



HAL
open science

Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique

Samantha Payet

► **To cite this version:**

Samantha Payet. Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique. Chirurgie. 2017. dumas-01694351

HAL Id: dumas-01694351

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01694351v1>

Submitted on 27 Jan 2018

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

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

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

Année : 2017

N° 96

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

Présentée et soutenue publiquement

Par Samantha PAYET

Née le 08 juillet 1992, à Saint-Pierre (974)

Le lundi 18 décembre 2017

**Méthode d'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un
modèle de biofilm oral pluri-espèces dynamique**

Directeur de thèse
Docteur Darrène NGUYEN

Membres du Jury

Présidente	Mme. V. DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Mme. D. NGUYEN	Assistante Hospitalo-Universitaire
Rapporteur	M. J. SAMOT	Maître de conférence des Universités
Assesseur	Mme. C. BADET	Maître de conférence des Universités
Assesseur	M. C. BOU	Maître de conférence des Universités

UNIVERSITE DE BORDEAUX

MAJ
25/09/2017

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

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Caroline	BERTRAND	Prothèses	58-01
Mme	Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Sylvain	CATROS	Chirurgie orale	57-01
Mme	Véronique	DUPUIS	Prothèses	58-01
M.	Bruno	ELLA NGUEMA	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	FRICAIN	Chirurgie orale	57-01

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Mme	Elise	ARRIVÉ	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02
Mme	Cécile	BADET	Biologie orale	57-01
M.	Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Michel	BARTALA	Prothèses	58-01
M.	Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Christophe	BOU	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02
Mme	Sylvie	BRUNET	Chirurgie orale	57-01
M.	Stéphane	CHAPENOIRE	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
M.	Jacques	COLAT PARROS	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
M.	Jean-Christophe	COUTANT	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
M.	François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Raphael	DEVILLARD	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Emmanuel	D'INCAU	Prothèses	58-01
M.	Dominique	GILLET	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Jean-François	LASSERRE	Prothèses	58-01
M.	Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme	Odile	LAVIOLE	Prothèses	58-01
M.	Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie orale	57-01
Mme	Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Adrien	NAVEAU	Prothèses	58-01
Mme	Dominique	ORIEZ	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01

M.	Jean-François	PELI	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Philippe	POISSON	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02
M.	Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M.	Johan	SAMOT	Biologie orale	57-01
Mme	Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mme	Noélie	THEBAUD	Biologie orale	57-01
M.	Eric	VACHEY	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01

ASSISTANTS

Mme	Audrey	AUSSEL	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
M.	Wallid	BOUJEMAA AZZI	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
Melle	Camille	BOULÉ-MONTPEZAT	Odontologie pédiatrique	56-01
Melle	Anaïs	CAVARÉ	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Hubert	CHAUVEAU	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Mathieu	CONTREPOIS	Prothèses	58-01
M.	Jean-Baptiste	CULOT	Fonction-dysfonction, imagerie, biomatériaux	58-01
Mme	Clarisse	DE OLIVEIRA	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Cédric	FALLA	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02
Mme	Mathilde	FENELON	Chirurgie orale	57-01
Mme	Elsa	GAROT	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme	Agathe	GREMARE	Biologie orale	57-01
Mme	Olivia	KEROUREDAN	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Adrien	LASTRADE	Prothèses	58-01
M.	Alexandre	MARILLAS	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Emmanuel	MASSON-REGNAULT	Chirurgie orale	57-01
Mme	Marie	MÉDIO	Orthopédie dento-faciale	56-01
Mme	Meryem	MESFIOUI	Parodontologie	57-01
Mme	Darrène	NGUYEN	Biologie orale	57-01
M.	Ali	NOUREDDINE	Prothèses	58-01
Mme	Chloé	PELOURDE	Orthopédie dento-faciale	56-01
M.	Antoine	PEPELUT	Parodontologie	57-01
Mme	Charlotte	RAGUENEAU	Prothèses	58-01
Mme	Noëlla	RAJONSON	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02
M.	Clément	RIVES	Dentisterie restauratrice, endodontie	58-01
M.	Thibaut	ROULLAND	Prothèses	58-01
M.	François	ROUZÉ L'ALZIT	Prothèses	58-01
Mme	Audrey	SAY LIANG FAT	Prévention, épidémiologie, économie de la santé, odontologie légale	56-02

Remerciements

A notre Présidente de thèse

Madame le Professeur Véronique DUPUIS

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Universitaire – DERSO – Docteur en Chirurgie Dentaire – Docteur d’Etat en Odontologie – Chef de pôle d’Odontologie et de Santé Buccale du CHU de Bordeaux

Sous-section Prothèse 58-02

Je vous remercie de l’honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse. Voyez en ce travail l’expression de mon profond respect.

