



**HAL**  
open science

# Étude des mécanismes antibactériens de souches de *Streptococcus salivarius* et de leur effet sur deux bactéries de la maladie parodontale: *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*

Anaël Jabol

► **To cite this version:**

Anaël Jabol. Étude des mécanismes antibactériens de souches de *Streptococcus salivarius* et de leur effet sur deux bactéries de la maladie parodontale: *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*. Chirurgie. 2017. dumas-01561686

**HAL Id: dumas-01561686**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01561686>**

Submitted on 13 Jul 2017

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

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

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

Année 2017

N° 46

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

Présentée et soutenue publiquement

Par Anael JABOL

Née le 01 Janvier 1992 au Blanc-Mesnil (93), France

Le 22 Mai 2017

**Etude des mécanismes antibactériens  
de souches de *Streptococcus salivarius* et de leur effet  
sur deux bactéries de la maladie parodontale :  
*Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis***

Directeur de thèse

Docteur Marie-Cécile BADET

Membres du Jury

Président	Mme V. DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Mme C. BADET	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	M. J. SAMOT	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	Mme D. NGUYEN	Assistant Hospitalo-Universitaire

# UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ 01/02/2017

**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. Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques - Biomatériaux	58-03
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. 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 anatomiques et physiologiques	58-03
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Melle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
Melle	Anaïs	CAVARE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Hubert	CHAUVEAU	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M.	Jean-Baptiste	CULOT	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Cédric	FALLA	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme	Agathe	GREMARE	Sciences biologiques	57-03
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Adrien	LASTRADE	Prothèse dentaire	58-02
M.	Alexandre	MARILLAS	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Emmanuel	MASSON-REGNAULT	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme	Meriem	MESFIOUI	Parodontologie	57-01
Mme	Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
M.	Ali	NOUREDDINE	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M.	Antoine	PEPELUT	Parodontologie	57-01
Mme	Charlotte	RAGUENEAU	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Noëlla	RAJONSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M.	Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M.	Thibaut	ROULLAND	Prothèse dentaire	58-02
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèse dentaire	58-02
Mme	Audrey	SAY LIANG FAT	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03

## Remerciements

### A notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Véronique Dupuis

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

Chef de pôle d'Odontologie et de Santé Buccale du CHU de Bordeaux

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. Veuillez recevoir l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect à votre égard ainsi que ma gratitude pour votre disponibilité.*

### A notre Directeur de thèse

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences Biologique 57-03

*Je vous remercie du très grand honneur que vous m'avez fait de diriger cette thèse. Votre disponibilité, vos conseils et votre enthousiasme au laboratoire m'ont été précieux et m'ont donné la motivation permettant d'avancer toujours plus loin dans mes recherches. Merci pour votre bonne humeur et votre soutien en clinique comme au laboratoire. Ce fut un grand plaisir de travailler avec vous sur ce sujet. Veuillez recevoir l'expression de ma profonde considération et de mon respect à votre égard, ainsi que toute ma gratitude.*

A notre Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Johan SAMOT

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Sous-section Sciences Biologiques 57-03

*Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse et d'en être le rapporteur. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité. Merci pour les précieux conseils que vous m'avez apportés durant mon travail de recherche au laboratoire, mais aussi pendant mes vacances hospitalières à Saint-André. C'est avec beaucoup de gratitude que je vous exprime l'assurance de mon profond respect.*

A notre Assesseur

Madame le Docteur Darrène NGUYEN

Assistante Hospitalo-Universitaire

Sous-section Sciences Biologiques 57-03

*Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de juger cette thèse et je vous en suis très reconnaissante. Merci pour vos conseils, votre accompagnement et votre bonne humeur durant mes stages cliniques à Saint-André. Permettez-moi de vous témoigner toute ma gratitude et mon estime à votre égard.*

## Remerciements personnels

**A ma famille**, pour l'intérêt que vous m'avez porté, pour votre soutien et votre confiance.

**A mes parents, à ma Mère** merci pour ton soutien, tes conseils, d'avoir toujours été présente à chaque moment de ma vie quelle que soit la distance. Merci d'avoir toujours cru en moi et pour l'attention que tu m'as portée. **A mon père**, merci d'avoir toujours été là dès que j'en ai eu besoin. Merci pour ton aide et ton soutien. Ta présence sur Paris m'a énormément aidée ces dernières années.

**A mes sœurs, à Stanleen** ta présence sur Bordeaux m'a donné le courage dont j'avais besoin ces derniers mois, merci pour tous ces petits instants passés à deux et pour la confiance que tu me témoignes chaque jour. **A Yael**, merci d'avoir toujours été présente pour moi, notamment ces six dernières années, et de m'avoir toujours soutenue. A toutes nos virées sur Bordeaux et Paris, aux marchés de Noël, à tous ces moments inoubliables...

**A Anderson**, qui m'a donné le courage, l'envie d'avancer. Merci pour tes conseils, pour ton soutien à toute épreuve et pour l'attention que tu me portes. Merci d'avoir toujours été présent pour moi, et de l'avoir été au moment où j'en avais le plus besoin.

**A mes amis**, à toi **Jane** pour tous ces moments musicaux ces après-midis de natation passés ensembles, merci pour le soutien et l'aide que tu m'as apportés en particulier à Saint-André.

**A Mélissa**, et ses parents pour votre bonne humeur, votre accueil et tous les bons moments que vous nous avez permis de passer. **A Noémie** pour tous ces mercredis à Saint-André, pour ton aide et ta bonne humeur. **A Juliette** pour ta gentillesse. **A Maëva H.** pour ces deux années en binôme. **A Islaine, Sylvain, Mathilde, Maëva S., Marine...** et toutes les personnes que j'ai rencontrées ces dernières années.

**A Martine SM**, un grand merci ton aide au laboratoire et pour tous les conseils que tu m'as donnés pendant mes travaux de recherche, ils m'ont été très précieux.

**A Claudia**, pour ton amitié et pour toutes les personnes que tu m'as permis de rencontrer.

**A Adeline**, pour ta bonne humeur, ton humour et ta joie de vivre, à ton amitié qui m'est chère. Merci pour tous ces petits moments passés à Paris et toutes ces glaces partagées.

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>8</b>
<b>I. Travaux antérieurs : Etat des connaissances actuelles</b> .....	<b>10</b>
<b>I.1. <i>Streptococcus salivarius</i> : une bactérie d'intérêt majeur</b> .....	<b>10</b>
I.1.1. Famille - Ecologie - Habitat .....	10
I.1.2. Modalités de l'action antibactérienne .....	11
<b>I.2. Les bactéries responsables de la maladie parodontale</b> .....	<b>12</b>
I.2.1. Mécanismes de la maladie parodontale.....	12
I.2.2. Présentation de deux parodontopathogènes .....	20
<b>I.3. Bactéries parodontopathogènes et probiotiques: les études déjà menées</b> .....	<b>26</b>
I.3.1. Candidats probiotiques déjà testés contre des parodontopathogènes.....	26
I.3.2. Action de <i>Streptococcus salivarius</i> sur les parodontopathogènes.....	28
<b>II. Etude expérimentale : Effet de <i>Streptococcus salivarius</i> sur les pathogènes : <i>Fusobacterium nucleatum</i> et <i>Porphyromonas gingivalis</i></b> .....	<b>30</b>
<b>II.1. Souches testées et milieux de culture</b> .....	<b>30</b>
<b>II.2. Matériels et méthodes</b> .....	<b>31</b>
II.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de la double gélose...	31
II.2.2. Etude des propriétés d'adhérence par la méthode en tube de verre .....	33
II.2.3. Etude des interactions au sein d'un biofilm expérimental .....	34
II.2.4. Recherche des gènes de salivaricines .....	36
<b>II.3. Résultats</b> .....	<b>38</b>
II.3.1. Mesure des diamètres d'inhibition .....	38
II.3.2. Etude de l'adhérence .....	41
II.3.3. Les interactions observées au sein du biofilm.....	42
II.3.4. Les gènes de salivaricines .....	44
<b>II.4. Discussion</b> .....	<b>45</b>
<b>Conclusion</b> .....	<b>48</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>49</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>50</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>55</b>
<b><u>Annexe 1</u> : Composition de la gélose molle BHI et de la gélose TS</b> .....	<b>55</b>
<b><u>Annexe 2</u> : Composition du milieu FUM et du milieu TS</b> .....	<b>56</b>
<b><u>Annexe 3</u> : Protocole d'extraction d'ADN</b> .....	<b>57</b>
<b><u>Annexe 4</u> : Protocole Electrophorèse sur gel d'agarose</b> .....	<b>60</b>
<b><u>Annexe 5</u> : Tableau des résultats des scores d'adhérence obtenus pour chaque souche de <i>S. salivarius</i></b> .....	<b>61</b>



## Introduction

*Streptococcus salivarius* est le premier colonisateur de la cavité buccale du nouveau-né. Selon la littérature, la présence de cette bactérie est associée à un bon état de santé bucco-dentaire. Ses propriétés antibactériennes ont déjà été mises en évidence au niveau intestinal, aboutissant à son utilisation en tant que probiotique. (10, 11, 13)

Un probiotique est un organisme vivant bénéfique pour l'hôte qu'il colonise. Des compétitions inter bactériennes peuvent se mettre en place et limiter l'évolution de la flore pathogène afin de maintenir un équilibre au niveau de la cavité buccale et ainsi éviter la survenue ou persistance de pathologies. C'est le principe des probiotiques. (48)

Les propriétés antibactériennes de souches de *S. salivarius* contre la maladie carieuse et les pathogènes associés ont également commencé à être explorées (11,18) Cependant ces propriétés sont, à l'heure actuelle, très peu étudiées dans le domaine de la maladie parodontale. Si certains travaux se sont intéressés brièvement aux interactions de *S. salivarius* avec des bactéries parodontopathogènes (33,56), aucun n'a encore exploré l'action potentiellement inhibitrice de *S. salivarius* contre des bactéries impliquées dans l'apparition et la progression de la maladie parodontale. Toutefois des études se sont intéressées à l'action de certains probiotiques en parodontologie. Les principales souches bactériennes testées ont été les bifidobactéries et les lactobacilles, dont l'action inhibitrice sur des bactéries parodontopathogènes a déjà été montrée (48, 53). L'utilisation de ces bactéries comme probiotique permettrait de diminuer le nombre de bactéries de la flore pathogène et de réduire les signes cliniques des différentes formes de maladies parodontales. Cependant les mécanismes d'action sont encore peu connus.

Les propriétés antibactériennes de *S. salivarius* pourraient être en rapport avec la sécrétion de molécules actives contre des espèces potentiellement pathogènes au niveau de la cavité buccale. (13, 25, 46, 59)

Le but de cette étude est de mettre en évidence l'action antibactérienne d'isolats cliniques de *S. salivarius* contre deux souches de pathogènes buccaux : *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*, et d'investiguer les mécanismes responsables de cette activité. L'activité antibactérienne sera étudiée sur des souches à l'état planctonique et

sur un modèle de biofilm expérimental. L'adhérence sera mesurée et les mécanismes antibactériens seront étudiés au niveau génotypique. L'objectif de notre travail est de trouver des souches de *S. salivarius* ayant une activité antibactérienne intéressante et pouvant donc être utilisées comme probiotique à visée bucco-dentaire.

# I. TRAVAUX ANTERIEURS : ETAT DES CONNAISSANCES ACTUELLES

## I.1. *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* : UNE BACTERIE D'INTERET MAJEUR

### I.1.1. Famille - Ecologie - Habitat

*Streptococcus salivarius* est un streptocoque oral du groupe *Salivarius*. C'est un cocci Gram positif, le plus souvent groupé en chaînette, qui appartient à la famille des *Streptococcaceae* (Figure 1).

La paroi de ces bactéries est assez épaisse (30 à 300nm) et est constituée essentiellement de peptidoglycanes qui en constituent 40 à 80%; les autres constituants étant les acides teichoïques et les acides lipoteichoïques (LTA) (14). Les LTA jouent un rôle dans l'adhérence aux cellules et aux bactéries.

Les streptocoques buccaux font partie de la flore commensale de la cavité buccale et du tractus respiratoire chez l'homme et chez l'animal, ils représentent plus de 20% de la flore buccale (14).

*Streptococcus salivarius* est une des premières bactéries à coloniser la cavité buccale et l'intestin du nouveau-né. Dans la cavité buccale, ses principaux sites d'installation sont la face dorsale de la langue et les épithéliums buccaux. (33)

Son rôle est fondamental dans l'homéostasie c'est-à-dire, dans le maintien de l'équilibre de la flore microbienne. Sa présence est en général associée à un bon état de santé général et bucco-dentaire. Chez un individu en bonne santé, elle n'initie pas de processus infectieux.

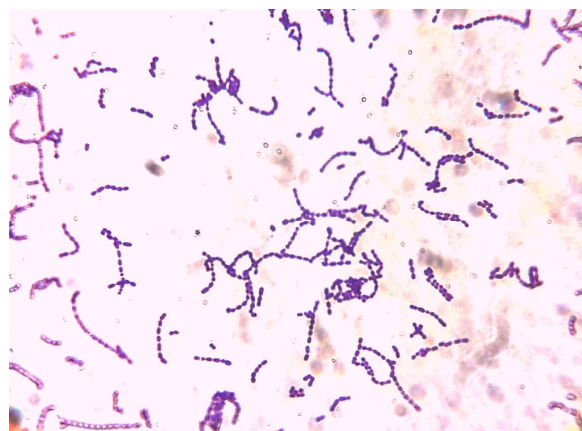


Figure 1 : Structure de *Streptococcus salivarius* : cocci Gram+ en chaînette (crédit photo A. JABOL)

### **I.1.2. Modalités de l'action antibactérienne**

L'intérêt majeur de ces streptocoques reste la capacité de certaines souches à produire des substances inhibitrices : les bactériocines. Ce sont des lantibiotiques appelées salivaricines dont l'activité serait particulièrement forte sur certains pathogènes tels que *Streptococcus pyogenes* (13, 25, 46, 59).

Parmi les salivaricines connues, on retrouve la salivaricine A, à propriété bactériostatique, la salivaricine B, bactéricide et synthétisée par la souche K12, les salivaricines D et G32 mais également la salivaricine 9 synthétisée par la souche NU10, qui est bactéricide et induit la formation de pores dans la membrane cytoplasmique.

La capacité à produire des bactériocines et la forte activité antibactérienne de *Streptococcus salivarius* ont conduit à son utilisation en tant que probiotique, notamment comme moyen de prévention dans certaines pathologies buccales ou extra-buccales.

