvoir pathogène). Leurs caractères fortement **acidogène et acidophile** les ont fait classer en bactéries cariogènes. (12)

Lactobacillus est un gram + qui se présente au microscope sous forme de bacille (bâtonnets ou de coccobacille), isolé ou en chaînette. Il est anaérobie facultatif, immobile et asporulé. Il ne produit ni réductase, ni cytochrome-oxydase, ni catalase. (16, 76)

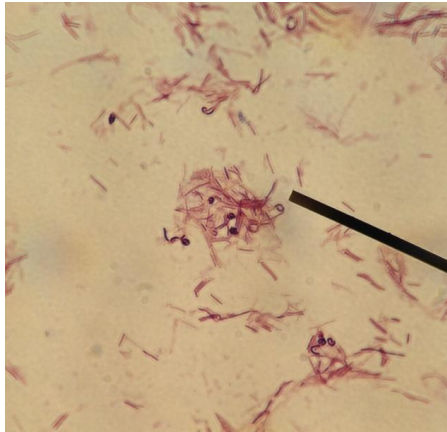


Figure 9 : *Lactobacillus rhamnosus*. (77).

3. *Actinomyces viscosus* (7)

Le genre *Actinomyces* est fortement représenté dans la cavité buccale (environ 10 espèces) et est présent sur l'ensemble des surfaces orales

Les espèces identifiées dans la cavité buccale humaine sont *A. georgiae*, *A. gerencseriae*, *A. israelii*, *A. meyeri*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus*, *A. naeslundii*. Ces bactéries jouent un rôle important dans l'étiologie des caries chez l'homme. Ils ont été plus spécifiquement impliqués dans **les caries radiculaires et cémentaires** (caries généralement rencontrées chez des sujets de plus de 50 ans). Les *Actinomyces* permettent la fixation à leur surface de nombreuses espèces bactériennes et contribuent à assurer la diversité bactérienne au sein du biofilm dentaire. (12)

Actinomyces se présentent en bacilles ou coccobacilles à Gram positif très polymorphes, immobiles et non sporulés. Ils sont catalase positif et anaérobies facultatifs. (6)

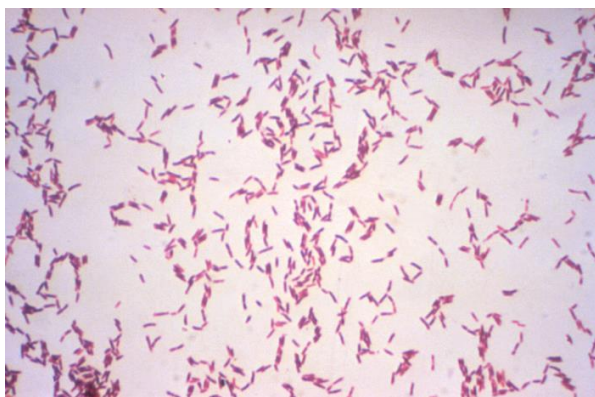


Figure 10 : *Actinomyces viscosus*. (78)

4. Tannerella forsythia (6, 12, 81)

La bactérie fait partie de la flore commensale de la cavité buccale et ne constitue donc aucun risque tant que leur nombre absolu reste restreint.

Au microscope la bactérie a une forme de bacille fusiforme, immobile, gram négatif. Il est anaérobie **strict, asporulé**. La bactérie est sensible au Métronidazole et à la Clindamycine, mais elle est insensible, par exemple, à la Doxycycline. (29, 79)

T. forsythia est d'isolement difficile en raison de ses exigences nutritionnelles. C'est l'une des bactéries dominantes de la flore des lésions parodontales (poches) en phase de destruction active (parodontite agressive, parodontite réfractaire) et dans les abcès parodontaux. (36, 12)

On la retrouve aussi dans l'halitose car c'est une espèce capable de produire des Composés Volatiles Soufrés. (42, 48, 49)

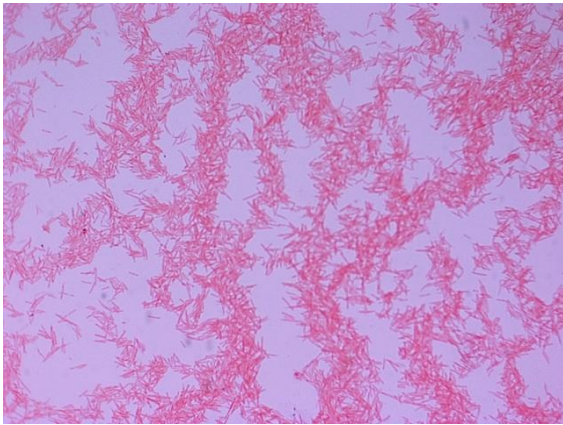


Figure 11 : *Tannerella forsythia*. (79)

Partie 2 : Protocole expérimental

Comme nous l'avons exposé dans la première partie, l'effet de la vanille est beaucoup étudié dans le domaine agro-alimentaire. Les études se multiplient dans le domaine médical mais à l'heure actuelle très peu d'étude se sont portées sur son effet sur les bactéries buccales.

En 2009, Christelle MEMBREDE et le Dr BADET Cécile réalisent une étude expérimentale portant sur l'effet de la vanilline sur cinq bactéries buccales : *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus*, *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum*. Les résultats obtenus ont montré que la vanilline aurait une action **anti-bactérienne (anti-cariogénique ?) et anti-biofilm sur ces bactéries** (63)

Les bactéries testées dans cette étude antérieure étaient des souches de collection (ATCC), l'objectif de notre étude a donc été de montrer ces 2 actions sur des isolats cliniques de *Actinomyces viscosus* et *Lactobacillus rhamnosus* ainsi que sur d'autres bactéries buccales telles que : *Tannerella forsythia*.

I. Matériels et méthodes

1. Le matériel

➤ Les substances utilisées

La vanilline

La vanilline utilisée est sous forme de poudre de vanilline pure (formée de cristaux blancs) > 98% HPLC, et d'ester C₈H₈O₃. Elle provient du laboratoire Sigma-Aldrich et a pour référence Batch No. 086K3676, numéro de CAS 121-33-5. Son poids moléculaire : 152.15.

L'extrait de vanille

Nous avons aussi testé de l'extrait de vanille alimentaire provenant de l'est de l'île de la Réunion.



Figure 12 : extrait de vanille alimentaire utilisée pour les expérimentations sur *Streptococcus mutans*.

➤ **Les souches utilisées**

Les expériences sont réalisées sur les souches de référence qui proviennent de l'American Type Collection and Culture (ATCC). Elles nous permettront de comparer avec les résultats de l'étude de 2009. Pour les tests d'inhibition de croissance par méthode de dilution et pour les tests d'adhérence bactérienne (tubes inclinés) on utilise :

- *Lactobacillus rhamnosus* : ATCC 7469 et isolat clinique (souche de la collection du laboratoire)
- *Actinomyces viscosus* : ATCC 15987 et isolat clinique (souche de la collection du laboratoire)
- *Tannerella forsythia* : ATCC 43037
- *Streptococcus mutans* : ATCC 25175

Pour les tests d'adhérence bactérienne sur un bio film pluri-espèces les bactéries sont :

- *Actinomyces viscosus* : ATCC 15987
- *Streptococcus mutans* : ATCC 25175
- *Streptococcus oralis* : ATCC 20627
- *Porphyromonas gingivalis* : ATCC 33277
- *Fusobacterium nucleatum* : ATCC 10953

➤ **Les milieux de culture**

Ce sont des supports qui permettent la culture de bactéries. Les bactéries y retrouvent les composants indispensables pour leur multiplication et même parfois des composants qui favoriseront un genre bactérien. Toutes les espèces bactériennes n'auront pas les mêmes milieux de culture.

On retrouve des milieux de culture liquides et des géloses (apprécier la croissance bactérienne en fonction de l'espèce étudiée).

Les milieux liquides.

➤ Pour *T. forsythia*

Milieu liquide très spécifique. (Voir annexe 1)

Pour réaliser ce milieu un composant est indispensable: le NAM (acide N-acétyl-muramique).

➤ Le milieu TS (Trypticase Soja)

Utilisé pour *Streptococcus oralis* , *Streptococcus mutans* , *Actinomyces viscosus*.

➤ Le milieu liquide WCA (Wilkins Chagren Anaerobe)

Utilisé pour *Fusobacterium nucleatum* , *Porphyromonas gingivalis*.

- Le milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe)

Pour *Lactobacillus rhamnosus* .

- Le FUM (Fluid Universal medium) (voir annexe 2)

Il est utilisé comme milieu universel pour la croissance des bactéries dans le biofilms pluri-espèces.

Les géloses.

- Les géloses Columbia au sang de mouton

Ce sont des milieux riches qui permettent de mettre en culture plusieurs espèces bactériennes.