A notre Directrice de thèse

Madame le Docteur Darrène NGUYEN

Docteur en Chirurgie Dentaire – Assistante Hospitalo-Universitaire

Sous-section Biologie orale 57-01

Je tenais à vous témoigner ma gratitude pour la confiance que vous m’avez accordée en me confiant ce sujet de thèse. Je vous remercie pour votre investissement dans mon travail, vos conseils et la gentillesse avec laquelle vous avez répondu à chacune de mes sollicitations. J’ai été ravie de travailler à vos côtés.

Permettez- moi de vous exprimer ici toute ma considération ainsi que l’assurance de mon profond respect.

A notre Rapporteur de thèse

Monsieur le Docteur Johan SAMOT

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier – Doctorat de l’Université de Bordeaux 2, Mention Sciences, Technologie, Santé, Option Microbiologie-Immunologie – Docteur en Chirurgie Dentaire – C.E.S d’Odontologie Chirurgicale – C.E.S de Parodontologie – C.E.S d’Odontologie Légale

Sous-section Biologie orale 57-01

Je souhaitais vous remercier d’avoir bien voulu accepter de juger ce travail et d’en être le rapporteur. J’ai eu le plaisir au cours de mes vacances hospitalières, de vous solliciter maintes fois et toujours votre bienveillance et vos qualités de pédagogue m’ont permis de m’améliorer. Veuillez trouver dans ces pages, le témoignage de mon estime à votre égard.

A notre Assesseur

Madame le Docteur Marie-Cécile BADET

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier – Doctorat de l'Université de Bordeaux 2, Mention Sciences Biologiques et Médicales Option Sciences Odontologiques – Docteur en Chirurgie Dentaire – C.E.S de Pédiodontie - Prévention
Sous-section Biologie orale 57-01

Je vous suis profondément reconnaissante pour votre investissement dans ce travail. Je vous remercie de m'avoir ouvert les portes de votre laboratoire et pour les moyens que vous avez mis à ma disposition pour me permettre de le mener à bien. Merci infiniment pour votre gentillesse, votre patience et votre disponibilité. Vous avez été ma sauveuse du jeudi matin à l'hôpital. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus vive reconnaissance, ainsi que la marque de mes sentiments les plus respectueux.

A notre Assesseur

Monsieur le Docteur Christophe BOU

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier – Docteur en Chirurgie Dentaire – Docteur en Sciences Odontologiques – C.E.S de Prothèse maxillo-faciale – D.U. d'Economie de la santé et organisation professionnelle en Odontologie – D.U. d'Odontologie légale et Expertise – Doctorat de l'Université de Toulouse III – D.E.A Anthropologie physique
Sous-section Prévention épidémiologie – Economie de la Santé – Odontologie légale 56-03

C'est pour moi une grande joie et un honneur que vous ayez accepté de siéger dans ce jury. J'ai été heureuse d'être votre binôme durant une année. Merci pour vos petites astuces ; vous êtes pour moi le MacGyver de la PMA. Votre bonne humeur et votre gentillesse ont égayé mes vacances à l'hôpital. Vous trouverez dans ce travail le sceau de ma grande considération pour vous, et mes remerciements les plus appuyés.

A ma famille

A mes chers parents,

Aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Vous êtes les personnes les plus importantes de ma vie, deux êtres d'exception.

Vous, qui avez œuvré pour ma réussite, de par votre amour, votre soutien, tous les sacrifices consentis et vos précieux conseils, recevez à travers ce travail, aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Chaque ligne de cette thèse vous exprime la reconnaissance et le respect que j'ai pour vous. Ma Mamounette d'amour et Mon Dudu, je suis très fière d'avoir des parents comme vous, je vous aime !