Pour rappel, un probiotique est un organisme vivant bénéfique pour l'hôte qu'il colonise, lorsqu'il est administré de façon adéquate (48). Il est capable de rentrer en compétition avec d'autres pathogènes buccaux. Cette compétition interbactérienne permet de contribuer au maintien de l'homéostasie de l'écosystème buccal, c'est-à-dire de maintenir un équilibre entre la flore pathogène et la flore associée à un bon état de santé buccal en limitant l'évolution des bactéries pathogènes.

Le premier probiotique oral à avoir été utilisé est la souche *S. salivarius* K12. Elle a été isolée à partir d'un prélèvement réalisé au niveau de la gorge d'un enfant en Nouvelle Zélande. C'est une souche capable de produire deux lantibiotiques différents : la salivaricine A2 et la salivaricine B (10, 16). Certaines études ont montré l'efficacité de ce probiotique dans le traitement de l'halitose et le maintien d'une bonne santé de l'oropharynx (9, 17, 25).

## **I.2. LES BACTERIES RESPONSABLES DE LA MALADIE PARODONTALE**

### **I.2.1. Mécanismes de la maladie parodontale**

#### ***La maladie parodontale***

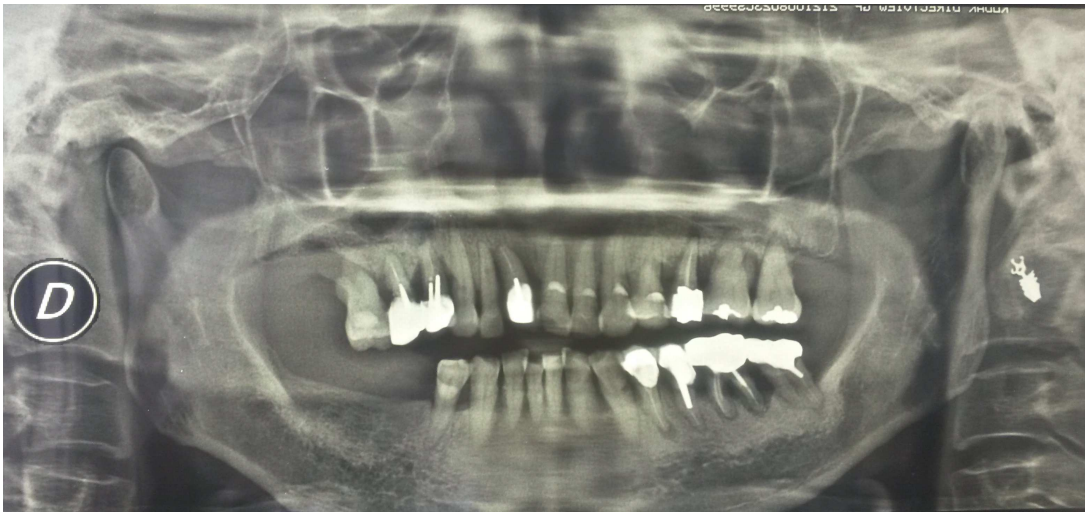
La maladie parodontale est une maladie d'origine infectieuse. Elle est associée à l'accumulation de plaque dentaire et de tartre dans l'espace sous-gingival. C'est une réponse inflammatoire consécutive à une agression bactérienne qui entraîne la destruction des tissus de soutien de la dent. Les fibres supra-crestales sont les premières atteintes. L'inflammation progresse ensuite vers les tissus plus profonds, atteignant le desmodonte, le cément et l'os alvéolaire. Cette perte d'os entraîne d'importantes récessions de la gencive le recouvrant et crée ainsi des dénudations radiculaires conséquentes (Figure 2 et 3). L'exposition des racines conduit à des problèmes buccodentaires majeurs : hypersensibilité, carie radiculaires, mobilités et dans les cas extrêmes, la perte de la dent.



**Figure 2 : Patiente atteinte de parodontite chronique généralisée  
(crédit photo A. JABOL)**

Différentes classifications des maladies parodontales existent. La classification extraite d'Annals of Periodontology de 1999, répartit les parodontites selon la forme clinique et l'agressivité des lésions rencontrées (1). Il existe donc différents types de parodontite :

- Les maladies gingivales ou gingivopathies
- Les parodontites chroniques (localisée ou généralisée) : à progression lente qui se développent entre les 30 à 40 ans. Le stade de la parodontite chronique s'évalue selon l'étendue et le degré de sévérité de la lésion.
- Les parodontites agressives : caractérisées par l'évolution rapide de leurs lésions. Elles sont moins fréquentes et diagnostiquées chez des patients jeunes (entre 20 et 30 ans), majoritairement des femmes. Elles présentent des stades aigus et chroniques (61).
- La parodontite en tant que manifestation d'une maladie systémique. Elle peut être associée à : des dysfonctionnements hématologiques, des maladies génétiques et d'autres maladies systémiques (61).
- Les maladies parodontales nécrosantes aiguës : la gingivite ulcéronécrotique, la parodontite ulcéronécrotique et les abcès parodontaux.



**Figure 3 Evaluation radiologique de l'atteinte osseuse: parodontite chronique sévère généralisée (crédit photo A. Jabol)**

La maladie parodontale est un problème de santé publique majeur, puisque la population atteinte augmente chaque année, ce phénomène étant accentué par un allongement de la durée de vie. La proportion de patients touchés par cette maladie serait supérieure au tiers de la population mondiale (56).

### *Le processus infectieux de la maladie parodontale*

L'écosystème buccal est un système en équilibre (Figure 4). Il est constitué, chez un individu sain, par une flore commensale non pathogène de bactéries dites protectrices. Ces bactéries jouent un rôle de barrière contre les bactéries dites pathogènes et limitent leur installation dans la flore buccale. Lorsque la prolifération de ces pathogènes n'est plus contrôlée, les infections peuvent alors se développer (14,48). C'est ce déséquilibre au niveau de l'écosystème buccal qui sera à l'origine des différentes pathologies buccodentaires telles que la maladie parodontale.

La maladie parodontale est une maladie infectieuse avec une prédominance de bactéries anaérobies, pour la plupart à Gram négatif. C'est une réponse inflammatoire à l'augmentation du nombre de ces bactéries dans le sulcus gingival et à la virulence de ces pathogènes (14).

Les bactéries parodontogènes sécrètent des toxines, des métabolites et des enzymes lytiques qui agressent le parodonte et entraînent sa destruction. La dégradation du parodonte est ensuite accentuée par la réponse immunitaire. En effet, les produits de sécrétion des bactéries pathogènes stimulent les cellules hôtes résidentes et immigrantes, qui à leur tour expriment des enzymes de dégradation des tissus, en réponse à l'agression bactérienne (14).

Ces pathogènes provoquent donc une réponse immune, caractérisée par le relargage de cytokines par les cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages...) : élément déclencheur des voies de dégradation, dont la résorption osseuse ostéoclastique.

Certaines de ces enzymes facilitent la progression des pathogènes en augmentant la perméabilité de l'épithélium de jonction. Une partie d'entre-elles dégrade directement les protéines de la matrice extracellulaire (les protéases, la chondroïtine et la hyaluronidase) ; d'autres agissent sur l'adhésion cellule-cellule en dégradant les cadhérines (glycoprotéines responsable de l'adhésion intercellulaire) (14).

	Gram positif		Gram négatif	
<b>Procaryotes</b>	Anaérobies facultatifs	Anaérobies stricts	Anaérobies facultatifs	Anaérobies stricts
<b>Cocci</b>	<b>Streptocoques</b> <i>S. anginosus (S. milleri), S. mutans, S. anguis, S. oralis, S. mitis, S. intermedius</i>	<b>Peptostreptocoque</b> <i>P. micro</i>	<b>Neisseria</b>	<b>Veillonella</b> <i>V. parvula</i>
		<b>Peptocoque</b>	<b>Branhamella</b>	
<b>Bacilles (Bâtonnets)</b>	<b>Actinomyces</b> <i>A. naelundii, A. viscosus, A. odontolyticus, A. israelii</i>	<b>Eubacterium</b> <i>E. nodatum, E. saburreum, E. timidum, E. brachy, E. alactolyticum</i>	<b>Actinobacillus</b> <i>Aggregatibacter actinomycetem-comitans</i>	<b>Porphyromonas</b> <i>P. gingivalis, P. endodontalis</i>
	<b>Propionibacterium</b>	<b>Bifidobacterium</b> <i>B. dentium</i>	<b>Capnocytophaga</b> <i>C. ochracea, C. gingivalis, C. sputigena</i>	<b>Prevotella</b> <i>P. intermedia, P. nigrescens, P. melaninogenica, P. denticola, P. loescheii, P. oris, P. oralis</i>
	<b>Rothia</b> <i>R. dentocariosa</i>		<b>Campylobacter</b> <i>C. rectus, C. curvus, C. showae</i>	<b>Bacteroides</b> <i>Tannerella forsythensis (Tannerella forsythia), B. gracilis</i>
	<b>Lactobacillus</b> <i>L. oris, L. acidophilus, L. salivarius, L. buccalis</i>		<b>Eikenella</b> <i>E. corrodens</i>	<b>Fusobacterium</b> <i>F. nucleatum, F. periodonticum</i>
			<b>Haemophilus</b> <i>H. aphrophilus, H. segnis</i>	<b>Selenomonas</b> <i>S. sputigena, S. noxia</i>
<b>Spirochètes et mycoplasmes</b>		<b>Mycoplasma</b> <i>M. orale, M. salivarium, M. hominis</i>	<b>Spirochètes de la GUNA</b> <i>Treponema sp. T. denticola – T. vincentii T. socranskii – T. pectinovorum</i>	
<b>Eucaryotes</b>	<b>Candida</b> <i>C. albicans</i>	<b>Entamoeba</b>	<b>Trichomonas</b>	

**Figure 4 Les microorganismes de la plaque**

( Source: Wolf H, Rateitschak EM, RateitschakKH. Parodontologie. Issy-les-Moulineaux : Editions Masson ; 2005)

### ***Bactéries parodontopathogènes : les interactions bactériennes***

La seule présence de ces bactéries ne suffit pas à initier le processus de la maladie parodontale. Chez un individu sain, elles sont présentes dans le sulcus mais sont en équilibre avec la communauté bactérienne sous gingivale et l'hôte. C'est à la rupture de cet équilibre qu'apparaît la maladie parodontale. Les bactéries parodontopathogènes deviennent alors dominantes par rapport aux bactéries dites bénéfiques et remplacent progressivement la flore commensale (14, 33).

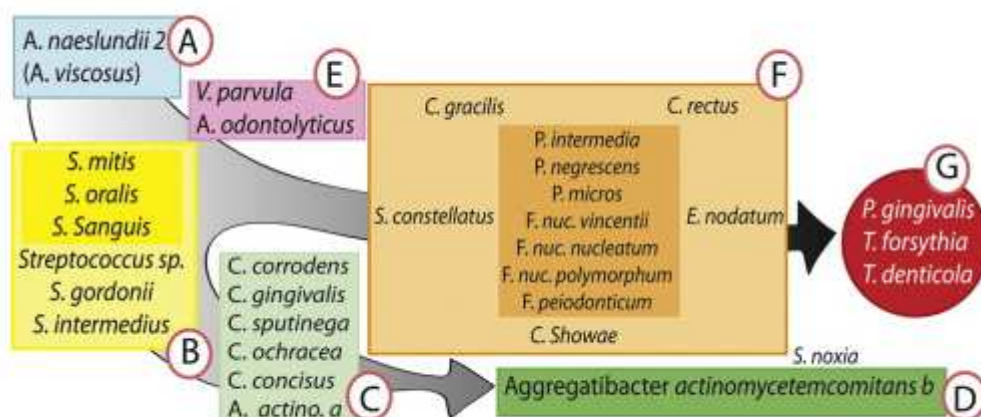


Le déséquilibre peut être accentué par une baisse des défenses immunitaires ou par une modification des conditions environnementales du site (suite à une prise médicamenteuse par exemple).

Lorsque les parodontopathogènes (seuls ou en combinaison) atteignent des concentrations critiques au niveau du sulcus, leur potentiel pathogène peut s'exprimer. Cependant, certaines souches sont dites avirulentes, d'autres sont virulentes mais n'expriment pas nécessairement leur potentiel pathogène. Il faut un environnement et des conditions favorables pour que ces souches s'expriment et initient le processus infectieux. (14)

La pathogénicité des bactéries parodontopathogènes dépend étroitement des interactions bactériennes. De nombreuses espèces bactériennes coopèrent entre elles (Figure5). Les interactions sont indispensables aux infections dites mixtes telles que la maladie parodontale. Les parodontopathogènes dominants ont besoin des facteurs des autres bactéries pour exprimer leur pathogénicité. (14)

Pour que la maladie parodontale puisse progresser, ces pathogènes doivent être prédominants, et l'environnement doit être rendu favorable à leur évolution. Les espèces bactériennes présentes dans leur environnement ne doivent pas inhiber mais potentialiser leur activité. C'est l'environnement de ces bactéries qui permet l'expression des facteurs de virulence des pathogènes.



**Figure 5 Les complexes bactériens**

(Source : Wolf H, Rateitschak EM, Rateitschak KH. Parodontologie. Issy-les-Moulineaux : Éditions Masson ; 2005)

### ***Facteurs de risque - la susceptibilité de l'hôte***

L'évolution de la maladie parodontale dépend de la susceptibilité de l'hôte. L'expression de la maladie peut donc être facilitée par plusieurs facteurs. Ceux-ci joueraient un rôle dans l'initiation, la rapidité d'évolution et dans l'aggravation de la maladie.

- les facteurs immunologiques

Certaines formes de gingivites et de parodontites apparaissent dans un contexte de baisse des défenses immunitaires. Une altération de la fonction et du nombre de polynucléaires neutrophiles, une dysfonction du système immunitaire ou encore une immunosuppression à la suite d'une radiothérapie, sont autant de facteurs qui favorisent la progression de la maladie (14).

- les maladies systémiques ou infectieuses (diabète, VIH...)

Elles jouent un rôle dans la réponse de l'hôte face à une infection. Chez les patients atteints de maladies infectieuses ou systémiques, le système immunitaire aura plus de mal à contenir l'infection. La présence d'une maladie systémique peut également aggraver une infection déjà existante. Des études ont montré que la prévalence de la maladie parodontale était beaucoup plus élevée et plus sévère chez les patients atteints de diabète ou porteurs du VIH (19).