Elles peuvent être utilisées pour toutes les bactéries citées ci-dessus. (Surtout pour *Tannerella forthysia* , *Actinomyces viscosus*)

- Les géloses Mitis Salivarius

Elles sont utilisées pour l'isolement et la culture de streptocoques. (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*)

- Les géloses WCA

Utilisées pour l'isolement et la culture des bactéries anaérobies strictes. (*Fusobacterium nucleatum* , *Porphyromonas gingivalis*)

- Les géloses Fusco (Voir annexe 3)

Isolent et permettent la culture des *Fusobacterium* uniquement.

- Les géloses TS

Utilisées pour les gram positif.

- Les géloses MRS

Pour les Lactobacilles.

2. Méthodes

Différentes concentrations de poudre de vanilline sont testées sur nos souches bactériennes

Chaque expérimentation est réalisée en triplicata afin d'effectuer une moyenne des 3 tubes ou des 3 disques.

➤ **Test d'inhibition de croissance : méthode par dilution**

	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM	60mM
<i>T. forsythia</i> ATCC	Oui	Oui	Oui			
<i>L. rhammosus</i> ATCC	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
<i>L. rhammosus</i> isolat clinique	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	
<i>A. viscosus</i> ATCC	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
<i>A. viscosus</i> isolat clinique	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	

Tableau 3 : tests d'inhibition de croissance réalisés. Pour *S. mutans* ATCC, nous avons testé de l'extrait de vanille liquide à une concentration de 20%.

- ❖ Les **tubes témoins** contiennent le milieu liquide (bouillon) + la souche bactérienne.
- ❖ Les **tubes tests** contiennent : bouillon (toujours en fonction de la souche bactérienne) + souche bactérienne + vanilline à différente concentration.

Quantité de vanilline pour chaque concentration (pour 10mlde milieu)

- pour 10mM = 0.0152 g
- pour 20mM = 0.0304 g
- pour 30mM = 0.0456 g
- pour 40mM = 0.0608 g
- pour 50mM = 0.0761 g

Protocole :

1^{er} jour : Remise en culture des différentes souches bactériennes

2^{ème} jour :

- Préparer un inoculum bactérien à partir de la culture overnight, ajuster à une DO de 1 à 650 nm.
- Ajouter 500µl de cet inoculum dans les tubes témoins et les tests (en triplicata)
- Placer les tubes à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

3^{ème} jour : dilutions et étalement sur géloses des tubes après 24h d'incubation.

50µl de la solution diluée est prélevé et étalé en râteau sur la gélose spécifique à l'espèce.

On place les boîtes de pétri en anaérobiose à 37° C pendant 24h à 48h. (Voire plus pour *T. forsythia*)

4ème jour : comptage des colonies bactériennes sur géloses.

Les colonies sont comptées sur chaque gélose et les résultats sont obtenus en faisant la moyenne des triplicatas de chaque série. Le résultat est exprimé en Log UFC/mL (logarithme Unités Formant Colonies par mL) par gélose.

➤ **Test d'adhérence sur tube de verre inclinés (83)**

	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM	60mM
<u>L. rhamnosus</u> isolat clinique	oui	oui	oui	oui	oui	
<u>A. viscosus</u> ATCC	oui	oui	oui	oui	oui	oui
<u>A. viscosus</u> Isolat clinique	oui	oui	oui	oui	oui	

Tableau 4 : tests d'adhérence réalisés.

L'adhérence représente la capacité d'une bactérie à se fixer à un substrat. C'est un facteur primordial car elle permettra par la suite la multiplication des bactéries. (Voir paragraphe sur les biofilms partie 1)

Seules les souches bactériennes possédant un pouvoir d'adhérence observé lors de l'expérience ci-dessus, ont été retenues pour le test d'adhérence. Pour réaliser cette expérience nous utilisons la méthode de tube de verre incliné décrite par Hamada et Torii.

- ❖ Les tubes témoins contiennent : 10ml de milieu (fonction de l'espèce bactérienne étudiée) + 1% saccharose.
- ❖ Les tubes tests contiennent : 10ml de milieu +1% saccharose+ la vanilline (expérimentée à différente concentration).

Chaque série de tests est réalisée en triplicata.

- Mettre 500µl de la culture overnight à tester (DO = 1 à 650nm) dans le tube contenant le milieu test ou le milieu témoin
- Incliner les tubes selon un angle de 30° et les placer à 37°C pendant 24 heures.
- Recueillir les résultats d'adhérence du biofilm à 24 heures puis 48 heures. Le score utilisé est celui de Murchinson (de 0: pas de biofilm, à 4 : présence d'un biofilm très adhérent)

➤ **Test d'adhérence bactérienne : biofilm pluri-espèces (84)**

Pour réaliser cette expérience nous nous sommes basées sur le modèle de Guggenheim et al. (84) Avec quelques modifications notamment sur les différentes souches bactériennes et le temps d'incubation ou la méthode de recueil, en ajoutant une étape ultrasonore.

Chaque expérimentation est réalisée en triplicata c'est-à-dire qu'on aura 3 disques témoins, 3 disques avec une concentration de 30mM de vanilline et 3 autres pour une concentration de 50mM de vanilline.

Biofilm

➤ Préparation de la salive

La salive est prélevée chez les volontaires sains sans stimulation, 1h30 après avoir mangé, bu, et brossé les dents. Les échantillons sont collectés dans des pots de propylène stériles et sont congelés) -20°C.

Quand un volume de 500 ml de salive est recueilli, les échantillons sont centrifugés 30 min à 4°C à 150000tours/min. Le surnageant ainsi obtenu est pasteurisé 30min à 65°C, puis recentrifugé et mis à congeler à -20°C.

➤ Le support du biofilm

Le biofilm se développe sur des disques d'hydroxyapatite stériles (autoclavés 20min à 120°C). Ils seront par la suite placés dans une plaque de 24 puits en polystyrène et stérile.

➤ Préparation du biofilm

Les densités optique de chaque culture bactérienne sont ajustées indépendamment à $DO = 1 + ou - 0.05$ pour une longueur d'onde de 550nm. On prend 1 ml de chaque solution, on mélange pour obtenir la suspension bactérienne finale avec nos 5 espèces différentes.

La première étape pour créer un biofilm est de former la Pellicule Acquisée Exogène (PAE). Pour ce faire, on place chaque disque dans un des puits de la plaque 24 puits et on ajoute 800µl de salive. On laisse cette plaque à température ambiante avec une agitation douce pendant 4heures.

Puis chaque disque est transféré dans un autre puit et mis au contact de 800µl de salive +800µl de FUM mélangé à la vanilline +200µl de la suspension bactérienne finale. Les disques sont mis en anaérobiose pour 24h à 37°C.

Ensuite les disques sont de nouveau transférés dans de nouveaux puits et sont mis en immersion avec 800µl de salive +800µL de FUM enrichi (0.15% de glucose et 0.15% de saccharose). Ils sont ensuite remis en anaérobiose pour 48h.

Récolte du biofilm

Deux méthodes existent :

- Par grattage (Utilisation d'instruments de parodontologie)
- Par ultrasons

Lors de notre expérience nous avons choisi la seconde méthode.

1^{ère} étape : Rincer rapidement les disques au sérum physiologique pour éliminer les bactéries non adhérentes.

2^{ème} étape : Les disques sont mis indépendamment les uns des autres en immersion dans 1 ml de sérum physiologique dans des tubes stériles.

3^{ème} étape : Ces tubes sont passés aux ultrasons pendant 2min, puis sont vortexés pendant 2min. Les bactéries se détachent du disque d'hydroxyapatite et se retrouvent dans le sérum physiologique. C'est cette suspension qui est prélevée pour être mise en culture sur les géloses.

Etalement sur géloses

➤ Dilutions

Les suspensions présentes dans chaque tube sont diluées à 10^{-2} pour toutes les géloses sauf pour les géloses au sang où on diluera à 10^{-4} .

➤ Etalement

50µl de ces suspensions diluées sont étalés en râteau sur des géloses spécifiques aux espèces introduites dans le biofilm.

On utilisera 5 types de géloses : (voir la partie Matériel ci-dessus)

- Les géloses WCA+ sang
- Les géloses Mitis Salivarius
- Les géloses au sang
- Les géloses Fusco
- Les géloses TS + sang (enrichie avec du sang)

Les géloses sont mises en anaérobiose à 37°C pendant 72 heures. Et le nombre de colonies formées pour chaque espèce est compté, des colorations de gram sont effectuées pour vérifier les espèces retrouvées.

II. Résultats (voir annexe 4)

1. Inhibition de croissance : Méthode par dilution

➤ Pour *Streptococcus mutans* ATCC

On constate une inhibition bactérienne totale en utilisant 20% d'extrait de vanille. En effet sur les géloses Mitis Salivarius tests on ne retrouve aucune colonie bactérienne.