« Le bonheur, c'est avoir une mère qui nous aime, un père pour nous conduire, avoir encore ses parents à l'âge adulte pour les voir sourire à nos efforts, et voir nos parents applaudir à nos succès », Henri-Frédéric Amiel.

A mon frère,

Toi qui a l'immense privilège de m'avoir comme sœur, je te dédie ce travail ☺ Nous nous sommes souvent querellés, et je pense que cela n'est pas près de s'arrêter, mais je sais que nous nous réconcilierons toujours. Je suis fière de ton parcours et j'espère que ton avenir sera rempli de prospérité et de bonheur.

Je te remercie d'avoir fait entrer le petit Luidgi (Gigi l'Amoroso) dans nos vies, jamais je n'aurais pensé m'attacher autant à un chien !

A mes grands-parents,

Mamie Hélène et Papi Maximin, je vous remercie pour cette merveilleuse enfance que j'ai pu vivre auprès de vous. Je garde un souvenir impérissable de nos dimanches et de nos fêtes de famille.

Pépé et Mémé, je dédie cette thèse à votre mémoire. Vous, qui êtes partis bien trop tôt, demeurez à jamais dans mon cœur.

A Tatie Nicaise et Tonton Aldo,

Tatie, Tonton, je vous remercie d'avoir fait le voyage pour venir me soutenir en ce grand jour. Je suis fière de vous compter parmi mes invités.

A Tonton Lélin, Tatie Hélène-May et Tonton, à mon Parrain et à tous les membres de ma famille qui ont contribué de près ou de loin à la personne que je suis devenue.

A mes ami(e)s

« La vraie amitié, l'amitié qui agit et se révèle par des faits, consiste en ce que nous suivions la même voie, dans la vie ; que mon ami favorise mes desseins et moi les siens, que nous marchions ensemble sans nous détourner, quelle que soit d'ailleurs notre manière de penser et de vivre », Goethe

A Chloé, alias MP, alias la meilleure kinésithérapeute de la Réunion !

Voilà maintenant quinze ans que nous nous connaissons. Tout a commencé en 6^{ème} B et nombre de souvenirs me viennent à l'esprit : nos discussions sous le préau concernant les telenovelas, tes manigances pour te faire exclure du cours de Latin de la pauvre Madame Achar, tes « grignotages » de sucettes cachée derrière un livre en cours d'Anglais, la journée d'appel durant laquelle il nous a semblé voir des « Monsieur Dupont » partout, les TPE et notre fou-rire monumental dans l'église des Colimaçons, tes mémorables siestes en cours de philosophie le samedi matin, et j'en passe ☺

Nous avons survécu à la PACES ensemble, ce fut dur, mais nous avons réussi ! D'ailleurs je ne sais pas si tu t'en souviens mais c'est toi qui m'avais annoncé que j'étais classée en rang utile en Dentaire.

Toutes ces choses que nous avons partagées font de toi une amie qui m'est chère.

A Nicolas, le Lala du trio MP, Lala et Tata !

Je te dédie cette thèse, toi le Boss des maths, le *serial* Globe-trotteur à l'esprit d'aventure, le grand Ingénieur en devenir aux projets à profusion et aux idées innovantes mais souvent folles. Je te remercie pour ces longs appels téléphoniques durant lesquels nous rêvions du jour où nous rentrions à la Réunion pour les vacances et nous salivions en pensant aux petits plats de nos mamans. Merci de m'avoir écoutée me lamenter durant mes années d'études. Un vrai Pote !

Je suis impressionnée par ta détermination et je suis sûre que tu iras loin dans la vie. Lorsque tu seras devenu millionnaire, que dis-je milliardaire, j'espère que tu ne m'oublieras pas, une Maserati sera suffisante ou une Bentley ☺

A Jennyfer,

Nous nous sommes rencontrées le jour de la rentrée en P2, et nous avons bravé ces cinq difficiles années ensemble ! Nous avons partagé tellement de galères ! Je ne sais pas qui de toi ou de moi a le plus la poisse ...