- Habitudes de vie et stress

La consommation de tabac, drogues et alcool sont des facteurs qui vont venir aggraver la maladie parodontale. De plus, le tabac diminue la réponse inflammatoire face à une infection et favorise ainsi l'installation et la progression des bactéries pathogènes dans le système sous gingival.

- Les facteurs hormonaux, nutritionnels et génétiques

Ils joueraient également un rôle dans l'initiation de la maladie (19).

Tous ces facteurs conduisent à la rupture de l'équilibre au niveau de la flore sous-gingivale (14). Ils favorisent ainsi l'émergence de bactéries parodontopathogènes et la progression des différentes formes de gingivites et de parodontites.

## *Diagnostic microbiologique*

Il existe différents tests diagnostics pour évaluer qualitativement et quantitativement la flore microbienne chez un patient atteint de parodontite. Les analyses microbiennes permettent d'identifier spécifiquement les pathogènes responsables. Elles sont utilisées chez les patients qui présentent des récurrences après des traitements conventionnels. Ces analyses permettent également de suivre l'efficacité d'un traitement par antibiothérapie en comparant l'évolution des différentes populations bactériennes. La biologie moléculaire, quant à elle, nous apporte des informations sur le mode de transmission des bactéries (14).

Les techniques d'identification et de quantification des bactéries peuvent se faire par :

- Examen microscopique direct : pour la détermination des pourcentages de morphotypes bactériens présents et la détection de bactéries mobiles, de spirochètes et de cellules de l'inflammation
- Culture bactérienne sur milieux appropriés : pour l'identification et l'isolement des espèces présentes dans l'échantillon de la plaque dentaire.
- Tests enzymatiques : pour la détermination du taux de pathogènes potentiels présents dans un échantillon de plaque dentaire.
- Tests immunologiques : ce sont des tests spécifiques qui permettent de détecter et de quantifier le nombre de pathogènes présents dans l'échantillon.
- Tests génétiques (sonde ADN avec ou sans amplification génomique) : permettent l'identification et l'évaluation semi-quantitative des pathogènes buccaux.

### ***Traitement de la maladie parodontale***

L'objectif des traitements actuels est de rétablir un équilibre normal de la flore buccale et d'arrêter le phénomène de destruction du parodonte. Ils passent par des conseils d'hygiène donnés aux patients, un débridement mécanique (détartrage et surfaçage) mais également par la microbiologie. Le but étant d'augmenter la flore bénéfique au détriment de la flore pathogène.

Il existe aujourd'hui des traitements par antibiothérapie. Ils sont utilisés dans les cas de parodontites agressives et de parodontites ulcéronécrotiques, en particulier chez les patients immunodéprimés ou atteints d'une maladie systémique ou infectieuse affaiblissant le système immunitaire. Ces traitements sont également indiqués dans les cas d'une résistance à tous les autres traitements. C'est une thérapie anti-infectieuse qui a pour objectif l'élimination de la flore bactérienne pathogène, en particulier là où elle est le moins accessible aux instruments de débridement (langue, cryptes amygdaliennes...) (14, 56).

L'antibiothérapie se fait en association aux traitements mécaniques qui eux, jouent un rôle essentiel dans la désorganisation du biofilm sous gingival et stoppent l'installation et la prolifération des bactéries pathogènes.

L'ANSM recommande toutefois une monothérapie antibiotique qui dépend du type de parodontite et donc du type de bactéries impliquées. Un examen microbiologique régulier permet de surveiller l'évolution de la flore pathogène et de contrôler l'efficacité du traitement antibiotique (14).

## I.2.2. Présentation de deux parodontopathogènes

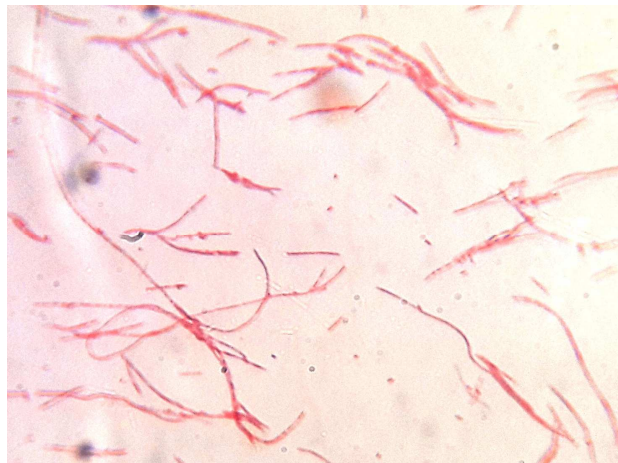
- *Fusobacterium nucleatum*

### Famille - Ecologie - Habitat

*Fusobacterium nucleatum* est une bactérie de la famille des *Fusobacteriaceae*. C'est l'espèce du genre *Fusobacterium*, la plus représentée dans la cavité buccale de l'Homme. On le retrouve également dans la flore commensale de l'appareil respiratoire ou encore dans la flore bucco-pharyngée.

Dans la cavité buccale, il peut être isolé dans la salive, les muqueuses linguales et gingivales, mais il est principalement retrouvé dans la plaque supra et infra gingivale. Dans certaines pathologies, il peut être associé à d'autres bactéries notamment dans certaines infections endontiques et périapicales. Cependant, *F. nucleatum* est essentiellement connu pour son implication dans les gingivites et parodontites.

*Fusobacterium nucleatum* est un bacille à Gram négatif, anaérobie strict. Sa paroi est constituée d'une couche interne très hydrophile, formée par un peptidoglycane, et d'une couche externe hydrophobe appelée membrane externe, c'est une bicouche lipidique. La couche interne est constituée de phospholipides et la membrane externe est constituée de lipopolysaccharides. L'épaisseur totale de sa paroi est de 20 à 30 nm. En microscopie optique, il a une forme effilée aux extrémités, forme en fuseau (14).



**Figure 6 : Observation au microscope optique de *Fusobacterium nucleatum* (crédit photo A. JABOL)**

## Virulence et pathogénicité

L'hydrolyse des protéines formera des peptides et acides aminés qui apporteront l'énergie nécessaire au *Fusobacterium*. Cependant, même avec un faible apport nutritif il peut survivre. En effet, la présence seule de glutamate comme apport énergétique suffit à sa survie. On retrouve le glutamate dans la cavité buccale et principalement au niveau du sillon gingival, où la proportion en *Fusobacterium* est très élevée chez les patients atteints de parodontite.

Le catabolisme de *F. nucleatum* aboutit à la formation d'ions aluminium, de propionate et de butyrate qui inhibent la prolifération des fibroblastes gingivaux. Ceci a pour conséquence d'empêcher la cicatrisation au niveau des sites sous gingivaux. Or ces produits de dégradations sont très présents dans les poches parodontales.

*F. nucleatum*, s'associe avec d'autres bactéries de la flore sous-gingivale pour exprimer son pouvoir pathogène. On parle de co-agrégation. Il est capable d'adhérer aux cellules épithéliales buccales et aux polynucléaires, mais aussi, au collagène et aux fibroblastes gingivaux, grâce à sa membrane externe. La présence de fibronectine facilite cette adhésion. L'adhésion aux polynucléaires neutrophiles aboutit à la production d'ions superoxyde et au relargage de lysozymes (14).

Ces phénomènes de co-agrégation et d'adhésion contribuent à la destruction des tissus parodontaux.

## Implication dans la maladie parodontale

*Fusobacterium nucleatum* est une des principales bactéries présentes dans le sillon gingival et la plaque sous gingivale des patients atteints de la maladie parodontale. Il est toujours retrouvé quelque soit la forme de parodontite. Son augmentation au niveau des poches parodontales est à l'origine de l'inflammation et de l'augmentation de la quantité de fluide gingival. Il agit comme un initiateur de la maladie, il reste cependant très présent quelle que soit la phase de la maladie.

Il permet également l'évolution de la flore sous gingivale en un système plus complexe en facilitant l'adhésion d'autres pathogènes parodontaux tels que *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, et *Treponema denticola*, et en leur fournissant l'énergie dont ils ont besoin.

*Fusobacterium nucleatum* favorise le développement des bactéries parodontopathogènes en jouant un rôle d'intermédiaire entre les colonisateurs précoces (les premiers à coloniser le site sous gingival) et les colonisateurs secondaires. La co-agrégation se fait en grande partie avec *Porphyromonas gingivalis* dont il favorise la colonisation et la survie dans la poche parodontale (34).

Le rôle de *F. nucleatum* est donc fondamental dans le développement du biofilm sous gingival et l'initiation du processus d'inflammation de la maladie parodontale.

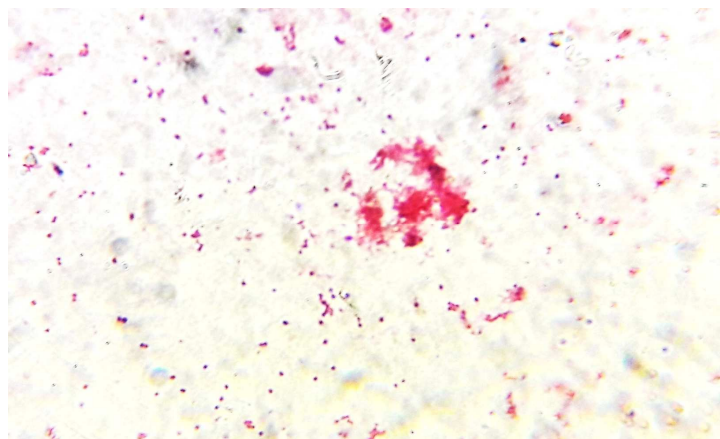
- ***Porphyromonas gingivalis***

Famille-Ecologie-Habitat

*Porphyromonas gingivalis* est une bactérie de la cavité buccale. Elle a été à l'origine classée parmi les *Bacteroides* asaccharolytiques pigmentés de source humaine puis reclassée par Shah et Collins en 1988 sous le nouveau genre *Porphyromonas*. C'est une bactérie de la famille *Porphyromonadacea* de l'ordre *Bacteroidales* (14).

*Porphyromonas gingivalis* est une bactérie anaérobie stricte aérotole'érante. Elle se développe principalement dans les milieux à faible apport d'oxygène tels que les sites sous-gingivaux, mais elle peut être également présente en faible proportion dans la salive ou sur les muqueuses buccales. Des conditions favorables à son évolution sont nécessaires à son expression dans la cavité buccale. Ainsi des conditions strictes au niveau de la température, du pH et de l'apport en nutriments seront nécessaires à *Porphyromonas gingivalis*, pour qu'elle puisse exprimer son potentiel pathogénique.

C'est un bacille à Gram négatif. Comme beaucoup de bactéries anaérobies responsables de maladie parodontale, elle a pour particularité de dégager une forte odeur putride. Au microscope optique, elle a la forme d'un petit bacille ou d'un coccobacille immobile, encapsulé et non sporulé (Figure 7). Elle mesure de 0.5 à 1µm de diamètre pour une longueur de 2 µm (14).



**Figure 7: Observation au microscope optique de *Porphyromonas gingivalis* (crédit photo par A. JABOL)**



### Pathogénicité et facteur de virulence

La virulence de *P. gingivalis* est intimement liée à l'expression d'adhésines portées par des fimbriae. Ceux-ci sont de formes et de tailles variables. On parle de *fimbriae majeurs* lorsqu'ils sont longs et filamenteux et de *fimbriae mineurs* lorsqu'ils sont courts et fins. La virulence serait fonction du type de *fimbriae* exprimé (14).

Les adhésines jouent un rôle dans la formation des biofilms grâce à l'adhésion aux composants salivaires d'une part et à la coagrégation avec les autres bactéries d'autre part. Ce sont également des PAMP qui interagissent avec des récepteurs membranaires. Ces interactions jouent un rôle majeur dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (tels que le *Tumor Necrosis Factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), et l'interleukine-1 $\beta$ ), l'induction de molécules d'adhésion et de co-stimulation.

La virulence de *P. gingivalis* est aussi étroitement liée à la libération de vésicules contenant des enzymes protéolytiques telles que les gingipaines. Ce sont des protéases à cystéine à forte activité protéolytique.

### Implication dans la maladie parodontale

*Porphyromonas gingivalis* est essentiellement retrouvé dans les formes agressives et généralisées des parodontites, et chez les patients atteints de parodontite chronique sévère. Cependant on retrouve aussi cette bactérie dans d'autres pathologies buccales : gingivites et parodontites nécrotiques, péri-coronarites, abcès péri-apicaux ; et pathologie extra-buccales telles que les abcès pulmonaires et intra-abdominaux (14).

Dans la maladie parodontale, l'accumulation du biofilm dans l'espace sous gingival, entraîne une réaction inflammatoire qui rend les conditions de pH, de température, et d'apport en nutriments propices à l'expression du potentiel pathogène de *Porphyromonas gingivalis*. En effet, l'augmentation du flux de fluide gingival, de la température et de l'apport protéique favorise le développement de cette bactérie asaccharolytique, entraînant ainsi une baisse de la quantité d'oxygène présente dans le milieu.

L'augmentation du pH permet d'augmenter l'activité protéolytique des gingipaines qui peuvent alors libérer des peptides, source d'énergie nécessaire à *P. gingivalis*. Ces gingipaines pourront également former de nouveaux sites de fixation pour les fimbriae (14).

Le processus inflammatoire sera accentué grâce aux interactions de *P. gingivalis* avec les cellules de l'inflammation. Elles conduisent à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires qui combinée à l'excrétion de vésicules propagées à distance, amplifient la destruction tissulaire.

Ces cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle dans le phénomène de résorption osseuse. Celui-ci sera de plus aggravé par la réponse immunitaire à l'infection de *P. gingivalis* qui entraîne une expression d'IgG2 plus importante. Un taux élevé en IgG2 est généralement associé à une perte d'os importante (14).

Le potentiel virulent de *P. gingivalis* explique en partie les difficultés de traitement des maladies parodontales ainsi que les récurrences après traitement. En effet c'est une bactérie qui est capable d'intégrer une cellule eucaryote et de survivre à l'intérieur de cette cellule. C'est cette propriété qui lui permet de se protéger des mécanismes de défense. En outre, plus le nombre de bactéries est important au niveau sous gingival et plus le processus de destruction tissulaire sera important.