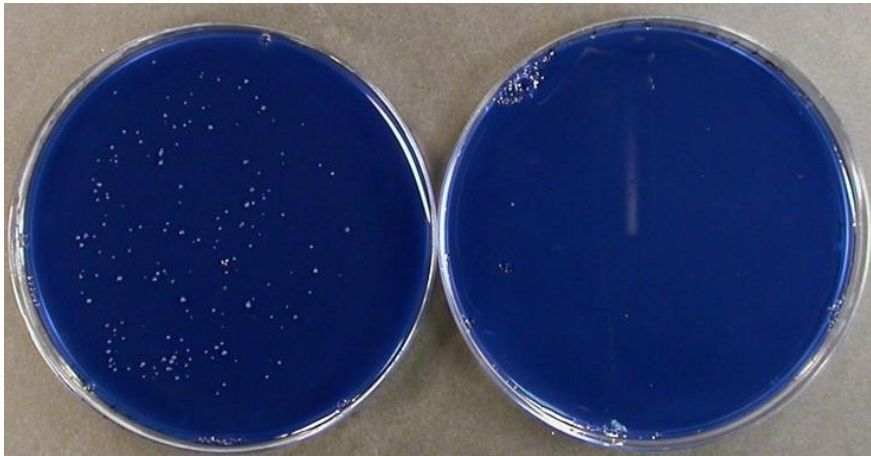


Figure 13 : vues des cultures de *S. mutans* ATCC sur des géloses Mitis Salivarius (Dilution à 10^{-4}).
A gauche : le témoin (UFC = 115) et à droite : le test à 20% d'extrait de vanille (UFC= 0).

➤ Pour *Tannerella forsythia* ATCC

A 10mM de vanilline, les tests d'inhibition bactérienne n'indiquent aucune différence significative avec les témoins puisque sur les témoins comme sur les géloses tests à 10mM de vanilline, les colonies présentes sont trop nombreuses pour être dénombrées.

A partir de 20mM de vanilline, aucune croissance n'est visible. L'inhibition est donc totale et significative pour 20mM et 30mM.



Figure 14: vues des cultures de *T. forsythia* ATCC sur géloses au sang (dilution 10^{-2}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 10mM de vanilline.

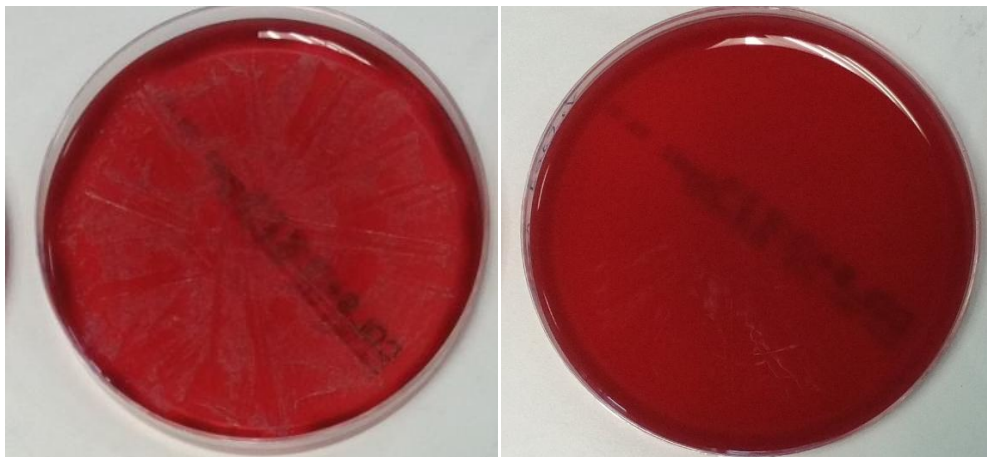


Figure 15 : vues des cultures de TF ATCC sur géloses au sang (dilution 10^{-2}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 20mM de vanilline.

➤ **Pour *Lactobacillus rhamnosus* ATCC et l'isolat clinique**

***Pour Lactobacillus rhamnosus* ATCC**

A 10mM, 20mM, 30mM et 40mM, les résultats des tests d'inhibition de croissance bactérienne ne montrent aucun effet inhibiteur sur la croissance de cette souche bactérienne.

A 50mM par rapport aux témoins nous observons une diminution significative de la croissance des isolats cliniques de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC. En effet une différence de 1 log est significative.

Pour Lactobacillus rhamnosus (isolat clinique)

Pour 10mM et 40mM de vanilline les résultats des tests d'inhibition n'indiquent aucune différence significative avec les témoins.

Pour 20mM, 30mM et 50mM, les résultats obtenus montrent un effet inhibiteur sur la croissance de *Lactobacillus rhamnosus* (isolat clinique).



Figure 16 : vues des cultures de *L. rhamnosus* (isolat clinique) sur géloses MRS (Dilution 10^{-5} des témoins et 10^{-4} des tubes tests).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 30mM de vanilline.

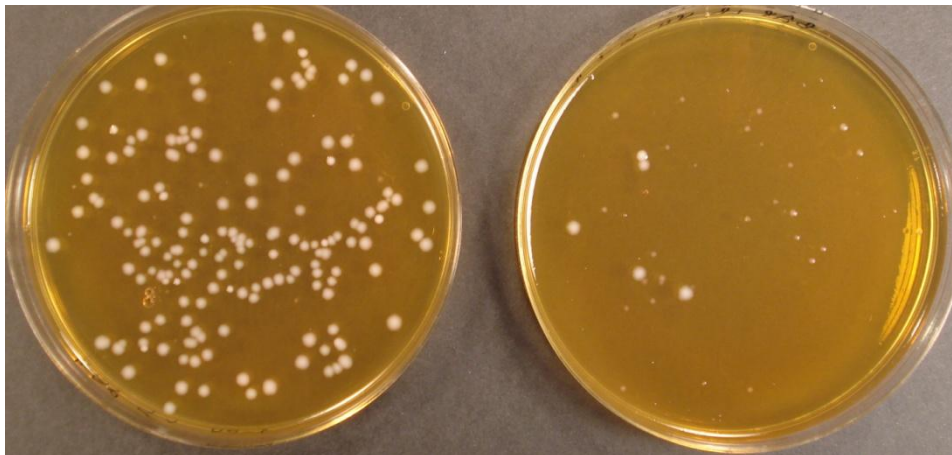


Figure 17 : vues des cultures de *L. rhamnosus* (isolat clinique) sur géloses MRS (Dilution 10^{-6}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 40mM de vanilline.

➤ **Pour *Actinomyces viscosus* ATCC et l'isolat clinique**

La souche ATCC et l'isolat clinique n'ont pas la même concentration d'inhibition.

Pour l'isolat clinique il n'y a aucune différence significative entre les géloses tests de 10mM, 20mM avec les géloses témoins. Les colonies étaient trop nombreuses pour être comptées. A partir de 30mM les résultats des tests d'inhibition montrent une diminution significative de la croissance bactérienne. Et dès 40mM l'inhibition de la croissance est totale.

Pour la souche ATCC la concentration inhibitrice efficace est 60mM.



Figure 18 : vues des cultures d'*A. viscosus* (isolat clinique) sur géloses au sang (dilution 10^{-2}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 30mM de vanilline.

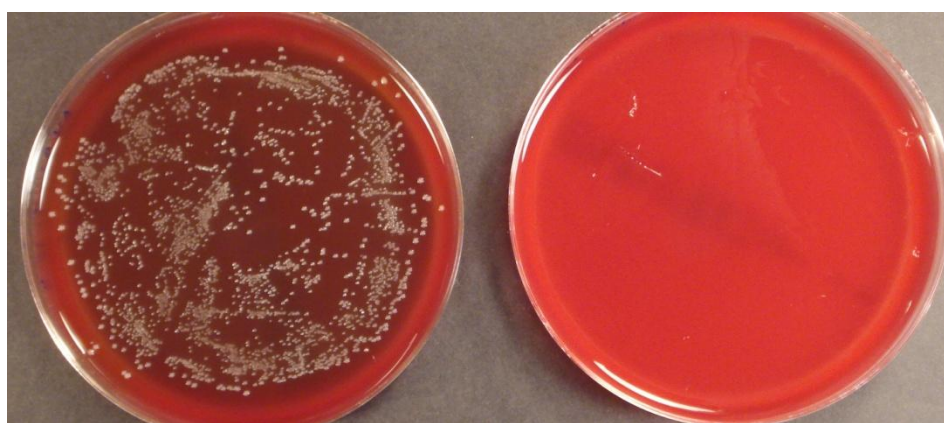


Figure 19 : vues des cultures d'*A. viscosus* (isolat clinique) sur géloses au sang (dilution 10^{-4}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 40mM de vanilline.