J'ai découvert en toi une personne d'une grande générosité et d'une grande modestie. Merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter durant toutes ces années et merci pour tous tes bons plans concerts (je pense à l'un d'eux en particulier : M.C. ☺).

Je suis heureuse de présenter cette thèse à tes côtés.

J'espère que ton avenir sera fait de réussite, de voyages et surtout, pour toi l'Épicurienne, de bons restaurants !

A Maureen,

Ma binôme adorée et copine de TP, je suis heureuse de te compter parmi mes amis.

Je souris encore en me souvenant de tes longues hésitations de *fashion addict* concernant l'achat d'un perfecto ou d'une veste en jean ou de ton extrême détermination dans le but d'obtenir un sac Claudie Pierlot (ou Sandro ?).

Je garde en mémoire nos nombreux moments potins. Je te remercie pour ton soutien, pour les moments de rigolade que l'on a pu avoir.

Un jour, je l'espère, tu pourras me faire visiter la Guadeloupe, nous ferons l'ascension de la Soufrière et nous partagerons un bokit ou la fameuse fricassée de lambis, avec en dessert, un cheesecake ou une tarte à la fraise, en écoutant le dernier titre de Queen B !

A Poehei,

Popo, tout d'abord, je tiens à te présenter mes plus plates excuses pour avoir écorché ton prénom durant cinq ans ☹

Je crois me souvenir que nous nous sommes parlées pour la première fois en TP de prothèse fixée et depuis, nous en avons parcouru du chemin ... De Katy Perry à Bruno Mars, de Londres à Montpellier, j'ai été ravie de partager ces moments avec toi. Ton bel accent tahitien me manquera.

J'espère avoir l'opportunité, un jour, de visiter ta Polynésie natale, découvrir la belle commune de Papara, déguster un burger ou des BBQ ribs sur la plage, après une session de surf ou de slackline !

A Adeline, Sophie et Noellie, les trois danseuses de pole dance inséparables !

Toutes les trois, vous êtes des filles super. Vous faites partie des personnes qui ont rendu ces cinq années plus agréables.

Adeline et Sophie, nous nous sommes connues en travaillant sur notre mémoire de biomatériaux, ce fameux mémoire ☺ Nous avons connu les galères de TP ensemble.

Adeline, toi la globetrotteuse, merci de m'avoir fait découvrir tes voyages et merci notamment pour les petits souvenirs du bout du monde !

Sophie, toi l'incroyable cuisinière, tu as mis de la couleur dans nos vie (référence à tes cheveux) ☺ Je te remercie d'avoir bien voulu me conduire à Xavier Arnozan ou à l'aéroport. Tu as le cœur sur la main et tu es une fille en or.

Noellie, la sportive aguerrie. J'aimerais tellement avoir ne serait-ce qu'un dixième de ta motivation ! J'espère te voir sur scène un jour, pour un spectacle de claquette ou de ragga.

A Chiara,

La mia amica venuta dall'Italia ! Je suis admirative de ton parcours. J'adorerais savoir parler italien comme toi tu parles le français. Un jour j'y arriverai *forse* ! Je te souhaite de connaître : *felicità, successo, prosperità, amore, matrimonio, bambini e gatti !*

A Elena,

Toujours de bonne humeur et souriante, ce fut un plaisir de te côtoyer durant ces années. Mon regret est de n'avoir jamais pu découvrir ta belle région et tes animaux !

A Marielle,

Notre interne, tu nous as abandonnés pour rejoindre la Ville rose, Ô Toulouse ! Je suis heureuse que tu t'épanouisses dans cette spécialité. Si un jour, par malheur, j'ai besoin d'un implant, je viendrai te voir ! Je te remercie pour ces préparations de CSCT du samedi matin.

Je te souhaite de connaître beaucoup de bonheur auprès de Théo (et pleins de beaux petits métisses).

A Hinarii,

Je suis très heureuse de t'avoir rencontrée. Je te remercie pour ton aide dans ce travail. Merci pour ta gentillesse et ton investissement.

Grâce à toi, j'ai enfin trouvé une personne capable d'écrire plus petit que moi ☺

A Brice, Aurore et Jérémy,

Brice, je voudrais te remercier pour ton aide et ton soutien en TP, également pour ton accueil il y a cinq ans. Merci pour ta gentillesse. Tu es quelqu'un de bien !