Beaucoup de souches sont sensibles aux antibiotiques utilisés pour le traitement de la maladie parodontale, cependant un certain nombre de souches de *P. gingivalis* sont résistantes à certains antibiotiques tels que : les  $\beta$ -lactamines, les tétracyclines, les macrolides (14). Le traitement principal de ces affections nécessite souvent l'association de métronidazole.

### **I.3. BACTERIES PARODONTOPATHOGENES ET PROBIOTIQUES: LES ETUDES DEJA MENEES**

#### **I.3.1. Candidats probiotiques déjà testés contre des parodontopathogènes**

La cavité buccale chez un patient sain est un écosystème en équilibre. C'est à la rupture de cet équilibre (déséquilibre entre flore bénéfique et flore pathogène) qu'apparaissent les différentes pathologies de la cavité buccale.

Pour maintenir cet équilibre et éviter l'apparition de pathologies, des compétitions inter bactériennes peuvent se mettre en place et limiter l'évolution de la flore pathogène. C'est le principe des probiotiques.

Un probiotique est un organisme vivant bénéfique pour l'hôte qui le colonise, à condition d'être administré de façon adéquate. Pour être efficace, il doit posséder de fortes propriétés antibactériennes afin d'inhiber les bactéries pathogènes et de diminuer le risque de survenue ou de persistance d'une pathologie (48). Les probiotiques, commercialisés à l'heure actuelle dans le cadre de pathologies bucco-dentaires, sont dirigés contre les bactéries cariogènes. Ils permettraient de diminuer l'indice carieux (18). Parmi ces candidats probiotiques déjà testés, les lactobacilles sont majoritaires. Par exemple, *Lactobacillus rhamnosus* a déjà prouvé son efficacité dans le traitement de la maladie carieuse (48).

Les lactobacilles ont, en effet, la capacité de produire des substances antibactériennes par fermentation des hydrates de carbone. Elles agissent sur la croissance des bactéries avec lesquelles elles interagissent en abaissant le pH de l'environnement. Certaines souches peuvent, de plus, produire des bactériocines et du peroxyde d'hydrogène.

Une étude de J. Samot et C. Badet sur l'activité antibactérienne de candidats probiotiques, s'est intéressée à l'action de lactobacilles oraux sur les bactéries potentiellement pathogènes de la maladie parodontale : *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum*. Le but de cette étude était de mettre en évidence l'action inhibitrice de lactobacilles buccaux sur ces deux parodontopathogènes. Sur 66 lactobacilles testés, 65 ont inhibé la croissance de *F. nucleatum* et 52 celle de *P. gingivalis*. Selon cette étude, certains de ces lactobacilles auraient la capacité à produire du peroxyde d'hydrogène, et une de ces souches coderait pour le gène de la Glycerol deshydratase. Ce sont deux éléments qui joueraient un rôle dans l'activité antibactérienne des lactobacilles (48).

Ces résultats conforteraient l'idée de l'utilisation des lactobacilles comme probiotique notamment contre les pathogènes responsables de maladies parodontales.

Cependant l'étude de Testa et al., sur les interactions entre deux parodontopathogènes : *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* et un lactobacille oral vient à l'encontre de ces résultats. L'étude avait pour but d'évaluer les possibles interactions antagonistes entre deux parodontopathogènes (*Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* isolés à partir de poches parodontales) et quatre espèces de lactobacilles (*Lactobacillus casei*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L.plantarum*) (53).

Les premiers tests consistaient à étudier les effets des parodontopathogènes sur la croissance des lactobacilles oraux, les seconds les effets des différentes espèces de Lactobacilles sur la croissance des pathogènes parodontaux. Dans le premier cas, seule la croissance de l'espèce *L. casei* a été significativement inhibée par la présence de *F. nucleatum*. *P intermedia* n'a présenté aucune activité inhibitrice. Dans le second cas, aucun lactobacille n'a inhibé la croissance des bactéries parodontopathogènes, quelle que soit la méthode d'étude utilisée (53).

Aucune interaction antagoniste entre lactobacilles et pathogènes parodontaux n'a pu être démontrée dans cette étude.

Les lactobacilles ont donc prouvé leur efficacité en tant que probiotiques dans le traitement et la prévention de la maladie carieuse, cependant leur action sur les parodontopathogènes reste encore peu démontrée et leur action antibactérienne contre les pathogènes parodontaux ne fait pas l'unanimité au sein des auteurs.

### **I.3.2. Action de *Streptococcus salivarius* sur les parodontopathogènes**

Actuellement, très peu d'études scientifiques ont été menées sur l'action de *Streptococcus salivarius* sur les parodontopathogènes. Pourtant, son efficacité en tant que probiotique dans le traitement de la maladie carieuse à largement été démontrée, ainsi que son action antibactérienne contre d'autres pathogènes extra-oraux.

En 2008, Van Hoogmoed et al., se sont intéressés à l'action de souches antagonistes (dont *Streptococcus salivarius*) sur l'adhésion de trois espèces bactériennes principalement impliquées dans la maladie parodontale : *Porphyrromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, et *Prevotella intermedia*.

Cette étude visait à démontrer une réduction du nombre d'adhésions à une surface, de souches pathogènes en présence de bactéries potentiellement inhibitrices grâce à un système d'analyse des images. Le principe est d'ensemencer une plaque de polyméthylméthacrylate avec les souches inhibitrices à tester en six points distincts puis d'appliquer un flux avec une suspension contenant les bactéries parodontopathogènes. Le nombre de parodontopathogènes ayant adhéré à la surface de la plaque à l'endroit où les souches inhibitrices ont été inoculées est comparé au nombre de pathogènes ayant adhéré en l'absence de ces mêmes souches inhibitrices (56).

Les résultats de cette étude ont montré que *Streptococcus salivarius* est capable de réduire significativement les propriétés d'adhésion de *Porphyrromonas gingivalis* et à moindre mesure celle de *A. actinomycetemcomitans* et *Prevotella intermedia*.

Cela nous suggère que *Streptococcus salivarius* pourrait entrer en compétition avec des bactéries pathogènes de la maladie parodontale et limiter leur adhésion au sein de la plaque sous-gingivale des patients atteints par cette maladie. Cette action permettrait d'empêcher la persistance de ces bactéries dans le sulcus et ainsi de ralentir voir stopper l'évolution de la maladie parodontale. Cette propriété fait de *S. salivarius* un très bon candidat probiotique contre les espèces parodontopathogènes.

*Streptococcus salivarius* peut être classé en deux groupes selon la présence de fibrilles ou celle de fimbriae à sa surface. Ces structures sont impliquées dans les phénomènes d'adhésion interbactérienne. Les fibrilles permettent notamment l'adhésion de *S. salivarius* aux cellules épithéliales de la cavité orale. Les fimbriae sont présents chez 50% des souches de *S. salivarius* présentes dans la cavité buccale (33).

Ces bactéries sont capables de co-agréger avec certains microorganismes, en particulier avec des espèces impliquées dans la maladie parodontale. La co-agrégation est un

processus complexe impliquant des molécules de surfaces des bactéries. Ces molécules jouent un rôle dans la reconnaissance et l'adhésion entre les bactéries (33).

L'étude de Lévesque C, Lamothe J et al., a tenté de démontrer l'importance de la présence de fimbriae dans les mécanismes de co-agrégation de *S. salivarius* avec les parodontopathogènes. *S. salivarius* peut co-agréger avec *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, et *Prevotella intermedia*, trois bactéries clés de la maladie parodontale (56, 33). Cependant, seule la co-agrégation avec *Prevotella intermedia* nécessiterait la présence de fimbriae. D'autres structures de nature protéiques telles que l'arginine seraient impliquées dans la co-agrégation entre *S. salivarius* et les bactéries parodontopathogènes (33).

Les propriétés d'adhésion de *S. salivarius*, et sa capacité à entrer en compétition avec différentes bactéries parodontopathogènes en font un bon candidat probiotique pour le maintien de l'écosystème buccal et/ou le traitement de la maladie parodontale impliquant les deux bactéries qui font l'objet de notre étude, en seconde partie : *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*.

## **II. ETUDE EXPERIMENTALE : EFFET DE *STREPTOCOCCUS SALIVARIUS* SUR LES PATHOGENES : *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* ET *PORPHYROMONAS GINGIVALIS***

### **II.1.SOUCHES TESTEES ET MILIEUX DE CULTURE**

Dans cette étude nous avons sélectionné 32 isolats cliniques de *Streptococcus salivarius*. Ces souches ont été récoltées dans le cadre de l'étude du Dr Monsarat Angélique, au laboratoire de Microbiologie du Dr Marie-Cécile Badet de la faculté d'Odontologie de Bordeaux (38). Les prélèvements ont été réalisés à partir de la plaque et de la salive d'enfants atteints de caries précoces.

L'identification des isolats s'est faite par méthode biochimique (Api 20 Strep) et par biologie moléculaire, par extraction d'ADN puis PCR avec amorces spécifiques selon le protocole décrit par Igarashi en 2001.

Afin de disposer d'un témoin probiotique dont les propriétés antibactériennes ont été reconnues dans la littérature, nous avons travaillé sur 2 souches supplémentaires de *S. salivarius* K12, productrices de bactériocines, la salivaricine A2 et la salivaricine B. La souche *S. salivarius* K12 nous a également servi de témoin positif pour les tests PCR de mise en évidence du gène de la salivaricine A.

Chaque souche a été mise en culture en bouillon Trypticase Soja (TS) (*cf Annexe 1*) et conservée à 37° C, puis congelée pour conservation à -80°C.

Les tests antibactériens ont été réalisés sur deux souches parodontopathogènes : *Fusobacterium Nucleatum* et *Porphyromonas Gingivalis* cultivées dans un milieu WCA en anaérobiose à 37°.

***Chaque expérimentation a été faite en triplicata.***

## II.2.MATERIELS ET METHODES

### II.2.1. Evaluation de l'activité antibactérienne par la méthode de la double gélose

L'activité antibactérienne des souches de *S. salivarius* à été mesurée par la technique de la double gélose décrite par Flemming HP en 1975 (20), qui a été modifiée pour les besoins de l'étude.

Le principe de la méthode consiste à déposer trois spots de 2 $\mu$ L de la suspension de *S. salivarius* à tester à la surface d'une gélose Trypticase Soja (*cf Annexe 2*) La suspension de *S. salivarius* provient d'une culture overnight et a été préalablement ajustée à une densité optique de  $DO_{550nm}=1 \pm 0.05$ .

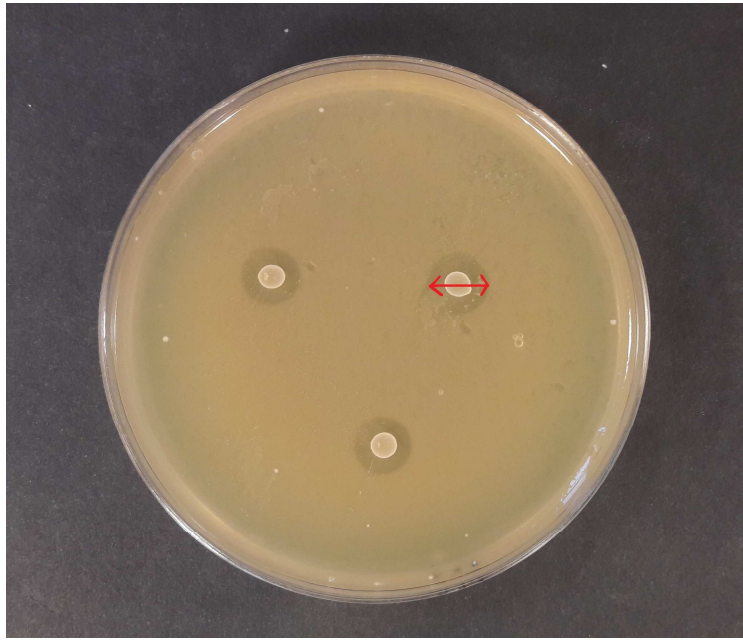
Afin de permettre le développement de colonies visibles macroscopiquement, les géloses sont incubées pendant 24 heures à 37°C en anaérobiose.

Les géloses sont ensuite recouvertes avec 7mL de gélose molle (7g/L d'agar) Cœur-Cerveau qui a préalablement étéensemencée avec 0.1mL de la suspension bactérienne à tester (en culture overnight) calibrée à la densité optique de  $DO_{550nm}=1,4 \pm 0.05$  pour *Fusobacterium nucleatum* (souche ATCC10953) et à une densité optique de  $DO_{550nm}=1 \pm 0.05$  pour *Porphyromonas gingivalis* (souche ATCC33277). Les deux pathogènes ont été testés individuellement.

Les géloses sont placées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

Une zone claire autour du spot de *Streptococcus salivarius* indique une inhibition de croissance. Le diamètre d'inhibition formé autour de chacun des spots est alors mesuré (Figure 8), et la moyenne des diamètres de l'inhibition est calculée.





**Figure 8: Mesure des diamètres d'inhibition (crédit photo A. JABOL)**

## II.2.2. Etude des propriétés d'adhérence par la méthode en tube de verre

Pour étudier la capacité de *S. salivarius* à adhérer à une surface, nous avons suivi la méthode en tube de verre utilisée par Hamada et Torii en 1978. (22)

Elle utilise des milieux Trypticase Soja (TS) enrichis en saccharose (1%).

Les cultures overnight des différentes souches de *S. salivarius* sont ajustées à une densité optique  $DO_{650nm} = 0.1 (\pm 0.02)$  puis 500 $\mu$ L de chaque culture sont ajoutés dans des tubes contenant le milieu enrichi en saccharose.

Les tubes sont positionnés sur un socle incliné à 30° par rapport à l'horizontale, puis incubés pendant 24 heures à 37°C. (Figure 9)



**Figure 9 : Inclinaison des tubes à 30° (crédit photo A. JABOL)**

La présence d'un biofilm et son adhérence au tube de verre ont été évaluées visuellement par un score d'adhérence allant de 0 à 4 décrit par Murchinson et al. (40)

Score 0 : Absence de biofilm

Score 1 : Biofilm de faible épaisseur ou très peu adhérent

Score 2 : Biofilm peu adhérent

Score 3 : Biofilm adhérent

Score 4 : Biofilm épais et très adhérent

### II.2.3. Etude des interactions au sein d'un biofilm expérimental

Les souches de *S. salivarius* ont été testées au sein d'un biofilm expérimental, contenant des espèces impliquées dans la formation du biofilm dentaire et inspiré du modèle de Guggenheim (21):

- *Actinomyces viscosus*
- *Streptococcus mutans*
- *Fusobacterium nucleatum*
- *Porphyromonas gingivalis*

Deux types de biofilm ont été mis en place, un biofilm contenant l'ensemble des espèces sus-citées avec *S. salivarius*, et un biofilm témoin ne contenant pas de souches de *S. salivarius*. Les expérimentations ont été réalisées à chaque fois en triplicata. Parmi les 34 souches de *S. salivarius*, 5 ont été retenues pour cette expérimentation.