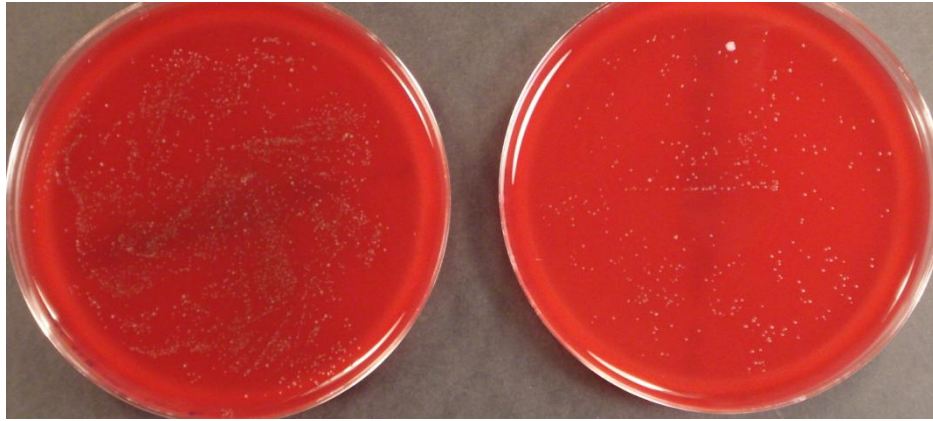


Figure 20 : vues des cultures d'*A. viscosus* ATCC sur géloses au sang (dilution 10^{-4}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 40mM de vanilline.

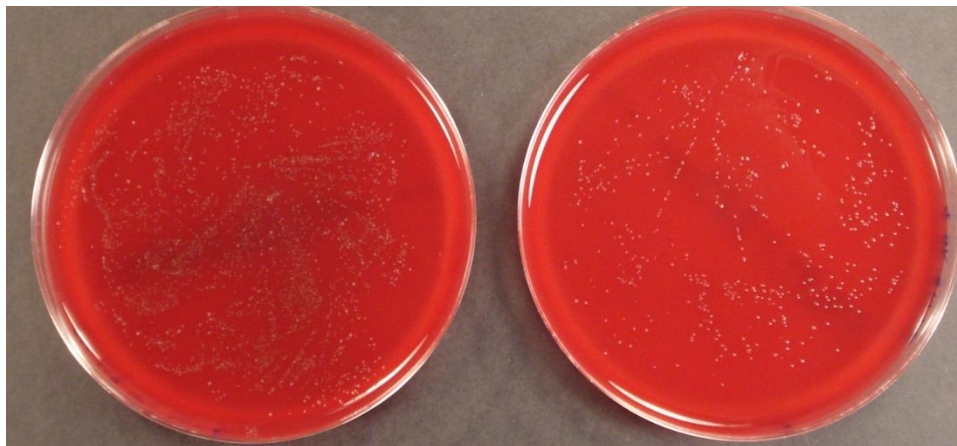


Figure 21 : vues des cultures d'*A. viscosus* ATCC sur géloses au sang (dilution 10^{-4}).
A gauche : le témoin et à droite : le test à 50mM de vanilline.

2. Inhibition d'adhérence : test des tubes de verre inclinés mono espèce

➤ L'isolat clinique *Lactobacillus rhamnosus*

Dès 24 heures on observe un biofilm de score 1 (pas très adhérent) sur les parois du tube de verre des tubes témoins et ceux des tubes tests à 10mM, 20mM et 30mM de vanilline. Par contre les résultats des tests d'adhérence montrent une inhibition dans la formation de biofilm pour 40mM et 50mM de vanilline. Avec cependant pour 40mM, l'existence d'une croissance bactérienne dans le culot du tube.

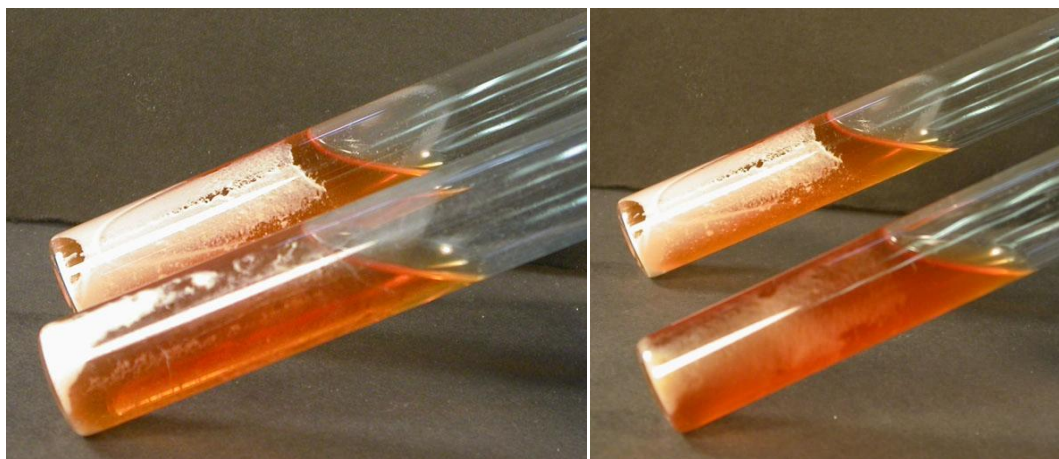
A 48 heures : tubes témoins : formation d'un biofilm de score 3.

Tubes tests à 10mM, 20mM de vanilline : biofilm 2.

Tubes à 30mM de vanilline : biofilm 3.

Tubes tests à 40mM : croissance bactérienne mais pas de biofilm.

Tubes tests à 50mM : pas de formation de biofilm.



A 10mM de vanilline.

A 50mM de vanilline

Figure 22 : vues des tests d'adhérence sur LRBAP3.
En arrière-plan : tube témoin et au premier plan : tube test.

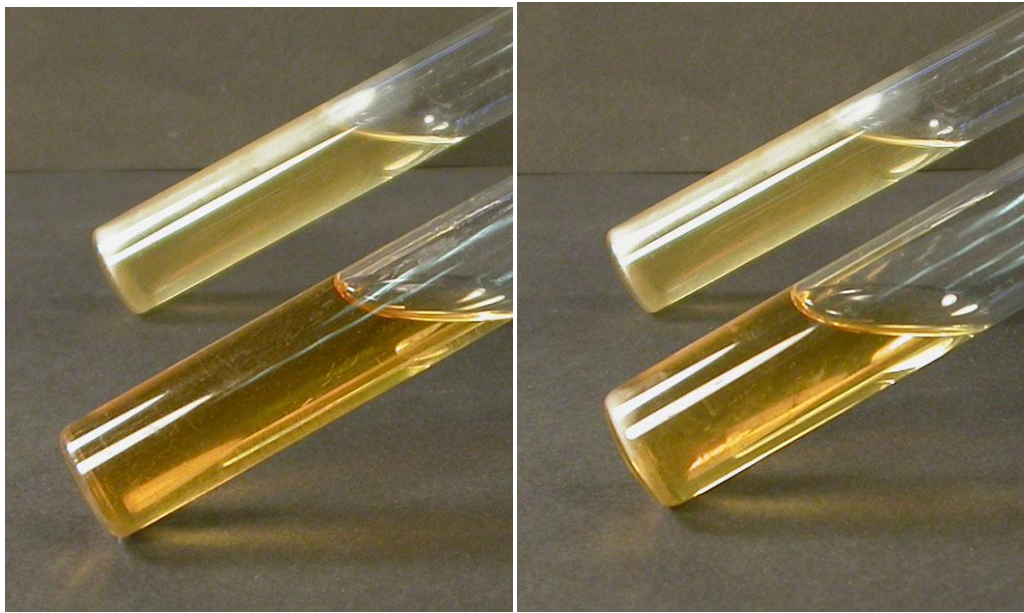
➤ Pour *Actinomyces viscosus* ATCC

A 24 heures : la présence d'un biofilm déjà adhérent (2) s'observe sur les parois des tubes de verre des témoins. On observe la présence d'un biofilm mais aucune formation adhérente sur les parois des tubes tests à 10mM de vanilline, ainsi qu'une suspension bactérienne dans le milieu de culture. Les résultats des tests d'adhérence montrent une inhibition dans la formation de biofilm puisqu'aucun biofilm n'est visible sur les parois des tubes en verre (ni de suspension bactérienne dans le milieu de culture).

A 48 heures : tubes témoins : formation d'un biofilm 3.

Tubes tests 10mM : biofilm de score 1 (peu adhérent) + suspension bactérienne.

Tubes tests 20mM, 30mM, 40mM, 50mM et 60mM : aucune formation de biofilm.



A 10mM de vanilline

A 20mM de vanilline

Figure 23 : vues des tests d'adhérence sur *A. viscosus* ATCC.
En arrière-plan : tube témoin et au premier plan : tube test.