Aurore et Jérémy, tous les deux faites aussi partie des belles rencontres que j'ai pu faire durant ces études. Je vous souhaite de la réussite dans vos domaines respectifs. Tenez bon !

A tous mes ami(e)s,

Ceux que je connais depuis l'école primaire, le collège ou le lycée et qui ont fait de ma scolarité un bonheur : Anaëlle, Anaïs, Aurélie, Aurette, Christopher, Denis, Frédéric, Freddy, Jérémie, Lorraine, Marion, Mathias B., Mathias V., Samuel, Sébastien, Séverine, Tiana, Vincent L.S., Vincent P., Virginie L.L., Virginie T., et bien d'autres.

A toutes les autres personnes ayant une place dans mon cœur**A Darrène et Yoann,**

Darrène, de nouveau, je tiens à te témoigner ma reconnaissance. Merci pour la confiance que tu as placée en les deux bras cassés que nous sommes, Jennyfer et moi ☺ Malgré toutes les mésaventures que nous avons pu rencontrer au cours de nos expérimentations, jamais tu ne t'es découragée, tu es toujours restée d'humeur égale. Pour moi qui suis de nature pessimiste, ta positivité est un exemple. Je te souhaite bon courage pour ta thèse d'Université.

Yoann, je te remercie pour ton aide. Tes compétences en mathématiques et sur Excel nous ont sauvées, sinon je pense que nous y serions encore à l'heure actuelle !

Vous formez un magnifique couple, chaleureux et généreux. Je vous souhaite de connaître un avenir radieux et empreint de bonheur. Et peut-être aurons-nous l'occasion un jour de déguster des samoussas ou un rougail saucisses sur la plage de l'Ermitage pour la Saint-Sylvestre ! Et je suis désolée pour la raclette ☺

A Martine Saint-Marc,

Je te remercie pour ton aide, et Dieu sait que je t'ai très souvent sollicitée, et tes encouragements.

Aux Drs. Thébaud, Lavaud, Barsby, Clinkemaillié, Rives, Guénand, Marguier, Klenkle et Gunepin,

Je vous remercie pour tout ce que vous avez pu m'enseigner et votre gentillesse.

Au Dr. Raymond et au Dr. Durut,

Dr. Raymond, vous avez eu la gentillesse de m'accueillir au sein de votre cabinet en deuxième, puis en sixième année, et je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour cela. Merci pour votre pédagogie (et vos questions pièges). Je me souviendrai toujours, avec tendresse et avec une certaine honte, de nos prestations artistiques de fin de stage. Maxime, merci pour ta gentillesse et tes conseils.

Stéphanie et Valérie,

Stéphanie, mon ex-assistante, et Valérie, mon assistante préférées. Merci pour votre patience et votre gentillesse.

Stéphanie, *my american girl* ☺. Je te remercie pour ton extrême amabilité. Lorsqu'en deuxième année je suis venue en observation dans le cabinet du Dr. Raymond, tu m'as accueillie chaleureusement et lorsque je suis revenue vous embêter pour mon stage actif, tu as gentiment pris le temps d'établir les emplois du temps. Je te remercie pour tout cela. J'espère qu'on aura l'occasion de se revoir, ici ou aux États-Unis.

Valérie, *my girl from Bordeaux* ☺, ce fut un bonheur de faire ce stage actif auprès de toi. Ta bonne humeur a été un plaisir. J'adorerais pouvoir avoir une assistante comme toi un jour, dynamique, enthousiaste, en un mot : parfaite !

Aux binômes avec lesquels j'ai travaillé à l'hôpital.

A Solange, Fatma, Silvie, Eve, Patricia, Delphine, Fabienne, Valérie et Juliette, que je n'ai cessé d'embêter durant trois ans et qui ont rendu mes vacances plus faciles.

A l'ISVV et plus particulièrement à M. Olivier Claisse,

Je vous remercie de nous avoir ouvert les portes de l'ISVV et de nous avoir partagé vos connaissances.

Au Dr. Écarlate,

Mon orthodontiste, celui qui m'a donné envie de pratiquer cette profession.