#### Protocole :

**Les bactéries** ont été mises en culture dans un milieu universel FUM (Fluid Universal Medium) (cf Annexe I), la veille de la mise en place du biofilm et mises en incubation à 37°C.

**Préparation de la salive :** des prélèvements de salive ont été réalisés chez des volontaires sains au moins 1h30 après qu'ils aient bu, mangé, puis se soient brossé les dents. Ces prélèvements ont été congelés à -20°C. Après avoir obtenu un volume de 500 mL, les échantillons ont été ensuite centrifugés 30 minutes à 15000 tours/minute. Le surnageant a été pasteurisé (30 minutes à 65°C) puis stocké à -20°C.

**Les supports de biofilm** choisis pour cette expérimentation sont des disques d'hydroxyapatite stériles (10.6 mm de diamètre ; 1.3mm de hauteur). Ils ont été placés dans une plaque 24 puits en polystyrène.

Les densités optiques des cultures de chacune des espèces : *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, et *S. salivarius*, ont été ajustées séparément à  $DO_{550nm}=1 \pm 0.05$ . 1mL de chaque solution bactérienne ajustée à la bonne densité optique a été ensuite récoltée et mélangée pour former la suspension bactérienne finale.

Dans un premier temps, les disques ont été mis en contact avec la salive pasteurisée pendant 4 heures, le temps de la formation de la pellicule acquise exogène à leur surface. Ensuite, les disques ont été déplacés dans un nouveau milieu contenant 800 µL de salive et 800 µL de FUM auquel ont été rajoutés 200 µL du mélange bactérien. L'ensemble a été mis en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures.

Au bout de ces 24 heures, les disques ont été transférés dans du FUM enrichi en glucose et saccharose (0.15% de glucose et 0.15% de saccharose) puis remis en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

### **Recueil du biofilm :**

Les disques ont été rincés, puis immergés dans 1mL de sérum physiologique stérile. Ils ont été ensuite vortexés vigoureusement pendant 2 minutes, puis plongés dans une cuve à ultrasons pendant 15 secondes à 25 Watts. Les bactéries détachées des disques et présentes en suspension dans le sérum physiologique ont alors pu être récoltées et mises en culture.

La mise en culture s'est faite après dilution à  $10^{-2}$  par étalement sur géloses au sang et sur géloses Mitis Salivarius. Les géloses ont ensuite été mises en anaérobiose à 37°C pendant 6 jours.

Les résultats sont interprétés en comparant le nombre de colonies qui se sont formées sur les différentes géloses en présence et en l'absence de *S.salivarius*.

#### II.2.4. Recherche des gènes de salivaricines

Pour la recherche de gènes des salivaricines A et 9, nous avons utilisé la technique d'amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Les 34 souches de notre étude ont été mises en culture pendant 24h avant de procéder aux extractions d'ADN. Pour nos extractions, nous avons utilisé le système GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, France) (*cf Annexe 3*).

L'amplification d'ADN par PCR s'est faite avec les amorces spécifiques des différentes salivaricines (Tableau 1) selon les protocoles décrits par Wescombe et al. (57, 58, 59) et Barbour en 2013 (3)

**Tableau 1: Amorces spécifiques des salivaricines A et 9**

Salivaricines	Amorces
<b>Salivaricine A</b> (salA)	salAUS : 5'-GTAGAAAATATTTACTACATACT-3' salADS : 5'-GTAAAGTATTCGTAAACTGATG-3'
<b>Salivaricine 9</b> (sivA)	Siv-F : 5'-AAAAAGGCGCTTCTATATCCATGA-3' Siv-R : 5'-ATCTTTACCTCAAACCTTTAAGTCCATT-3'

Après préparation d'un mix de 48 µL dont la composition est décrite ci- dessous (Tableau 2), 2µL d'ADN ont été ajoutés à ce volume réactionnel, l'ensemble est recouvert de 25 µL d'huile minérale pour limiter l'évaporation avant amplification. Le mix utilisé est celui décrit par Igarashi (26) en 2001 et le programme PCR utilisé correspond à celui de Wescombe (58).

**Tableau 2: Composition du Mix pour 2µL d'ADN**

	Mix (µL)
Eau ultra-pure	39.74
10 X Buffer	5
dNTPs (10 mmol/L)	1
Amorce F (100 µmol/L)	1
Amorce R (100 µmol/L)	1
Taq polymérase (5 unités/µL)	0.26

L'amplification est faite dans un thermocycleur selon un programme spécifique pour chaque salivaricine (Tableau 3).

La lecture des résultats s'effectue par électrophorèse sur gel d'agarose (*cf Annexe 4*). Un témoin positif pour le gène de la salivaricine A ainsi que pour celui de la salivaricine 9 a été utilisé pour chacune des séquences : il s'agit de la souche K12.

- **PCR pour sivA** : la souche de référence K12 est positive pour le gène siv A. D'après l'étude de Barbour en 2013, après amplification de son ADN, elle présente à l'électrophorèse une bande située à **491 pb** (3).
- **PCR pour salA** : l'ADN de la souche K12 présente après électrophorèse une bande situé à **379 pb** selon Ross et al. (46).

**Tableau 3: Programme spécifique à chaque salivaricine**

	<b>Salivaricine A (salA)</b>	<b>Salivaricine 9 (sivA)</b>
Dénaturation initiale		2 minutes, 95°
Nombre de cycles	30	30
Dénaturation	30 secondes, 94°C	30 secondes, 95°C
Hybridation	30 secondes, 55°C	30 secondes, 55°C
Synthèse	30 secondes, 65°C	1 minute, 65°C

## II.3.RESULTATS

### II.3.1. Mesure des diamètres d'inhibition

- *Fusobacterium nucleatum*

Tableau 4: Diamètres d'inhibition des différentes souches de *S. salivarius* sur *Fusobacterium nucleatum*

<i>S.salivarius</i>	<i>Diamètres d'inhibition sur Fusobacterium nucleatum</i>			
	Diamètre 1 (mm)	Diamètre 2 (mm)	Diamètre 3 (mm)	Moyenne (mm)
1	11	12	11	11,3
40	12	10	10	10,7
49	10	9	9	9,3
51	9	9	9	9,0
54	9	9	10	9,3
55	9	9	8	8,7
72	8	9	9	8,7
90	1	1	1	1,0
96	1	1	1	1,0
102	8	8	8	8,0
120	7	8	9	8,0
145	11	10	10	10,3
149	10	11	8	9,7
152	12	12	10	11,3
153	12	12	11	11,7
166	12	11	11	11,3
170	8	8	8	8,0
180	9	8	8	8,3
186	13	12	12	12,3
187	11	11	10	10,7
<b>192</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>12,7</b>
202	13	11	11	11,7
210	9	9	10	9,3
247	10	11	11	10,7
257	12	12	12	12,0
<b>279</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>13,0</b>
284	10	9	10	9,7
289	11	10	9	10,0
304	8	9	8	8,3
311	9	8	8	8,3
<b>312</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>16,7</b>
<b>318</b>	<b>18</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>17,7</b>
K12	9	10	9	9,3
<b>K12b</b>	<b>17</b>	<b>15</b>	<b>17</b>	<b>16,3</b>

Sur les 34 souches de *S. salivarius* testés contre *F. nucleatum* :

- 17 souches ont présenté des diamètres moyens d'inhibition inférieurs à 10 mm
- 2 de ces souches n'ont induit qu'un liséré périphérique d'inhibition de 1mm
- Seules 3 souches ont induit un diamètre moyen supérieur à 16 mm

Les 14 autres souches ont induit des diamètres moyens compris entre 10 et 13 mm.

- *Porphyromonas gingivalis*

**Tableau 5: Diamètres d'inhibition des souches de *Streptococcus salivarius* sur *Porphyromonas gingivalis***

<i>S.salivarius</i>	<i>Diamètres d'inhibition sur Porphyromonas gingivalis</i>			
	Diamètre 1 (mm)	Diamètre 2 (mm)	Diamètre 3 (mm)	Moyenne (mm)
1	28	28	30	28,7
40	22	22	24	22,7
49	20	22	20	20,7
51	20	20	18	19,3
54	18	20	19	19,0
55	18	18	17	17,7
72	21	20	20	20,3
90	16	18	18	17,3
96	26	28	26	26,7
102	18	18	19	18,3
120	17	18	18	17,7
145	16	17	17	16,7
149	20	19	20	19,7
152	20	22	20	20,7
153	18	18	18	18,0
166	18	16	14	16,0
170	14	18	16	16,0
180	18	18	20	18,7
186	18	18	18	18,0
187	12	12	14	12,7
192	9	10	9	9,3
202	1	1	1	1,0
210	1	1	1	1,0
247	1	1	1	1,0
257	0	0	0	0,0
279	0	0	0	0,0
284	0	0	0	0,0
289	0	0	0	0,0
304	0	0	0	0,0
311	0	0	0	0,0
312	10	10	10	10,0
318	11	10	11	10,7
K12	0	0	0	0,0
K12b	0	0	0	0,0



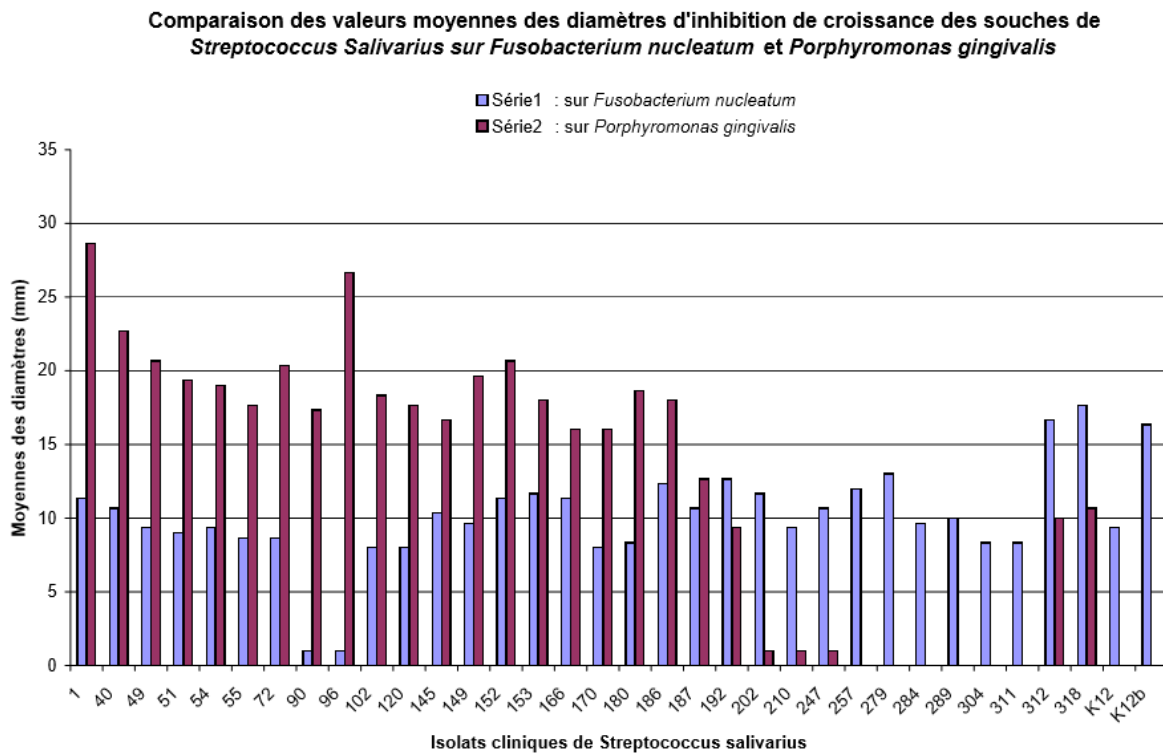
Parmi les 34 souches testées sur *Porphyromonas gingivalis*,

- 8 souches n'ont présenté aucune inhibition (absence de zone claire autour du spot)
- 3 souches n'ont induit qu'un liséré périphérique d'inhibition de 1 mm autour de *S. salivarius*.
- 19 souches ont inhibé la croissance de *P. gingivalis* avec un diamètre moyen supérieur à 16 mm, dont 6 d'entre elles avec un diamètre supérieur à 20 mm.

Les 4 autres souches ont induit des diamètres supérieurs à 9 mm autour de *S. salivarius*.

### • Comparaison des valeurs : *F. nucleatum*/*P. gingivalis*

Les diamètres d'inhibition les plus grands sont induits sur la souche *P. gingivalis* à l'exception de 14 souches, pour lesquelles l'inhibition a été la plus forte pour *F. nucleatum*. Seules 3 souches de *S. salivarius* testées contre *F. nucleatum* (les souches 312, 318 et K12b) présentent des valeurs d'inhibition proches des plus grandes valeurs enregistrées pour *P. gingivalis*.



**Figure 10: Comparaisons des valeurs moyennes d'inhibition de *S. salivarius* sur *F. nucleatum* et *P. gingivalis***

### II.3.2. Etude de l'adhérence

Tableau 6: Répartition des scores d'adhérence des souches de *S. salivarius*

Score d'adhérence	Nombre de souches de <i>S. salivarius</i>	Types de biofilm observés
0	0	Absence de biofilm
1	1	Présent mais non adhérent
2	2	Epais mais très peu adhérent
3	2	Epais et adhérent
4	23	Epais et très adhérent

Toutes les souches de *S. salivarius* ont formé un biofilm dans les milieux TS enrichis en saccharose. Six de ces souches ont présenté des valeurs intermédiaires : cinq ont eu un score d'adhérence évalué à 3-4, et une souche un score évalué à 2-3 (Cf Annexe 5).