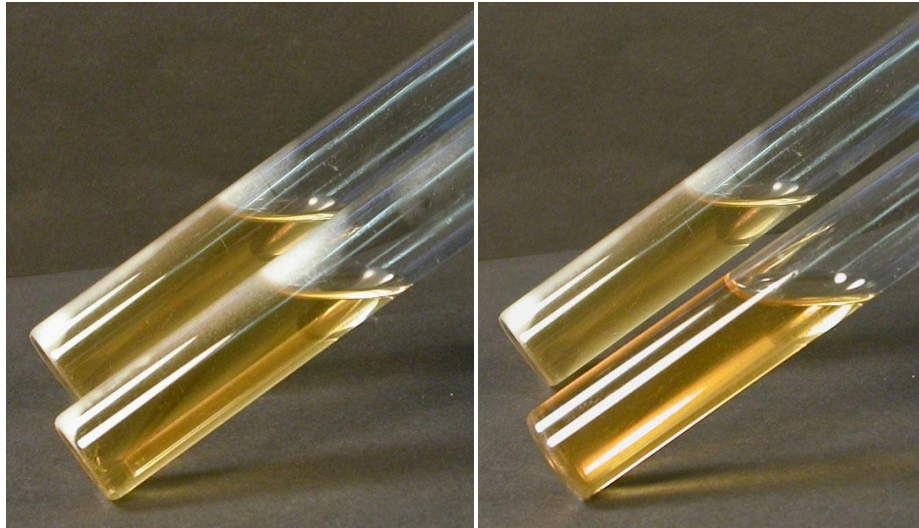
➤ **Pour l'isolat clinique *Actinomyces viscosus***

A 24 heures : les résultats des tests d'adhérence ne montrent pas d'inhibition dans la formation de biofilm pour les tubes témoins et les tubes tests à 10mM de vanilline. Pour les tubes témoins on retrouve sur les parois des tubes de verre un biofilm 3, pour les tubes tests à 10mM de vanilline on a un biofilm peu adhérent 1 et la présence de suspension bactérienne dans le milieu.

A 48 heures : tubes témoins : biofilm de score 4.

Tubes tests à 10mM : biofilm de score 3.

Pour les autres concentrations (20mM, 30mM, 40mM et 50mM) les résultats montrent une inhibition de la formation de biofilm car aucun biofilm ne s'observe sur les parois des tubes en verre.



A10mM de vanilline

A 20mM de vanilline

Figure 24 : vues des tests d'adhérence sur *A. viscosus* (isolat clinique).
En arrière-plan : tube témoin et au premier plan : tube test.

3. Inhibition d'adhérence : test sur biofilm pluri-espèces

Lors du comptage des bactéries sur chaque type de gélose, certaines des colonies ont été prélevées pour être identifiées par coloration de Gram et observation au microscope. Nous avons retrouvé 4 des espèces intégrées dans le biofilm : *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* et *Porphyromonas gingivalis*.

- *Actinomyces viscosus* : bacille Gram +
- *Streptococcus mutans* : cocci Gram +
- *Streptococcus oralis* : cocci Gram +
- *Porphyromonas gingivalis* : bacille Gram -

Par contre *Fusobacterium nucleatum* ne s'est pas intégré au biofilm et nous ne l'avons donc pas retrouvé sur les géloses ainsi que sur les Gram réalisés.

Les résultats des tests d'adhérence sur le biofilm pluri-espèces ne montrent pas d'inhibition dans la formation de biofilm que ce soit pour les disques témoins ou bien les disques tests à 30mM. Il n'y a aucune différence significative.

III. Discussion

Le but de ce travail était d'évaluer *in vitro* les propriétés de la poudre de vanilline sur la croissance et la formation de biofilm de bactéries cariogènes et impliquées dans la maladie parodontale et/ou l'halitose.

Sur l'ensemble des tests réalisés, les résultats ont montré l'effet inhibiteur de la vanilline sur la croissance de nos quatre bactéries testées : *Tannerella forsythia*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus* et *Streptococcus mutans*. La concentration d'inhibition est différente selon la bactérie étudiée, et les écarts peuvent être importants (20mM pour *T. forsythia* et 60mM pour *A. viscosus* ATCC).

Au niveau des tests d'adhérences réalisés (*L. rhamnosus* isolat clinique, *A. viscosus* ATCC, *A. viscosus* isolat clinique) à 24heures comme à 48heures, les résultats ont montré que la vanilline agit sur les **capacités d'adhérence**.

Concernant les tests d'adhérence sur un biofilm pluri-espèces, suite à des problèmes de dissolutions nous n'avons pu réaliser l'expérience uniquement que pour une concentration à 30mM de vanilline. A cette concentration on s'aperçoit que la vanilline n'inhibe pas la formation du biofilm. Les résultats sont non significatifs. De manière globale notre étude s'avère être en accord avec les résultats obtenus par le Docteur MEMBREDE C. (63).

Pour *Streptococcus mutans*, en comparant les 2 expériences, nous pouvons dire qu'il existe bel et bien une action sur la croissance bactérienne car une concentration de 30mM de poudre de vanilline était efficace pour diminuer de manière significative le nombre de colonies, et qu'à 20% d'extrait de vanille l'inhibition de la croissance bactérienne est totale. Pour *Lactobacillus rhamnosus* : les résultats obtenus convergent **puisque'on retrouve la même concentration d'inhibition 50mM**.

Le test d'adhérence bactérienne effectué en 2009 utilisant la souche *Streptococcus mutans* montre une inhibition de la formation de biofilm à partir de 30mM. Dans notre étude, ce test a aussi montré l'inhibition complète de la formation de biofilm pour *L. rhamnosus* isolat clinique (40mM), *A. viscosus* ATCC (20mM), *A. viscosus* isolat clinique (20mM).

Si nous comparons nos tests d'adhérence sur le biofilm pluri-espèces, on s'aperçoit que le Dr MEMBREDE a trouvé que pour une concentration de 20mM de vanilline, la formation du biofilm était inhibée de manière significative. Alors qu'à 30mM aucune inhibition n'a été retrouvée sur notre biofilm pluri-espèces.

Au sein de notre laboratoire s'effectue actuellement des expérimentations par le Docteur NGUYEN D. concernant un biofilm dynamique. Une fois le protocole mis en place il serait intéressant de faire les tests d'adhérence sur un biofilm dynamique pluri-espèces.

Par ailleurs, par manque de produit nous n'avons pu tester l'extrait de vanille uniquement que sur des tests sur *Streptococcus mutans* et pour une concentration à 20%. Il serait intéressant de

le tester à d'autres concentrations et sur d'autres bactéries ainsi que de réaliser des tests d'adhérence.

Dans le domaine agro-alimentaire de nombreuses études ont été réalisées mettant en évidence le pouvoir « anti-microbien » de la vanilline. Parmi ces études, celle du Dr NGARMSAK M. en 2006 a montré que la vanilline agissait aussi bien sur les bactéries (*P.agglomerans*, *Micrococcus*, *Acromanas enteropelogenes lylae* et *Shingobacterium spiritovorun*) que sur les levures ou les champignons retrouvés dans les aliments. (4) La vanilline est à l'heure actuelle bien connue pour ses propriétés « anti-microbiennes » dans le domaine agro-alimentaire, mais de plus en plus d'études dans le domaine médical pourront peut-être faire de cette molécule un **anti-bactérien « naturel »**.

Conclusion

Les différentes expérimentations menées au cours de cette étude, ont permis de mettre en évidence le caractère inhibiteur de la vanilline, aussi bien au niveau de la croissance que de l'adhérence de ces quatre bactéries : *Tannerella forsythia*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Actinomyces viscosus* et *Streptococcus mutans* impliquées dans les maladies bucco dentaires.

Outre le fait d'être utilisée dans l'industrie pharmaceutique ou agroalimentaire, la vanilline pourrait bientôt être utilisée en médecine buccale en tant qu'antibactérien « naturel ». Certes avant d'envisager son utilisation clinique, d'autres expérimentations supplémentaires devront être réalisées.

Annexes

Annexe 1 : milieu liquide pour *Tannerella forsythia*

ATCC medium: 1928 PY Medium (ATCC medium 1524) with horse serum and NAM

To the sterile completed PY medium [ATCC Medium 1524 (see below)], aseptically add the following to the final concentrations indicated: 5% sterile heat-inactivated horse serum and 15 mcg/ml filter-sterilized N-acetyl muramic acid.

ATCC Medium 1524:

Peptone, Bacto (BD 211677).....5.0 g
Trypticase Peptone (BD 211921).....5.0 g
Yeast extract.....10.0 g
0.025% Resazurin, aqueous.....4.0 ml
Salt Solution (see below).....40.0 ml
Hemin Solution (see below).....10.0 ml
Vitamin K1 Solution (see below)....0.2 ml
L-Cysteine . HCl.....0.5 g
Distilled water.....950.0 ml

Adjust medium for a final pH of 7.0. Mix all ingredients except cysteine and bring to boil under 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂. Add cysteine and re-adjust pH, if necessary. Tube medium anaerobically using Hungate methods and the same gas phase. Autoclave at 121C for 15 minutes.

Salt Solution:

CaCl₂.....0.2 g
MgSO₄.....0.2 g
K₂HPO₄.....1.0 g
KH₂PO₄.....1.0 g
NaHCO₃.....10.0 g
NaCl.....2.0 g
Distilled water.....1.0 L

Mix CaCl₂ and MgSO₄ in 300.0 ml distilled water until dissolved. Add 500.0 ml water and the remaining salts while swirling slowly. Add 200.0 ml distilled water and mix. Store at 4C.