A mes maîtresses de l'école primaire et autres professeurs,

Mesdames Vitry, Benoîte, Karine, Guilaine, Éliane, Elizabeth, Madame Francesconi et Señora Lopez-Cambra, Monsieur Pohu et Mister Santerne, merci de m'avoir donné le goût de l'apprentissage.

A Madame Lucas, à Madame Roselyne et au personnel du service d'Odontologie du CHU Félix Guyon, Gervais, Daniella, Cathy, Corine, Claudette et Laura.

A toutes les personnes bienveillantes que j'ai eu l'occasion de rencontrer au cours de mon existence mais que j'ai malheureusement omis de citer dans ces remerciements.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	14
I. L'ÉCOSYSTEME BUCCAL	14
1. QU'EST-CE QU'UN BIOFILM BACTERIEN.....	14
2. LE BIOFILM DENTAIRE	16
II. MODELES EXPERIMENTAUX DE BIOFILMS.....	20
1. GENERALITES	20
2. ÉTAT DES RECHERCHES EN MICROBIOLOGIE ORALE : LES MODELES DE BIOFILMS ORAUX	23
III. TECHNIQUES D'IDENTIFICATION BACTERIENNE : LES METHODES DE DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE.....	32
1. DIAGNOSTIC CONVENTIONNEL : METHODES D'IDENTIFICATION PHENOTYPIQUES	32
2. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE : METHODES D'IDENTIFICATION PROTEOMIQUES ET GENOTYPIQUES.....	35
IV. LA PCR QUANTITATIVE (qPCR).....	40
1. QU'EST-CE QUE LA qPCR ?.....	40
2. LES ETUDES AYANT FAIT APPEL A LA PCR QUANTITATIVE	49
PARTIE II : TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX.....	57
I. BUT DE L'ÉTUDE	57
II. MATERIEL ET METHODES	57
1. MATERIEL	57
2. METHODES D'ÉTUDE DES BIOFILMS.....	61
III. RESULTATS.....	68
1. GAMMES D'ÉTALONNAGE	68
2. BIOFILMS	69
3. CONCENTRATIONS BACTERIENNES	71
4. DETECTION DE <i>FUSOBACTERIUM NUCLEATUM</i>	76
5. UNITES FORMANT COLONIES (UFC)	77
6. COMPARAISON AVEC LES RESULTATS OBTENUS AVEC D'AUTRES TECHNIQUES D'IDENTIFICATION	78
DISCUSSION	79
CONCLUSION.....	82
BIBLIOGRAPHIE	83
ANNEXES.....	86

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

➤ Liste des figures :

Figure 1 : Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien

Figure 2 : Schématisation des micro-colonies bactériennes et des « espaces nutritifs » formant le biofilm bactérien

Figure 3 : Formation du biofilm dentaire (d'après Kolenbrander et London)

Figure 4 : Exemple de modèle de biofilm *ex vivo* sur un odonte

Figure 5 : Colonie sur boîte et biofilm à l'interface air-liquide

Figure 6 : Gélose

Figure 7 : Microplaque : modèle de culture de biofilm en condition statique et visualisé par coloration au cristal violet

Figure 8 : Schéma résumant le déroulement de la procédure expérimentale utilisée pour étudier la formation des biofilms selon le modèle de biofilm de Zurich

Figure 9 : Représentation schématique d'un chémostat

Figure 10 : A) Schéma du système dit en chambres à flux ou « *flow-cell* », B) *Flow Cell*

Figure 11 : Représentation schématique d'un *drip flow biofilm reactor*, adapté de McBain *et al.*

Figure 12 : Représentation schématique d'une bouche artificielle multiplaque, adapté de Sissons *et al.*, 2000

Figure 13 : Cinétique de la réaction de qPCR

Figure 14 : Courbes d'amplification et courbe standard de qPCR

Figure 15 : Représentation schématique du modèle de biofilm oral dynamique pluri-espèces *in vitro* de base mis au point au sein du laboratoire de l'Université d'Odontologie de Bordeaux

Figure 16 : Représentation schématique des étapes de recueil du biofilm et d'ensemencement

Figure 17 : Représentation schématique des étapes de dilution des souches bactériennes et d'ensemencement