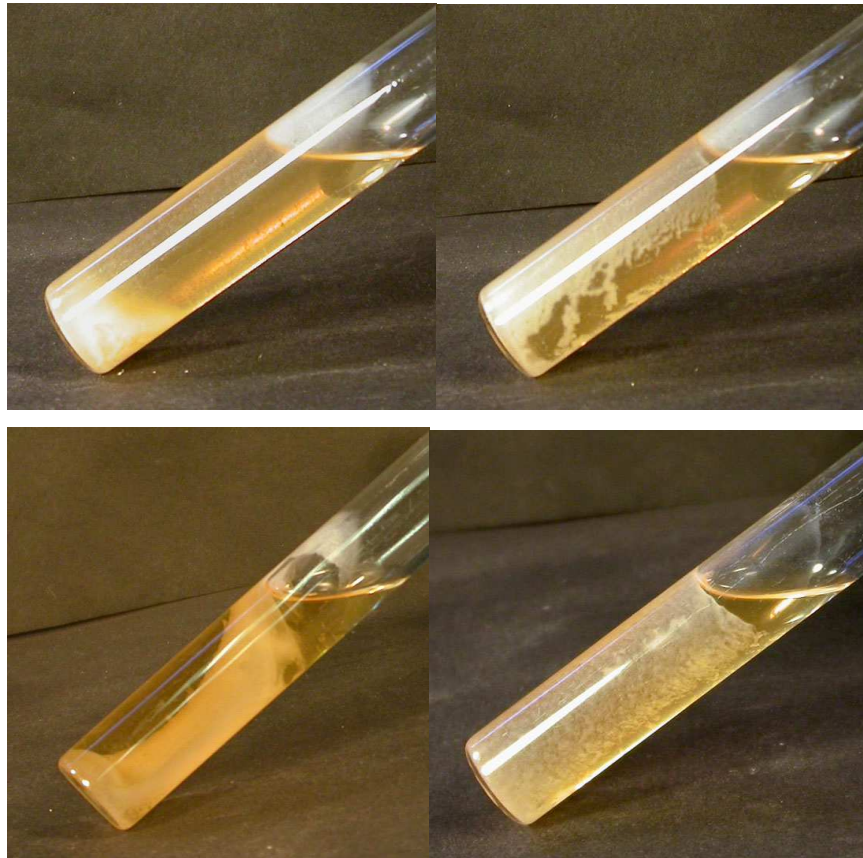


Figure 11: Evaluation de l'adhérence du biofilm au tube de verre (de la gauche vers la droite et de haut en bas : (1) Souche 90 : score 4, (2) Souche 55 : score 3, (3) Souche 284 : score 2, (4) Souche 210 : score 1) (crédit photo M. Saint-Marc)

### II.3.3. Les interactions observées au sein du biofilm

Parmi les 34 isolats cliniques des souches de *S. salivarius* testés dans la méthode de la double gélose sur le pathogène *P.gingivalis*, les souches présentant les diamètres moyens d'inhibition les plus élevés ont été sélectionnées pour les tests au sein d'un biofilm expérimental.

Les 5 souches ayant le plus inhibé la croissance de *P. gingivalis* et qui ont été sélectionnées pour les tests sont : les souches n°1, n°40, n°49, n°96 et n°152.

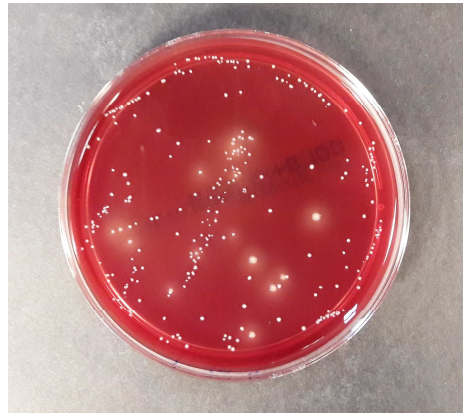
- Les colonies présentes dans le biofilm témoin ne contenant pas de souche de *S. salivarius* étaient les mêmes que celles retrouvées dans les biofilms contenant respectivement les souches n°40, la n°49, et la n°96, aussi bien sur les géloses au sang que les géloses Mitis Salivarius. Leurs nombres ne différaient pas significativement.

- Le biofilm contenant la souche n°152 présentait un plus grand nombre de bactéries sur le biofilm témoin, et seul des streptocoques ont été retrouvés sur les géloses au sang. Les 3 géloses Mitis Salivarius ont présenté des macrocolonies rondes et lisses sur l'ensemble de leur surface, identifiées à la coloration de Gram comme étant des streptocoques.

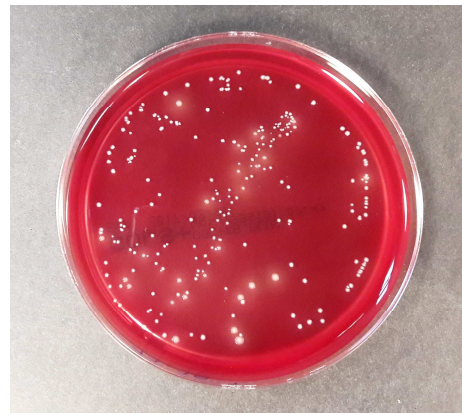
L'identification PCR de ces colonies nous a permis de clairement les identifier. Il s'agissait de colonies de *Streptococcus salivarius*.

- Le biofilm contenant la souche n°1 présentait un nombre de colonies inférieur à celui du biofilm témoin à la fois sur les géloses au sang et sur les géloses Mitis Salivarius. Seules 2 colonies de *Fusobacterium nucleatum* ont été retrouvées.

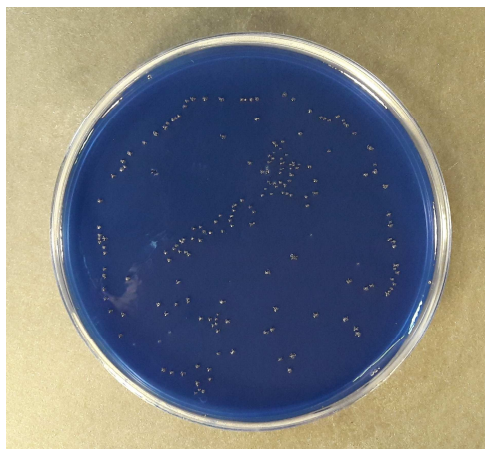
L'ensemble des géloses a été photographié afin de mieux évaluer et de comparer le nombre de colonies formées à la surface des géloses témoins et géloses tests (Figure 12).



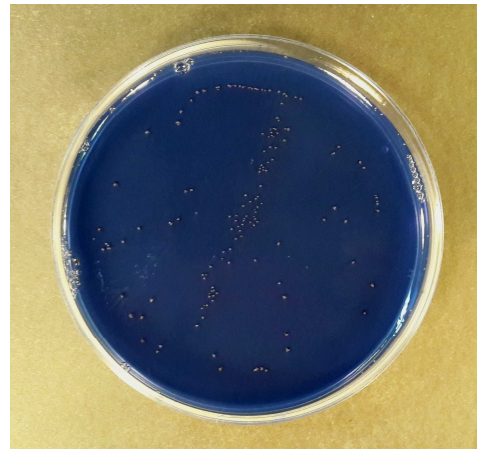
*Témoin (sans *S.salivarius*)*



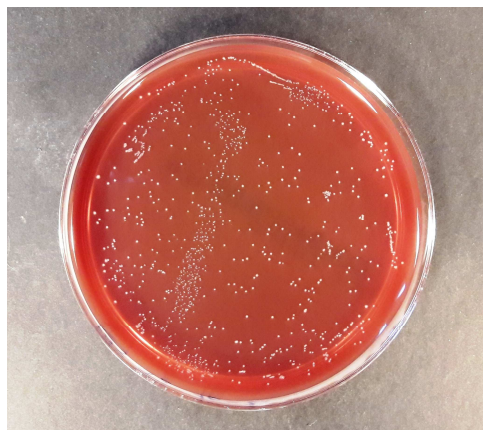
*En présence de la souche n°96*



*Témoin*



*En présence de la souche n°40*



*Témoin*



*En présence de la souche n°1*

**Figure 12: Comparaison des colonies formées après étalement sur gélose des biofilms témoins (sans *S. salivarius*) et des biofilms contenant une souche de *S. salivarius* (crédit photo A. JABOL)**

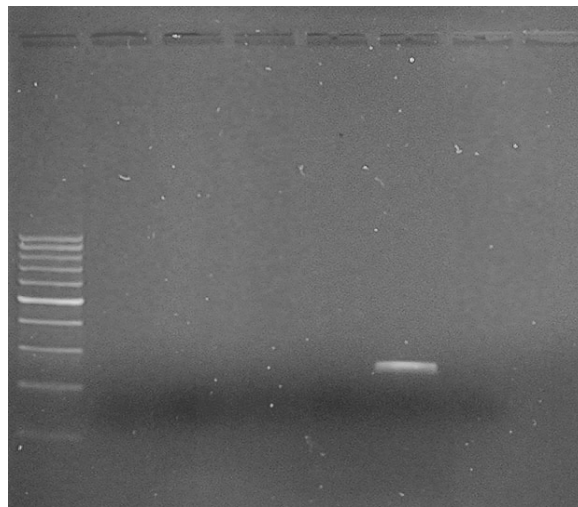
### II.3.4. Les gènes de salivaricines

Parmi les 34 ADN des souches de *S.salivarius* testés, dont la souche de référence K12, trois ADN se sont révélés positifs pour le gène de la salivaricine 9 (SivA) ceux de :

- la souche K12, notre témoin positif
- la souche 152
- la souche 311

Une double bande est présente entre 400 et 500 paires de bases pour la souche 311 (491pb).

Une bande est située également à 491 pb pour les souches 152 (Figure 13) et K12.



**Figure 13: Photographie du gel d'électrophorèse après amplification PCR pour le gène de la salivaricine 9 (SivA): positif pour la souche 152 (présence d'une bande à 491 pb) (crédit photo M. Saint-Marc)**

Avec le programme PCR pour salivaricine A, sur les 34 ADN testés, trois d'entre eux étaient positifs pour le gène de salivaricine salA, l'ADN de :

- la souche K12, témoin positif
- la souche 49
- la souche 145

Une bande située à chaque fois à 379 pb a été retrouvée pour les 3 ADN.

## II.4.DISCUSSION

Le but de notre étude était de mettre en évidence une action antibactérienne d'isolats cliniques de *S. salivarius* contre deux pathogènes impliqués dans l'apparition et la progression la maladie parodontale : *F. nucleatum* et *P. gingivalis*. L'objectif était également de comprendre les mécanismes de cette inhibition et de sélectionner des souches de *S. salivarius* dont les propriétés permettraient leur utilisation en tant que probiotique à visée bucco-dentaire. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de mettre en avant plusieurs souches dont les propriétés pourraient en faire un bon candidat probiotique.

L'activité antibactérienne a été dans un premier temps étudiée sur des souches à l'état planctonique par la technique de la double gélose. Cette méthode avait déjà été réalisée dans une autre étude visant à mettre en évidence les propriétés antibactériennes d'autres espèces bactériennes, plus précisément des souches de lactobacilles contre les deux mêmes pathogènes *F. nucleatum* et *P. gingivalis* (48).

Nos premiers tests ont permis de mettre en évidence un certain nombre de souches capables d'inhiber de manière significative les pathogènes testés. En effet, parmi les 34 souches de *S. salivarius* testées contre *P. gingivalis*, 22 ont présenté des diamètres d'inhibition supérieurs à 10mm, et 6 d'entre elles possédaient des diamètres moyens supérieurs à 20mm. Ces résultats nous suggèrent alors que plusieurs souches possèdent de fortes propriétés antibactériennes qui pourraient être en rapport notamment avec la sécrétion de bactériocines. Cependant à l'inverse, peu de souches de *S. salivarius* ont réellement inhibé *F. nucleatum*. En effet, seulement trois de ces souches ont induit des diamètres d'inhibition de croissance supérieure à 16mm. Une hypothèse pourrait être que les conditions de milieux de *S.salivarius* n'étaient peut-être pas favorables à l'expression de substances inhibitrices. Il conviendrait donc de réaliser de nouveaux tests en modifiant les conditions du milieu de croissance de *S.salivarius*.

La propriété d'adhérence a été étudiée par la méthode en tube de verre décrite par Hamada et Tori (22) sur nos 34 isolats cliniques de *S. salivarius*. Ces résultats nous ont montré que *S. salivarius* possède d'excellentes propriétés d'adhérence. En effet, placées dans un milieu enrichi en saccharose, toutes les souches testées ont formé un biofilm de bonne qualité et d'épaisseur variable, 23 de ces souches ont eu un score d'adhérence maximal de 4. Cette propriété à former un biofilm très adhérent est primordial pour l'action d'un probiotique à visée bucco-dentaire. Cela signifie qu'il est capable de se maintenir durablement dans la cavité buccale et d'exprimer durablement son action antibactérienne. (33)



Cette dernière a été également étudiée au travers d'un biofilm expérimental plurispécies. Seules les cinq souches de *S. salivarius* ayant le plus inhibé *P.gingivalis* ont été sélectionnées pour cette expérimentation. La lecture des résultats s'est faite uniquement par appréciation visuelle. Il aurait été intéressant de confirmer ces résultats par comptage numérique cependant ne disposant pas des moyens nécessaires pour le mettre en œuvre nous nous en sommes tenu à la comparaison d'images photographiques des différentes géloses par rapport à une gélose témoin.

Les biofilms contenant la souche n°1 et à moindre mesure la souche n°152 semblaient contenir moins de bactéries, seules ces 2 souches seraient capables d'inhiber ou ralentir la formation du biofilm. Cependant des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour pouvoir mieux comprendre les mécanismes d'action de ces bactéries sur un biofilm. Il serait notamment intéressant d'étudier *S. salivarius* au sein d'un biofilm dynamique pour savoir comment il interagit au cours du processus de formation du biofilm.

Les mécanismes antibactériens ont également été étudiés au niveau génotypique. L'objectif était de mettre en évidence la présence de gènes permettant l'expression de substances inhibitrices : les bactériocines. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à deux gènes : *sivA* (pour la salivaricine 9) et *salA* (pour la salivarine A) déjà mis en évidence pour la souche commercialisée K12. La localisation de ces gènes après amplification de l'ADN de la souche K12 a déjà été décrite dans plusieurs études dont celles de Barbour pour la salivaricine 9 et celle de Ross pour la salivaricine A (3, 46).

Les résultats de notre étude nous ont permis de mettre en évidence quatre souches, sur les 34 souches testées, qui possèdent le gène codant pour la sécrétion de salivaricines. Cependant seules deux salivaricines ont été testées.