Hemin Solution:

Hemin.....50.0 mg
N NaOH.....1.0 ml
Distilled water to.....100.0 ml

Suspend hemin in NaOH; then add water. Autoclave at 121C for 15 minutes.

Vitamin K1 Solution:

Vitamin K1.....0.15 ml
95% Ethanol.....30.0 ml

Store in brown bottle at 4C. Discard after 1 month.

Annexe 2 : Composition du Fluid Universal Medium (FUM) (Gmur et Guggenheim, 1983)

- Tryptone 10 g/l
- Extrait de levure 5 g/l
- Glucose 3 g/l
- Hémine 0,002 g/l
- Ménadione 0,001 g/l
- Hydrochlorure de cystéine 0,5 g/l
- Dithiothreitol 0,1 g/l
- NaCl 2,9 g/l
- Na₂CO₃ 0,5 g/l
- KNO₃ 1 g/l
- K₂HPO₄ 0,45 g/l
- (NH₄)₂SO₄ 0,9 g/l
- MgSO₄ 0,188 g/l
- Sérum de veau fœtal 5%
- pH à ajuster à 7.1 +/- 0,2
-

Annexe 3 : Composition pour gélose Fuso

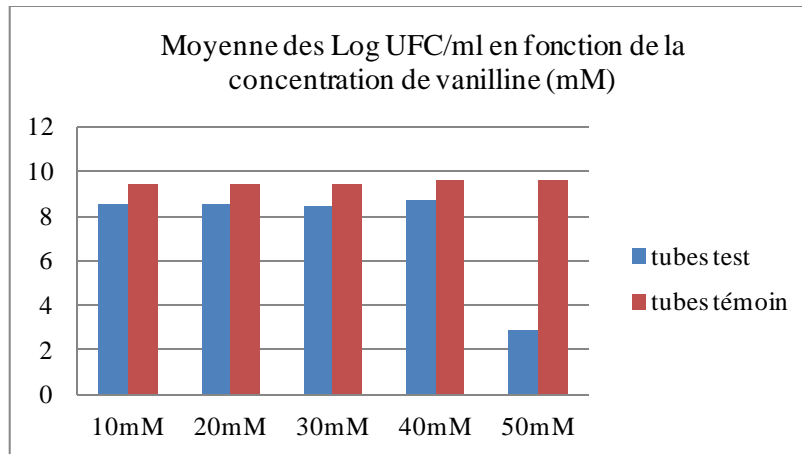
- Digestion pancréatique de caséine 15g
- Digestion papaique de semoule de soja 5g
- Chlorure de sodium 5g
- Gélose 20g
- Extrait de levure 5g
- Hémine 0,005g
- Vitamine K1 0,01
- L Cystéine 0,4g
- Sang de mouton défibriné 5%
- pH 7,5 +/- 0,2

Annexe 4 : Résultats

➤ Tests d'inhibition de croissance bactérienne : méthode par dilution.

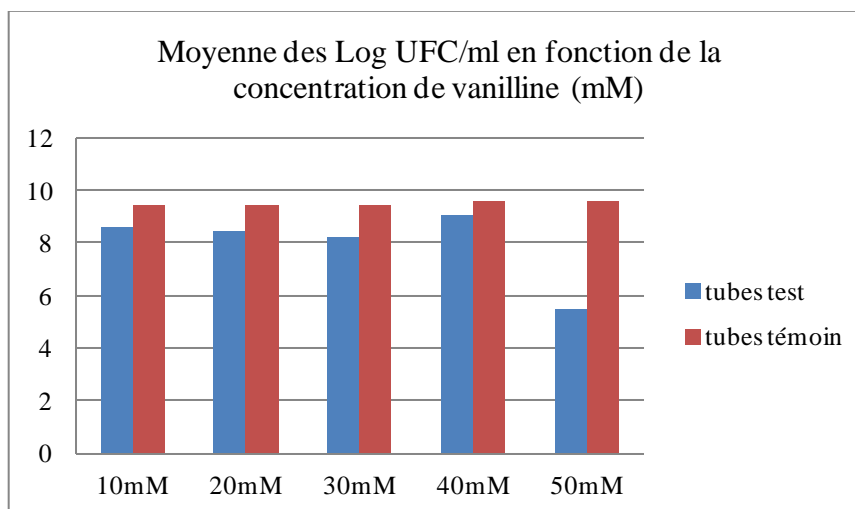
- *Lactobacillus rhamnosus* ATCC

Moyenne Log UFC/ml	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM
tubes test	8,54	8,5	8,49	8,7	2,89
tubes témoin	9,47	9,47	9,47	9,61	9,61



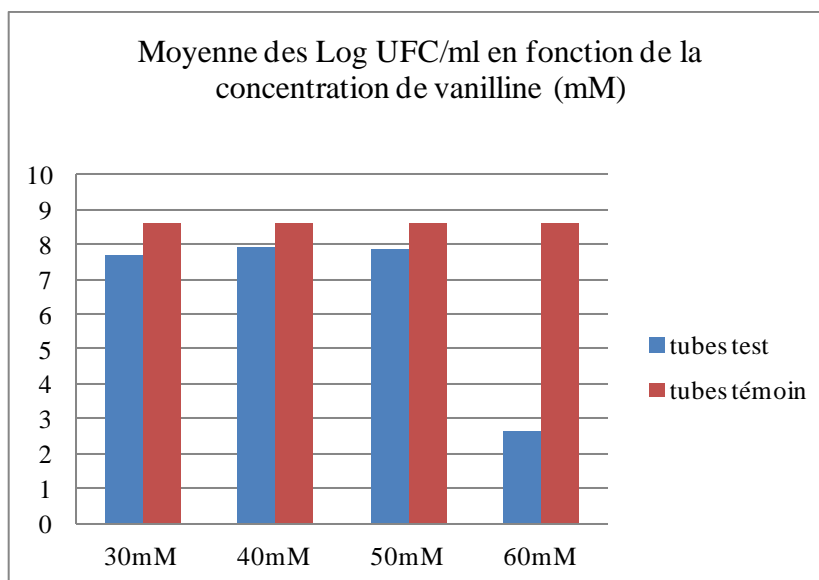
- *Lactobacillus rhamnosus* (isolat clinique)

Moyenne Log UFC/ml	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM
tubes test	8,61	8,49	8,2	9,04	5,45
tubes témoin	9,43	9,43	9,43	9,62	9,62



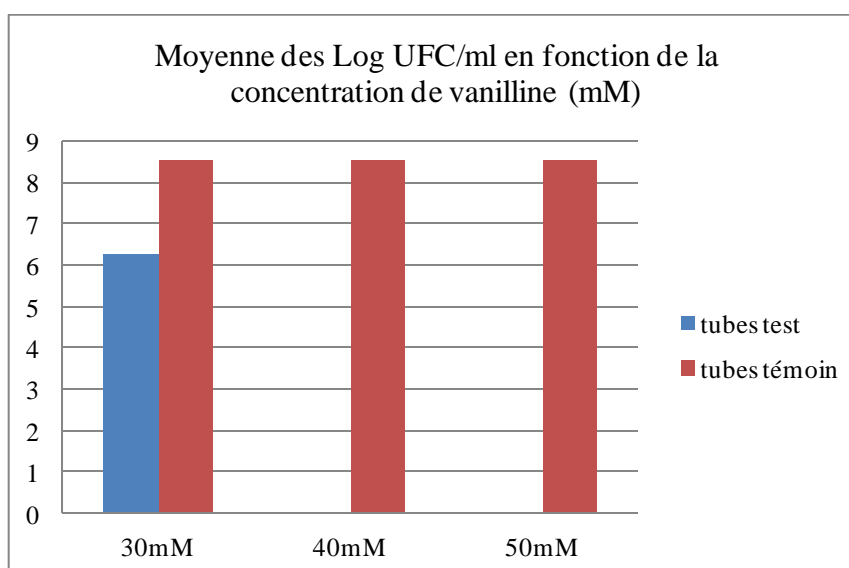
- *Actinomyces viscosus* ATCC

Moyenne Log UFC/ml	30mM	40mM	50mM	60mM
tubes test	7,7	7,92	7,86	2,66
tubes témoin	8,64	8,64	8,64	8,64



- *Actinomyces viscosus* (isolat clinique)

Moyenne Log UFC/ml	30mM	40mM	50mM
tubes test	6,28	0	0
tubes témoin	8,53	8,53	8,53



- *Streptococcus mutans* ATCC

Moyenne Log UFC/ml	20% d'extrait de vanille
tubes test	0
tubes témoin	7,5975

➤ Test d'inhibition d'adhérence : test des tubes inclinés. A48 heures

- *Lactobacillus rhamnosus* (isolat clinique)

témoins	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM
3	2	2	3	0	0

- *Actinomyces viscosus* ATCC

témoins	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM	60mM
3	1	0	0	0	0	0