Figure 18 : Exemple de plan de plaque sur portoir (A) et report à l'écrit (tapuscrit) nécessaire pour les analyses ultérieures (B)

Figure 19 : Courbes d'amplification et droite standard obtenues pour *S. oralis*

Figure 20 : Courbes d'amplification obtenue par qPCR d'échantillons de biofilms avec l'espèce *S. oralis*

Figure 21 : Courbes d'amplification de *F. nucleatum* avec ligne de bruit de fond ajustée à 458,30

Figure 22 : Courbe de fusion unimodale de *F. nucleatum* (A) et courbe de fusion de *P. gingivalis* avec des pics parasites

Figure 23 : Moyenne des concentrations milieux / disques pour chaque espèce en fonction des biofilms

Figure 24 : Graphiques présentant les concentrations bactériennes des biofilms 2 et 5 comparées à celles des biofilms 4 et 6

Figure 25 : Graphique présentant les concentrations bactériennes des biofilms 3 et 7

Figure 26 : Concentrations obtenues par qPCR permettant d'objectiver la présence de *F. nucleatum* au sein des biofilms 9 à 13 (A) et graphique obtenu à partir des moyennes de ces concentrations (B)

➤ **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Principaux genres bactériens présents dans la plaque dentaire, inspiré de Chardin H. *et al*, 2006

Tableau 2 : Liste non exhaustive de biofilms *in vitro* les plus couramment employés

Tableau 3 : La chimie SYBR® Green I

Tableau 4 : La chimie TaqMan®

Tableau 5 : Comparaison entre les chimies SYBR® Green I et TaqMan®

Tableau 6 : Liste des amorces (et sonde) utilisées dans notre étude

Tableau 7 : Programmes de thermocyclage

Tableau 8 : Concentrations bactériennes retrouvées par qPCR pour chaque biofilm (milieu Ax et disque Bx)

Tableau 9 : Résultat des comptages des UFC des gammes d'étalonnage

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
API	: <i>Analytical profil index</i>
ATCC	: <i>American Type Cell Culture</i>
AV	: <i>Actinomyces viscosus</i>
BHI	: <i>Brain Heart Infusion</i> (bouillon cœur cerveau)
CDFE	: <i>Constant Depth Film Fermentor</i>
DO	: Densité optique
E-2D	: Électrophorèse bidimensionnelle
FN	: <i>Fusobacterium nucleatum</i>
FUM	: <i>Fluid Universal Medium</i>
FUMe	: <i>Fluid Universal Medium</i> enrichi
MALDI-TOF	: <i>Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PG	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
qPCR	: PCR quantitative
SM	: <i>Streptococcus mutans</i>
SO	: <i>Streptococcus oralis</i>
SS	: <i>Streptococcus salivarius</i>
Ta	: <i>Annealing temperature</i>
TF	: <i>Tannerella forsythia</i>
Tm	: <i>Melting temperature</i>
TS	: Tryptone-Soja
WCA	: <i>Wilkins-Chalgren Anaerobe</i>

INTRODUCTION

Chez l'Homme, la cavité buccale abrite plus de 700 espèces bactériennes interagissant entre elles et avec les tissus hôtes. Ces interactions complexes aboutissent à la formation de biofilms microbiens, la plaque dentaire et la plaque sous-gingivale, à l'origine des pathologies carieuses et parodontales. Par conséquent, il est important de connaître la composition et de comprendre le fonctionnement de ces biofilms afin de prévenir et traiter au mieux ces maladies.

Pendant longtemps, les microbiologistes ont adopté une approche réductionniste, étudiant les bactéries individuellement. Cette stratégie a rapidement montré ses limites, la flore microbienne buccale constituant l'une des plus complexes du corps humain. Ainsi, au fil du temps, pour pouvoir étudier le biofilm oral de façon optimale et se rapprocher au mieux des conditions *in vivo*, divers modèles ont été conçus.

Pour détecter et identifier ces bactéries, de nombreuses méthodes existent, allant de l'examen direct au microscope à contraste à des techniques plus sophistiquées de biologie moléculaire.

Des travaux conduits au sein du laboratoire de microbiologie de l'UFR d'Odontologie de Bordeaux ont permis de mettre en place un modèle dynamique de biofilm pluri-espèces *in vivo*.