A l'heure actuelle, il existe d'autres salivaricines, telles que la salivaricine B et la salivaricine D qui ont été mises en évidence (5, 7, 25). Nous pouvons supposer que les souches ayant eu un résultat négatif pour le gène de la salivaricine A ou celui de la salivaricine 9, possèdent peut-être les gènes codant pour les autres bactériocines qui n'ont pas été testées dans notre étude. Pour compléter notre étude, il faudrait donc mettre en œuvre un nouveau programme PCR pour tenter de mettre en évidence la présence des gènes codant pour ces autres salivaricines.

Un certain nombre d'études se sont penchées sur le pouvoir antibactérien de *S. salivarius* sur les différents pathogènes buccaux (42,45), mais essentiellement chez les

patients atteints de carie dentaires (18), et sa présence est considérée comme étant un indicateur de bon état de santé bucco- dentaire (10, 11, 13).

Ses propriétés en tant que probiotique ont également déjà montré leur efficacité dans le traitement de l'halitose et dans le maintien d'une bonne santé de l'oropharynx (4, 9, 17, 25). D'autres études se sont intéressées aux mécanismes d'action de *S. salivarius* sur d'autres pathogènes, tel que *Candida albicans* (27).

Actuellement, peu d'études ont été menées sur les propriétés antibactériennes de *S. salivarius* contre des espèces potentiellement pathogènes de la maladie parodontale. Ainsi nous ne disposons que de peu de résultats à comparer aux nôtres. Cependant deux études se sont intéressées aux interactions entre *S. salivarius* et plusieurs parodontopathogènes dont *F. nucleatum* et *P. gingivalis*.

La première, celle de Van Hoogmoed et. al, a démontré que *S. salivarius* et d'autres espèces antagonistes étaient capables de diminuer l'adhérence de *P. gingivalis* à une surface (dans l'étude, une plaque de PMMA). (56). Ces résultats pourraient être corrélés à ceux que nous avons obtenus pour les tests sur notre biofilm expérimental avec les souches n°1 et n°152.

La seconde étude de Lévesque, bien que différente des travaux que nous avons menés, pourrait apporter de nouvelles orientations de recherches. Cette étude montre que *S. salivarius* serait capable de co-agréger avec *F. nucleatum* et *P. gingivalis* (33). On pourrait donc envisager d'utiliser cette capacité à co-aggréger pour inhiber la croissance de parodontopathogènes ou bien d'inactiver les souches virulentes de ces pathogènes.



## Conclusion

La maladie parodontale est un problème que nous rencontrons au quotidien dans notre cabinet. L'efficacité de nos traitements actuels est très dépendante de la motivation du patient. Une partie de ces traitements se fait par antibiothérapie, dans certaines formes de parodontites. Cependant, une antibiothérapie sur le long terme peut conduire à des résistances bactériennes. Aussi, il aurait été intéressant d'avoir une approche plus préventive qui consisterait en la prescription d'un probiotique avant la survenue de la parodontite ou en traitement de celle-ci. Le but de notre étude était donc de démontrer que certaines souches de *S. salivarius* posséderaient des propriétés antibactériennes qui feraient de cette bactérie un bon candidat probiotique. Nos expérimentations ont ainsi permis de mettre en évidence des souches de *S. salivarius* capable d'inhiber la croissance de *Porphyromonas gingivalis*, bactérie présente dans les formes les plus sévères de la parodontite. De plus, ces souches sont capables de former des biofilms et d'adhérer fortement à une surface. Et cinq de ces souches ont dans leur ADN des gènes codant pour des substances inhibitrices : les salivaricines A et 9.

Actuellement, les traitements thérapeutiques de la maladie parodontale permettent surtout de ralentir l'évolution de la maladie. L'efficacité du traitement dépend beaucoup de la motivation du patient dans le temps et la maladie peut souvent récidiver. Pourra-t-on un jour améliorer l'efficacité de nos traitements grâce à l'utilisation de ce probiotique ?

Nos résultats offrent de nouvelles perspectives de recherche notamment étudier les mécanismes d'inhibition de *S. salivarius* au sein d'un biofilm dynamique pour mieux comprendre ses mécanismes d'action ; et mettre en place une thérapeutique efficace qui utiliserait cette souche comme probiotique à visée bucco-dentaire.

## Table des illustrations

Figure 1 : Structure de <i>Streptococcus salivarius</i> : cocci Gram+ en chaînette (crédit photo A. JABOL) .....	10
Figure 2 : Patiente atteinte de parodontite chronique généralisée.....	12
Figure 3 Evaluation radiologique de l'atteinte osseuse: parodontite chronique sévère généralisée (crédit photo A. Jabol).....	13
Figure 4 Les microorganismes de la plaque.....	15
Figure 5 Les complexes bactériens .....	16
Figure 6 : Observation au microscope optique de <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	20
Figure 7: Observation au microscope optique de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	23
Figure 8: Mesure des diamètres d'inhibition (crédit photo A. JABOL).....	32
Figure 9 : Inclinaison des tubes à 30° (crédit photo A. JABOL) .....	33
Figure 10: Comparaisons des valeurs moyennes d'inhibition de <i>S. salivarius</i> .....	40
Figure 11: Evaluation de l'adhérence du biofilm au tube de verre (de la gauche vers la droite et de haut en bas : (1) Souche 90 : score 4, (2) Souche 55 : score 3, (3) Souche 284 : score 2, (4) Souche 210 : score 1) (crédit photo M. Saint-Marc) .....	41
Figure 12: Comparaison des colonies formées après étalement sur gélose des biofilms témoins (sans <i>S. salivarius</i> ) et des biofilms contenant une souche de <i>S. salivarius</i> .....	43
Figure 13: Photographie du gel d'électrophorèse après amplification PCR pour le gène de la salivaricine 9 (SivA): positif pour la souche 152 (présence d'une bande à 491 pb) (crédit photo M. Saint-Marc).....	44
Tableau 1: Amorces spécifiques des salivaricines A et 9 .....	36
Tableau 2: Composition du Mix pour 1µL d'ADN .....	36
Tableau 3: Programme spécifique à chaque salivaricine .....	37
Tableau 4: Diamètres d'inhibition des différentes souches de <i>S. salivarius</i> sur <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	38
Tableau 5: Diamètres d'inhibition des souches de <i>Streptococcus salivarius</i> sur <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	39
Tableau 6: Répartition des scores d'adhérence des souches de <i>S. salivarius</i> .....	41

## Bibliographie

1. **Armitage Gary C.**, Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions, *Ann Periodontol*, 1999, vol.4,n°1, pp. 1-6
2. **Bagg J, Macfarlane W, Poxton I**, Essentials of Microbiology for Dental Students, Editions Oxford University Press 1999, 326 p.
3. **Barbour A, Philip K, Muriandy S.**, Enhanced Production, Purification, Characterization and Mechanism of Action of Salivaricin 9 Lantibiotique Produced by *Streptococcus salivarius* NU10, 2013. Disponible sur *PLoS ONE* 8(10): e77751
4. **Barbour P, Philip K**, Variable Characteristic of Bacteriocin-Producing *Streptococcus salivarius* Strains Isolated from Malaysian Subjects, 2014. Disponible sur *PLoS ONE* 9(6): e100541
5. **Barbour A., Tagg J, Abou-Zied O.K. et al.**, New insights into the mode of action of the lantibiotic salivaricin B, *Scientific Reports*, 2016. Disponible sur [www.nature.com/scientificreport](http://www.nature.com/scientificreport)
6. **Barretto C, Alvarez-Martin P, Foata F et al.**, Genome Sequence of the Lantibiotic Bacteriocin Producer *streptococcus salivarius* Strain K12, *Journal of Bacteriology*, 2012, vol.194, pp. 5959-5960
7. **Birri D.J., Brede D.A., Nes I.F.**, Salivaricin D, a Novel Intrinsically Trypsin-Resistant Lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c Isolated from Healthy Infant, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012 vol.78, n°2, pp 402-410
8. **Bodet C., Chandad F., Grenier D**, Potentiel pathogénique de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, et *Tannerella forsythia*, le complexe bactérien rouge associé à la parodontite, *Pathologie Biologie*, 2007, vol. 55, pp. 154-162
9. **Burton J.P., Chilcott C.N, Moore C.I et al.**, A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters, *Journal of Applied Microbiology*, 2006, vol. 100, pp 754-764
10. **Burton J.P, Cowley S., Simon R.R. et al.**, Evaluation of safety and human tolerance of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12: A randomized, placebo-controlled, double-blind study, *Food and Chemical Toxicology*, 2011, vol. 49, pp. 2356-2364
11. **Burton J.P, Drummon B.K, Chilcott C.N. et al.**, Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial, *Journal of Medical Microbiology*, 2013, vol. 62, pp. 875-884
12. **Burton J.P, Wescombe P.A, Macklaine J.M. et al.**, Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is Dose Dependent and Megaplasmid Transfer Can

Augment their Bacteriocin Production and Adhesion Characteristic, 2013. Disponible sur *PLoS ONE* 2013 8(6): e65991

13. **Burton J.P, Wescombe P.A, Moore C.J. et al.**, Safety Assessment of the Oral Cavity Probiotic *Streptococcus salivarius* K12, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol.72, n°4, pp. 3050-3053
14. **Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M.** Microbiologie en odonto-stomatologie, Editions Maloine 2006, 329 p.
15. **Dierksen Karen P., Moore Chris J., Inglis M. et al.**, The effect of ingestion of milk supplemented with salivaricine A-producing *Streptococcus salivarius* on the bacteriocin-like inhibitory activity of streptococcal populations on the tongue, *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, vol. 59, pp. 584-591
16. **Di Pierro F., Columbo M., Zanvit A. et al.**, Use of *Streptococcus salivarius* K12 in the prevention of streptococcal and viral pharyngotonsillitis in children, *Drug, Healthcare and Patient Safety*, 2014, vol. 6, pp. 15-20
17. **Di Pierro F., Donato G., Fomia F et al.**, Preliminary pediatric clinical evaluation of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* K12 in preventing recurrent pharyngitis and/or tonsillitis caused by *Streptococcus pyogenes* and recurrent acute otitis media, *International Journal of General Medicine*, 2012, vol. 5, pp. 991-997
18. **Di Pierro F, Zanvit A, Nobili P. et al.**, Cariogram outcome after 90 days of oral treatment with *Streptococcus salivarius* M18 in children at high risk for dental caries: result of randomized, controlled study, *Clinical, cosmetic and Investigational Dentistry*, 2015, vol. 7, pp 107-113
19. **Duyninh T, Jame O., Bousquet P., Gibert P. et al.**, Classification des maladies parodontales, *EMC-Odontologie*, 2005, vol 1, pp. 58-66. Disponible sur: <http://france.elsevier.com/direct/EMCODO/>
20. **Fleming HP, Etchells JL, et Costilow RN**, Microbial inhibition by an isolate of pediococcus from cucumber brines, *Appl Microbiol*, 1975, vol. 30, pp. 1040-1042
21. **Guggenheim B, Gmür R, Galicia JC**, In vitro modeling of host-parasite interaction: the 'subgingival' biofilm challenge of primary human epithelial cells, *BMC Microbiol*, 2009, 12p. Disponible sur: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/280>
22. **Hamada, S., and M. Torii.**, Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces, *Infect Immun*, 1978, vol.20, pp 592-9
23. **Heng N.C.K, Haji N.S, Kalyan A. et al.**, Genome sequence of the Bactriocin-Producing Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* Strain M18, *Journal of Bacteriology*, 2011, vol. 193, pp. 6402-6403
24. **Houle M.A., Grenier D**, Maladies parodontales: connaissances actuelles, *Médecine et maladies infectieuses* 2003, vol.3, pp. 331-340

25. **Hyink O., Wescombe P.A., Upton M. et al.**, Salivaricin A2 and the Novel Lantibiotic Salivaricin B are encoded at adjacent Loci on a 190-Kilobase Transmissible Megaplasmid in the Oral Probiotic strain *Streptococcus salivarius* K12, *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, vol.73, n°4, pp. 1107-1113
26. **Igarashi T, Yano Y, Yamamoto A et al**, Identification of *Streptococcus salivarius* by PCR and DNA probe, *Lett Appl Microbiol*, vol.32, n°6, pp. 394-397
27. **Ishijima S.A., Hayama K., Burton J. et al.**, Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the In Vitro Growth of *Candida albicans* and Its Protective Effect in an Oral Candidiasis Model, *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, vol. 78, n°7, pp. 2190-2199
28. **Jamali Zahra, Aminabadi Naser Asl, Samiei Mohammad et al.**, Impact of Chlorhexidine Pretreatment Followed by Probiotic *Streptococcus salivarius* Strain K12 on Halitosis in Children: A Randomised Controlled Clinical Trial, *Oral Health Prev Dent*, 2016, vol. 14, n°4, pp. 305-313
29. **Jia Fang**, Genome Sequence of the Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* JF, *American Society for Microbiology*, 2016, vol.4, Issue 5
30. **Ke Xiaojing, Lei Lang, Li Huang et al.**, Manipulation of necroptosis by *Porphyromonas gingivalis* periodontitis development, *Molecular Immunology*, 2016, vol.77, pp. 8-13
31. **Labbé S., Leke N., Marcotte C. et al.**, Interactions bactériennes : rôle déterminant lors des maladies parodontales, *Méd Mal Infect*, 1999, vol. 28, pp. 186-192
32. **Lakshman Samaranayake**, Essential Microbiology for Dentistry, 3ème edition, Editions Elsevier Health Sciences, 2006, 384 p.
33. **Lévesque C, Lamothe J, Frenette M**, Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens: evidence for involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*, *Oral Microbiology Immunology*, 2003, vol. 18, pp. 333-337
34. **Li Yan, Guo Hongmei, Wang Xijun, et al.**, Coinfection with *Fusobacterium nucleatum* can enhance the attachment and invasion of *Porphyromonas gingivalis* or *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* to human gingival epithelial cells, *Archive of Oral Biology*, 2015, vol. 60, pp. 1387-1393
35. **Liu Junchao, Tang Xiaolin, Li Chen, et al.**, *Porphyromonas gingivalis* promotes the cell cycle and inflammatory cytokine production in periodontal ligament fibroblast, *Archive of Oral Biology*, 2015, vol.60, pp. 1153-1161
36. **Manning J., Dunne Eileen M, Wescombe Philipp.A et al.**, Investigation of *streptococcus salivarius*-mediated inhibition of pneumococcal adherence to pharyngeal epithelial cells, *BMC Microbiology*, 2016, vol. 16, p 225