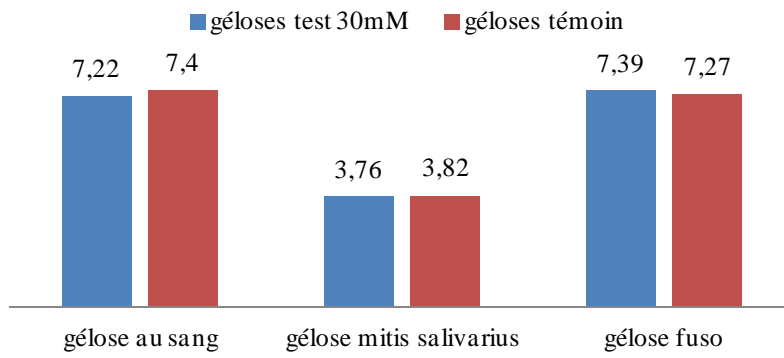
- *Actinomyces viscosus* (isolat clinique)

témoins	10mM	20mM	30mM	40mM	50mM
4	3	0	0	0	0

➤ Test d'inhibition d'adhérence : biofilm pluri-espèces.

moyenne Log UFC/ml	gélose au sang	gélose mitis salivarius	gélose fuso
gélouses test 30 mM	7,22	3,76	7,39
gélouses témoin	7,4	3,82	7,27

Moyenne des Log UFC/ml en fonction du type de gélose



Références

- (1) Tabassum S. et al. Mixed-ligand Cu(II)-vanillin Schiff base complexes; effect of coligands on their DNA binding, DNA cleavage, SOD mimetic and anticancer activity. *Eur J Med Chem.* 2013 Feb; 60,pp216-32.
- (2) Ohta T. et al. Inhibitory effects of flavourings on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. *Food Chem Toxicol.* 1986 Jan; 24(1),pp51-4.
- (3) K wang-Deog Moon et al. Effect of vanillin on the fate of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in model apple juice medium and in apple juice. *Food microbiology* 2006,pp 169-174.
- (4) Ngarmsak M. and al. Antimicrobial activity of vanillin against spoilage microorganisms in stored fresh-cut mangoes. *J Food Prot.* 2006 Jul; 69 (7),pp 1724-7.
- (5) kits d'outils. Journée mondiale de la santé buccodentaire. 2014
- (6) Mouton C. Bactériologie bucco-dentaire. Edition Abrégés d'odontologie et de stomatologie. Masson. Paris, 1994.
- (7) Badet C. Étude clinique de la carie. *EMC - Médecine buccale* 2011:1-7 [Article 28-260-M-10].
- (8) C. Joseph, F. Courson Pédiatrie et urgence odontologique *EMC. Médecine buccale* 2006. *Archives de pédiatrie.* Juin 2006, 13(6), pp 678-679.
- (9) Hescot P, Roland E. La Santé Dentaire en France -- Paris : Monographie SNPMD; 1999. 128 p.
- (10) WHO/NMH/NPH/ORH/03.2. Organisation mondiale de la santé. Poul Erik Petersen. Rapport sur la santé bucco-dentaire dans le monde 2003. Genève.
- (11) HAS service évaluation économique et santé publique. Stratégie de prévention de la carie dentaire. mars 2010.
- (12) M. Sixou, A. Diouf, D. Alvares. Antibiotiques. Biofilm buccal et pathologies buccodentaires. septembre 2007, Vol 9, N° 3 -, pp. 181-188.
- (13) Julie Bonnot a, François Pillon b. Une bonne hygiène bucco-dentaire pour prévenir les caries. *Actualités pharmaceutiques.* Mars 2013, Volume 52, numéro 524, pp 39-44.
- (14) F. Fioretti Y. Haïkel caries et sucres. *EMC Médecine des maladies Métaboliques* Vol4, N° 5 - octobre 2010.
- (15) Lamont R . *Oral microbiology at a glance.* Chichester, West Sussex, U.K. ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. p 85.

- (16) Chardin H. Microbiologie en odonto-stomatologie. Maloine 2006.
- (17) Kolenbrander P. E. et al. Communication among Oral Bacteria. Microbiology and molecular biology reviews, Sept. 2002, Vol. 66, No. 3, pp 486–505.
- (18) De Soet J.J., De Graaff J. Microbiology of carious lesions. Dent. Update 1998; 25, pp 319-324.
- (19) Calas-Bennasar, O. Jame, V. Orti, P. Gibert. Classification des maladies parodontales. EMC - Odontologie 2014;9(2), pp 1-9 [Article 23-441-A-10].
- (20) Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol. 1992 Apr;63(4 Suppl), pp 322-31
- (21) Mailharrin A. Etude expérimentale de la flore linguale. 75 pages. Th. d'exercice: Odontologie : Bordeaux déc 2014 : n°53.
- (22) Tanner ACR, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R Jr, Van Dyke T, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. J Dent Res. avr 2006;85(4), pp 318-23.
- (23) Samaranayake, Lakshman P Essential microbiology for dentistry. Elsevier Churchill Livingstone 2006.
- (24) Association Dentaire Française. La carie. [Ressource électronique]. Disponible sur : <http://www.adf.asso.fr/fr/presse/fiches-pratiques/carie>
- (25) Washio J, Sato T, Koseki T, Takahashi N. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. J Med Microbiol. sept 2005; 54 (Pt 9), pp 889-95.
- (26) Bercy P, Tenenbaum H. Parodontologie: Du diagnostic à la pratique. De Boeck Supérieur; 1996. 288 p.
- (27) Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. Trends Immunol. janv 2014;35(1), pp 3-11.
- (28) Armitage, G.C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions, Ann Periodontol. 1999, 4(1), pp 1-6.
- (29) Olane F. Les tests biologiques en parodontologie. 148 pages. Th.d'exercice : odontologie : Bordeaux : déc 2008 : n°47.
- (30) He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. Clin Oral Investig. déc 2012;16(6), pp 1579-88.
- (31) Tachibana M, Yoshida A, Ansai T, Takata Y, Akifusa S, Fukuhara M, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria on the tongue dorsum of elderly people. Gerodontology. juin 2006;23(2), pp 123-6.

- (32) Calil C, Liberato FL, Pereira AC, de Castro Meneghim M, Goodson JM, Groppo FC. The relationship between volatile sulphur compounds, tongue coating and periodontal disease. *Int J Dent Hyg.* nov 2009;7(4), pp251-5.
- (33) Amou T, Hinode D, Yoshioka M, Grenier D. Relationship between halitosis and periodontal disease - associated oral bacteria in tongue coatings. *Int J Dent Hyg.* 2014 May;12(2), pp 145-51. doi: 10.1111/idh.12046. Epub 2013 Jul 26.
- (33) Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol* 2000. juin 2010; 53, pp 28-44.
- (34) Socransky S.S., Haffajee A.D., Cugini M.A., Smith C. et Kent R.L. Microbial complexes in subgingival plaque ; *J Clin Periodontol.* 1998 ; 25, pp 134 - 144,
- (35) Joachim F, Charon J. Quelle est la place de la microbiologie en parodontie clinique ? *Le fil dentaire.* Déc 2010 ; 58, pp 16-21.
- (36) T. Dufour, J.-M. Svoboda. Pathogénie bactérienne des parodontolyses. *EMC - Médecine buccale* 2008:1-9 [Article 28-265-M-10].
- (37) Y. Melchior. Halitose Du symptôme à la prescription en médecine générale Chapitre 20. 2009 Elsevier Masson.
- (38) Pillon F. L'halitose, quelques notions à connaître. Dossier : l'hygiène bucco-dentaire à l'officine. *Actualités pharmaceutiques.* avril 2010 Vol 49, N° 495, pp. 20-21
- (39) Gennart F., Loeb I. Halitose et polyphénols. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale* juin 2006. Vol 107, N° 3 - Pp 181-182
- (40) Meningaud J.-P., Bado F., Favre E., Bertrand J.-C., Guilbert F. ·L'Halitose en 1999. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-Faciale* - novembre 1999 Vol 100, N° 5 p. 240
- (41) Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes Infect Inst Pasteur.* mai 2002;4(6), pp 679-83.
- (42) Yasukawa T, Ohmori M, Sato S. The relationship between physiologic halitosis and periodontopathic bacteria of the tongue and gingival sulcus. *Odontol Soc Nippon Dent Univ.* févr 2010;98(1), pp 44-51.
- (43) Kishi M, Ohara-Nemoto Y, Takahashi M, Kishi K, Kimura S, Aizawa F, et al. Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. *Arch Oral Biol.* mars 2013;58(3), pp 324-30.
- (44) Riggio MP, Lennon A, Rolph HJ, Hodge PJ, Donaldson A, Maxwell AJ, et al. Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. *Oral Dis.* avr 2008;14(3), pp 251-8.
- (45) Allaker R.P. Topographic distribution of bacteria associated with oral malodour on the tongue. *Archives of Oral Biology.* 2008, Volume 53, Supplement 1, pp S8-S12