37. **Marchisto P., Esposito S., Principi N.**, The evidence for applying *Streptococcus salivarius* 24SMB by nasal spray for preventing recurrent otitis media, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, vol. 35, pp. 1889-1890
38. **Monsarat Angélique**, Suivi des taux de *Streptococcus ssp* et de *Lactobacillus ssp* chez les enfants atteints de caries précoces avant et après soins sous anesthésie générale, 90p, Thèse de doctorat : Chirurgie Dentaire, Université de Bordeaux, 2014
39. **Mosca A., Miragliotta Luisa., Iodice M A.**, Antimicrobial profiles of *Prevotella spp*, and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, vol. 30, pp. 521-524
40. **Murchison H, Larrimore S ,Curtiss R**, 3rd, Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* mutants defective in adherence and aggregation, *Infect Immun* 34 (1981) 1044-55.
41. **Nase L, Hataka k, Savilathi E et al.** , Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children, *Caries Res*, 2001, vol 3, pp 412-420
42. **Ogawa A, Furukawa S, Fujita S. et al.**, Inhibition of *Streptococcus mutans* Biofilm Formation by *streptococcus salivarius* FruA, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, vol. 77, n°5, pp 1572-1580
43. **Okuda T., Kokubo E, Kawana T**, Synergy in biofilm formation between *Fusobacterium nucleatum*, and *Prevotella* species, *Anaerobe*, 2012, vol. 18, pp. 110-116
44. **Orti V., Jame O., Calas I. et al.**, Antibiothérapie et maladie parodontales, *EMC-Dentisterie*, 2004, vol. 1, pp. 62-70. Disponible sur Elsevier SAS
45. **Rogers A.H**, Bacteriocin Production and Susceptibility Among Strains of *Streptococcus mutans* Grown in the Presence of Sucrose, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 1974, vol.6, n°5, pp. 547-550
46. **Ross Karen F., Ronson Clive W, Tagg John R.**, Isolation and Characterization of the Lantibiotic Salivaricine A and its Structural Gene salA from *Streptococcus salivarius* 20P3, *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, vol.59, n°7, pp. 2014-2021
47. **Saito A., Kokubu E, Inagaki S.**, *Porphyromonas gingivalis* entry into gingival epithelial cells modulated by *Fusobacterium nucleatum* is dependent on lipid rafts, *Microbial Pathogenesis*, 2012, vol.53, pp. 234-242
48. **Samot J, Badet C**, Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health, *Anaerobe*, Novembre 2013, vol. 19, pp. 34-38. Disponible sur SciVerse ScienceDirect
49. **Samot J, Lebreton J, Badet C**, Adherence capacities of oral lactobacilli for potential probiotic purposes, *Anaerobe*, 2011, vol. 17, pp. 69-72

50. **Sánchez Gabriel A, Acquier Andrea B, De Couto A et al.**, Association between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque and clinical parameters, in Argentine patients with aggressive periodontitis, *Microbial Pathogenesis*, 2015, vol. 82, pp. 31-36
51. **Sterer N, Rosenberg M**, *Streptococcus salivarius* promotes Mucin Putrefaction and malodor production by *Porphyromonas gingivalis*, *Journal of Dental Research*, 2006, vol. 10, pp. 910-914
52. **Tamura S., Yonezawa H., Motegi M.** Inhibiting effect of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*, *Oral Microbiology Immunology*, 2009, vol.24, pp 152-161
53. **Testa Mercedes M, Ruiz de Valladares R, Benito de Cardenas I**, Antagonistic interactions among *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia* with oral lactobacilli, *Research in Microbiology*, 2003, vol. 154, pp. 669-675
54. **Tomita Sachiyo., Komiya-Ito Akiyo., Imamura K., Kita D.**, Prevalence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and *Tannerella forsythia* in Japanese patients with generalized chronic and aggressive periodontitis, *Microbial Pathogenesis*, 2013, vol. 61, pp. 11-15
55. **Upton M, Tagg JR, Wescombe P, Jenkinson HF**, Intra- an Interspecies Signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* Mediated by SalA and SalA1 Lantibiotic, *Journal of Bacteriology* 2001, vol. 183, pp 3931-3938
56. **Van Hoogmoed C.G, Geertsema-doornbusch, Teughels T. et al.**, Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains, *Oral Microbiology Immunology*, 2008, vol. 23, pp. 43-48
57. **Wescombe P.A, Dyet K Dierksen K.P., et al.**, Salivaricin G32, a Homolog of the Prototype *Streptococcus pyogenes* Nisin-like lantibiotic SA-FF22, Produced by the Commensal Species *Streptococcus salivarius*, *International Journal of Microbiology*, 2011, vol.2012, 10p
58. **Wescombe P.A, Upton M., Dierksen K.J. et al.**, Production of the Lantibiotic Salivaricin A and Its Variants By Oral Streptococci and Use of a Specific Induction Assay To Detect Their Presence in Human Saliva, *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, n°2, pp. 1459-1466
59. **Wescombe P.A, Upton M., Renault P.**, Salivaricin 9, a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*, *Microbiology*, 2011, vol. 157, pp. 1290-1299
60. **Zilm Peter S., Rogers Antony H.**, Co-adhesion and biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* in response to growth pH, *Anaerobe*, 2007, vol. 13, pp. 146-152
61. **Zunzarren R**, Guide Clinique d'odontologie, 2<sup>ème</sup> édition, Editions Elsevier Masson 2014, pp. 94-107

## Annexes

### **Annexe 1 : Composition de la gélose molle BHI et de la gélose TS**

La gélose molle est préparée puis stérilisée la veille des expérimentations. Elle est ensuite conservée au réfrigérateur.

#### **Composition : BHI ana**

- 7g/L Agar
- 10 mg/L Hémine
- 1 mg/L Ménadione
- 5 g/L Extrait de levure

#### **Composition Gélose TS : (Quantités pour 20 géloses) :**

- Mélange pour bouillon TS : 15 g
- Agar (15 g/L)
- 500 mL d'eau distillée

Une fois la préparation faite, elle est placée dans un flacon pour être stérilisée à l'autoclave. Elle est ensuite coulée dans des boîtes de Pétri que l'on conservera au réfrigérateur.



## **Annexe 2 : Composition du milieu FUM et du milieu TS**

### **Millieu FUM**

Pour 1 litre d'eau distillée :

- 10 g Tryptone
- 5 g Yeast extract
- 3 g Glucose
- 2 mg Hémine
- 1 mg Menadione
- 0.5 g Cystéine hydrochloride
- 0.1 g Dithiotreitol
- 2.9 g NaCl
- 0.5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 1 g KNO<sub>3</sub>
- 0.45 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 0.45 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 0.9 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- 0.188 g MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

Ajuster à pH 7.1

### **Bouillon TS**

- Pancreatic digest of casein : 17.0 g/L
- Enzymatic digest of soya bean: 3.0 g/L
- Sodium chloride: 5.0 g/L
- Di-potassium hydrogen phosphate: 2.5 g/L
- Glucose: 2,5 g/L

On dilue 15 g de ce mélange dans 500 mL d'eau distillée. Le mélange est ensuite verser dans des tubes à essai avant d'être stérilisé à l'autoclave.

## **Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN**

### **1- Instruction de préparation**

- Préchauffer un bain marie où une étuve à 55°C : Pour gram+ et gram-
- Mélanger les réactifs : Si certains réactifs forment un précipité, les chauffer entre 55 et 65°C pour les dissoudre, et les ramener à la température de la pièce avant de les utiliser.
- Diluer la solution de lavage « wash » concentré : Diluer le concentré dans 10 mL (pack 10 prep) d'éthanol à 95-100%

*Après chaque utilisation, bien refermer la solution diluée pour éviter l'évaporation.*

- Reconstituer le protéinase K : Diluer avec 0.25 mL d'eau (pack 10 prep) pour obtenir une solution à 20 mg/mL

*Elle peut être conservée pour quelques jours entre 2 et 8°C. Pour des stockages plus longs, elle doit être maintenue à -20°C.*

- Préparer la solution de Lysozyme :

\*A utiliser le jour de la préparation

\*200 µL de solution de lysozyme sont nécessaires pour chaque échantillon (prévoir une marge d'erreur

\*Préparer  $2.115 \times 10^6$  unité/mL de la solution de stockage de lysozyme (L7651) en utilisant la solution de lyse gram+ (L7539) comme diluant

Soit pour 1 mL de solution de lysozyme, dissoudre  $2.115 \times 10^6$  unités de lysozyme dans 1 mL de la solution 1 mL de la solution de lyse gram+

**Pour le lysozyme à 20 000 u/mg il faut 0.10575g par mL (0.05287g pour 500µL lyse gram+, soit deux tests**

Dissoudre le lysozyme en mélangeant par pipetage ou en vortexant

## 2- Préparation pour les bactéries GRAM +

- Préparer la solution de lysozyme
- Harvest cellules :
  - \*Centrifuger 1.5 mL d'une culture overnight de bactéries pendant 2 min, entre 12 et 16000 g (16400 rpm)
  - \*Jeter le surnageant
  
- Dissolution du culot :
  - \*Dissoudre complètement le culot dans 200 µL de la solution de lysozyme
  - \*Incuber 30 minutes à 37°C
  
- Lyse des cellules
  - \*Ajouter 20µL de la solution de protéinase K dans l'échantillon, puis 200µL de la solution de lyse C (B8803)
  - \*Vortexer complètement (environ 15 secondes)
  - \*Incuber à 55°C pendant 10 minutes

*Rq : un mélange homogène est essentiel pour une bonne lyse*

  - \* Ajouter 20µL RNase 2 minutes à température ambiante

## 3- Isolation de l'ADN pour les GRAM + et GRAM –

- Préparation de la colonne
  - \*Ajouter 500µL de la solution de préparation de la colonne dans chaque colonne pré-assemblée (avec la bague rouge), positionnée dans un tube à récolte de 2 mL
  - \*Centrifuger à 12000g (13500 rpm) pendant 1 minute
  - \*Jeter l'éluat mais conserver le tube à récolte
  
- Préparation du liant
  - \*Ajouter 200µL d'éthanol (95-100%) au lysat
  - \*Vortexer 5 à 10 secondes

*Remarque l'homogénéité est importante*

- Chargement du lysat

\*Transférer la totalité du tube dans la colonne (*utiliser une pipette à large embout pour éviter le déchirement de l'ADN*)

\*Centrifuger 1 minute à plus de 9000 rpm

\*Éliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer la colonne dans un nouveau tube à récolte

- 1<sup>er</sup> lavage

\*Ajouter 500µL de la solution de lavage 1 (W0263) dans la colonne

\*Centrifuger 1 minute à 7345 rpm

\*Éliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer à nouveau la colonne dans un nouveau tube à récolte

- 2<sup>ème</sup> lavage

\*Ajouter 500 µL de la solution de lavage dans la colonne

\*Centrifuger 3 minutes à vitesse maximale (16400 rpm) pour sécher la colonne

\*Vérifier que la colonne ne contienne pas d'éthanol avant de faire l'élution de l'ADN. (*Si de l'éthanol est encore visible centrifuger 1 minute supplémentaire à la vitesse max en vidant et ré-utilisant le tube à récolte*).

\*Changer le tube

- Elution de l'ADN

\*Pipeter 200µL de la solution d'élution (B6803) directement sur le centre de la colonne. (*Pour augmenter l'efficacité, incubé 5 minutes à la température de la pièce*).

\*Centrifuger 1 minute à au moins 7345 rpm.

La concentration et la qualité de l'ADN peuvent être déterminées par analyse spectrophotométrique et électrophorèse sur gel d'agarose.

## **Annexe 4 : Protocole Electrophorèse sur gel d'agarose**

### **Générateur :**

Préparation du gel pour l'électrophorèse :

- TEB 1x : 75 mL
- Agarose : 0.75 g

A chauffer pendant 2 minutes à 500W, puis après refroidissement rajouter :

- Bromure d'éthidium : 2.5  $\mu$ L

- Répandre la solution de gel dans l'espace étanche de la cuve à électrophorèse
- Mettre en place un peigne correspondant au nombre d'échantillons disponibles
- Dans un tube neuf déposer 10  $\mu$ L d'échantillon + 5  $\mu$ L de tampon de charge
- Enlever délicatement le peigne après refroidissement du gel
- Retourner la plaque
- Recouvrir entièrement la plaque de TEB 1x jusqu'au niveau « FILL LINE »
- Remplir chaque puit : le premier avec le DNA ladder et les suivants avec les extraits d'échantillon
- Faire migrer pendant 1h sous 150 volt.

**Annexe 5 : Tableau des résultats des scores d'adhérence obtenus pour chaque souche de *S. salivarius***

<i>S. salivarius</i>	Score d'adhérence	Type de Biofilm
1	4	Biofilm épais et très adhérent
40	4	Biofilm épais et très adhérent
49	4	Biofilm épais et très adhérent
51	4	Biofilm épais et très adhérent
54	4	Biofilm épais et très adhérent
55	3	<b>Biofilm épais et adhérent</b>
72	3 à 4	Biofilm épais et adhérent
90	4	Biofilm épais et très adhérent
96	3 à 4	Biofilm épais et adhérent
102	4	Biofilm épais et très adhérent
120	4	Biofilm épais et très adhérent
145	4	Biofilm épais et très adhérent
149	4	Biofilm épais et très adhérent
152	4	Biofilm épais et très adhérent
153	4	Biofilm épais et très adhérent
166	4	Biofilm épais et très adhérent
170	4	Biofilm épais et très adhérent
180	4	Biofilm épais et très adhérent
186	4	Biofilm épais et très adhérent
187	3	Biofilm épais et adhérent
192	2 à 3	<b>Biofilm épais à adhérence moyenne</b>
202	2	Biofilm épais à adhérence moyenne
210	1	<b>Biofilm présent mais non adhérent</b>
247	4	Biofilm épais et très adhérent
257	3 à 4	Biofilm épais et très adhérent
279	3 à 4	Biofilm épais et très adhérent
284	2	<b>Biofilm épais mais peu adhérent</b>
289	3 à 4	Biofilm épais et très adhérent
304	4	Biofilm épais et très adhérent
311	4	Biofilm épais et très adhérent
312	4	Biofilm épais et très adhérent
318	4	Biofilm épais et très adhérent
K12	4	Biofilm épais et très adhérent
K12b	4	Biofilm épais et très adhérent

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 :

## Collège des Sciences de la Santé

### UFR des Sciences Odontologiques

# Serment

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

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

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

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

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

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