- (46) Ademovski SE, Persson GR, Winkel E, Tangerman A, Lingström P, Renvert S. The short-term treatment effects on the microbiota at the dorsum of the tongue in intra-oral halitosis patients--a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. mars 2013;17(2), pp 463-73.
- (47) Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, Zambon MM, Gerber D, Rego R, et al. Identification of oral bacterial species associated with halitosis. *J Am Dent Assoc*. août 2007;138(8), pp 1113-20.
- (48) Tanaka M, Yamamoto Y, Kuboniwa M, Nonaka A, Nishida N, Maeda K, et al. Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. *Microbes Infect Inst Pasteur*. oct 2004;6(12), pp 1078-83.
- (49) Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol*. févr 2003;41(2), pp 558-63.
- (50) VISSET-PERON V. La vanille : de Montezuma au médicament. 65 pages Th. D'exercice : pharmacie : Nantes : Avril 2007 : n°14.
- (51) Daphna Havkin-Frenkel, Faith C. Belanger. *Handbook of Vanilla*. Science and Technology. édition Wiley-Blackwell. p 363 Oct 26, 2010.
- (52) Eric Odoux And Michel Grisoni. *Vanilla*. CRC Press Inc P 402. juillet 2010.
- (53) Rita Singh, *Encyclopaedic dictionary of bio-medicine*. New Delhi, Sarup & Sons, 2001.
- (54) Aubaille F. *Vanille et orchidées édition edisud et musée international de la parfumerie*. 1993.
- (55) Lecomte H. *Le vanillier : sa culture, préparation et commerce de la vanille*. édition naud. 1901.
- (56) Bourriquet g 1954 historique, culture, pathologie, technologie. *Encyclopédie biologique*, XLVI : Le vanillier et la vanille dans le monde.
- (57) Bouthin b. *La vanilline dualité synthétique-naturel*. 2005/2006. [Ressource électronique] disponible sur : http://www.prepa-cpe.fr/documents/La_vanilline.pdf
- (58) A. Jenkins, N.K. Erraguntla. Vanillin. *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Pages 912-914, Current as of 1 September 2014.
- (59) 5ÈME ÉDITION DE LA PHARMACOPÉE EUROPÉENNE. Direction Européenne de la Qualité du Médicament 2005.
- (60) KetLi H, Latifah Saiful Y, Norsharina I, Maznah I. Toxicology study of vanillin on rats via oral and intra-peritoneal administration. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 49, Issue 1, January 2011, pp 25-30.
- (61)A. Hannemann, U.M.C. Cytlak, O.T. Gbotosho, D.C. Rees, S. Tewari, J.S. Gibson. Effects of o-vanillin on K⁺ transport of red blood cells from patients with sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, Volume 53, Issues 1–2, June–August 2014, pp 21-26.

- (62) Ch. Pontillon. Fermentation de la vanille : la vanilline. Revue de botanique appliquée et d'agriculture coloniale Année 1930 Volume 10 Numéro 104 pp. 218-224.
- (63) Membre Christelle. Etude expérimentale des effets de la vanilline sur quatre bactéries buccales : *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum*. 60 pages. Th.d'exercice : odontologie : Bordeaux : oct 2009 : n°30.
- (64) Dianat M. et al. Disturbance effects of PM10 on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid. Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Nov 10.
- (65) Roberto Carrasco-Gomez, and al., Vanillin-derived antiproliferative compounds influence Plk1 activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Volume 24, Issue 21, 1 November 2014, pp 5063–5069.
- (66) Eduardo Hernández-Vázquez and al. 1,5-Diarylpyrazole and vanillin hybrids: Synthesis, biological activity and DFT studies. European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 100, 15 July 2015, pp 106-118.
- (67) Mohamed Makni, and al., Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of vanillin in carbon tetrachloride-treated rats Original Research. European Journal of Pharmacology, Volume 668, Issues 1–2, 1 October 2011, pp 133-139.
- (68) Akihiro T, Takeshi S, Futoshi Y, Hideyuki It Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, Volume 1810, Issue 2, February 2011, pp 170-177.
- (69) Compléments : l'arôme de vanille. [Ressource électronique] Disponible sur : <http://physique-chimie.asso-web.com/uploaded/compl-nts-vanille.pdf>.
- (70) Rakshita Maskeri et al., Evaluation of aphrodisiac effect of vanillin in male wistar rats. Pharmacognosy Journal, Volume 4, Issue 32, November–December 2012, pp 61-64.
- (71) L. Lupi-Pégurier, D. Bourgeois, M. Muller-Bolla. Épidémiologie de la carie. EMC - Odontologie 2010:1-13 [Article 23-010-A-20].
- (72) Photo de *Streptococcus mutans*. todar's online textbook of bacteriology. [Ressource électronique] Disponible sur : <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>.
- (73) Marsh, MV. Martin Oral microbiology (5th ed.)Churchill Livingstone, Edinburgh, 2009.
- (74) Bagg J. Essentials of microbiology for dental students. Oxford University Press, 1999.
- (75) P.Taillazier Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine [Vol. 6 - N° 1-C1 - p. 35-41].
- (76) Vidal née Lagrèze, Yvette. Etude expérimentale des relations lactobacille – carie. Th.d'exercice : 1979 : Bordeaux.

- (77) Photo de *Lactobacillus rhamnosus* - LSU lab (Dr. Karen Sullivan) en.wikipedia.org. [Ressource électronique] Disponible sur : https://en.wikipedia.org/wiki/File:Lactobacillus_rhamnosus.
- (78) Photo d'*Actinomyces viscosus*. Public Health Image Library (PHIL) /phil.cdc.gov. [Ressource électronique] Disponible sur : <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp>.
- (79) Photo de *Tannerella Forsythia*. LES PARODOTITES Recherche, Identification et Quantification des bactéries Parodontopathogènes. [Ressource électronique] Disponible sur : <http://www.institut-clinident.com/pdf/Perio-Analyse.pdf>.
- (80) HAFFAJEE and Sigmund S. SOCRANSKY microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000*. 2005;38 pp 9-12.
- (81) HOLT SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia* : the red complex a prototype polybactériale pathogenic consortium in periodontics, *periodontol 2000* 0005 :38 pp72-122.
- (82) L. Pierrard, J. Braux, F. Chatté, M.-L. Jourdain, J.-M. Svoboda. Étiopathogénie des maladies parodontales. *EMC - Médecine buccale* 2015;10(1):1-8 [Article 28-265-M-10].
- (83) Hamada S., Torii M. Effect of sucrose in culture media on the location of glycosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun*. 1978 ; 20 (3) pp592-9.
- (84) Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque, *J.Dent. Rest*, 2001, 80 pp363-370.

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 :

Marine LAI WAI

Le 10 mai 2016

Thèse pour l'obtention du DIPLOME d'ÉTAT de DOCTEUR en CHIRURGIE DENTAIRE 2016 - n°34

Sciences biologiques

**Etude de l'effet de la vanilline sur des bactéries buccales
à l'état planctonique et en biofilm**

Résumé :

La vanilline est une molécule présente dans la vanille. C'est cette molécule qui confère à la vanille son odeur très caractéristique. Actuellement elle est très utilisée dans le domaine agro-alimentaire et de la cosmétique.

L'objectif de notre travail a été d'étudier *in vitro* les propriétés antibactériennes et anti-biofilm de la vanilline sur des bactéries buccales responsables soit de maladies carieuses soit de maladies parodontales / halitose. Pour ce faire nous avons réalisé 2 tests (tests d'inhibition de croissance et tests d'adhérence (sur des tubes de verre inclinés et sur un biofilm pluri-espèces) pour lesquels nous avons varié la concentration de vanilline. Les résultats obtenus ont montré un effet inhibiteur sur la croissance et sur l'adhérence des quatre bactéries mais pas sur le biofilm pluri-espèces.

D'autres études sont nécessaires pour envisager la vanilline comme un anti bactérien « naturel ».

Mots clés :

Vanilline, bactéries buccales, biofilm, effet antibactérien et anti-biofilm.

**Study of the effect of vanillin on oral bacteria both in a
planctonic state and biofilm**

Summary :

Vanillin is a molecule present in the vanilla. This molecule is the main one who confers vanilla's characteristic odor. Currently it is widely used in the food industry and cosmetics.

The objective of our study was to study *in vitro* the antibacterial and anti-biofilm effects of vanillin on oral bacteria responsible for caries or periodontal disease or diseases / halitosis. To do that, we realized two tests (growth inhibition tests and adhesion tests (on glass tubes inclined and on a multi-species biofilm) and we varied the concentration of vanillin. The results obtained showed an inhibitory effect on the growth and adhesion of the four bacteria but not on the multi-species biofilm. This is why more studies are needed to consider vanillin as an "natural" antibacterial.

Keywords :

Vanillin, oral bacteria, biofilm, antibacterial and anti-biofilm effects.

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