La compréhension du rôle et de l'impact des bactéries constituant ce biofilm sur les maladies touchant la sphère orale implique de connaître les caractéristiques quantitatives spécifiques de ces populations bactériennes.

L'objectif de notre travail est de procéder à l'identification des bactéries inoculées dans ce modèle de biofilm au moyen de la PCR quantitative.

PARTIE I : ÉTAT DES CONNAISSANCES

I. L'écosystème buccal

Chez l'Homme, la cavité buccale représente un écosystème unique et complexe. On y retrouve une flore diversifiée contenant des champignons, des levures, des mycoplasmes, des parasites eucaryotes, des virus et plus de 700 espèces bactériennes. Les bactéries sont nombreuses et six milliards de ces micro-organismes seraient produits en 1 ou 2 heures dans la bouche de chaque individu (1). Il s'agit de l'un des sites les plus septiques de l'organisme. Ce microbiote est plus communément associé au sein d'un biofilm.

1. Qu'est-ce qu'un biofilm bactérien

La bactérie est une cellule autonome, capable de se multiplier dans un environnement adapté. Sa forme et sa taille diffèrent d'une espèce à l'autre. Toutefois, au sein d'une même espèce, les cellules sont relativement semblables. Elles peuvent être de forme sphérique (coques ou cocci) ou bacillaire, coccobacillaire, incurvée, spiralée ou encore filamenteuse. La taille moyenne d'une bactérie se situe entre 1 et 10 microns (1).

Il s'agit d'un micro-organisme ubiquiste, unicellulaire et sans noyau (procaryote) qui existe selon deux modes de vie (2). Lorsqu'elle vit en flottaison libre dans un milieu liquide, elle est dite planctonique. A l'inverse, elle peut former un consortium, le biofilm bactérien, afin d'augmenter ses chances de survie. Ce développement au sein d'une communauté microbienne est le cas pour 99,9% des bactéries. Au cours de sa maturation, la bactérie passe de l'un à l'autre de ces deux modes de vie (3) (**Figure 1**).

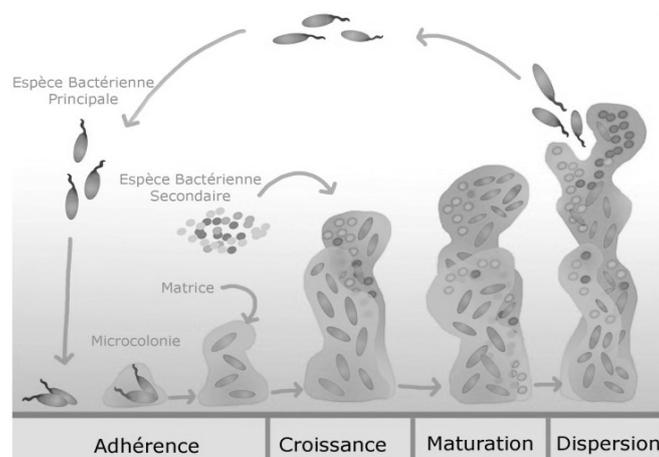


Figure 1 : Étapes de la formation et de la dispersion d'un biofilm bactérien (4)

Le biofilm bactérien est généralement défini comme un agrégat de cellules bactériennes, d'une ou plusieurs espèces, liées entre elles, adhérant à une surface submergée ou soumise à un environnement aqueux. Ces bactéries sont caractérisées par la sécrétion d'une matrice protectrice de polymères exo-cellulaires, constituées de polysaccharides imbibés d'eau (peptidoglycanes, celluloses) (1,5). Cette matrice extracellulaire bactérienne constitue 85% du biofilm et les 15% restant correspondent à la fraction cellulaire.

Le biofilm se développe souvent de façon hétérogène, sous forme de micro-colonies discontinues, séparées par des espaces où circulent des liquides et des molécules (**Figure 2**). Lorsqu'il est organisé par des champs de forces et le plus souvent dans des conditions expérimentales, il peut se développer de manière homogène.

L'organisation du biofilm bactérien fut mise en évidence pour la première fois en 1976 par le scientifique Marshall (3).

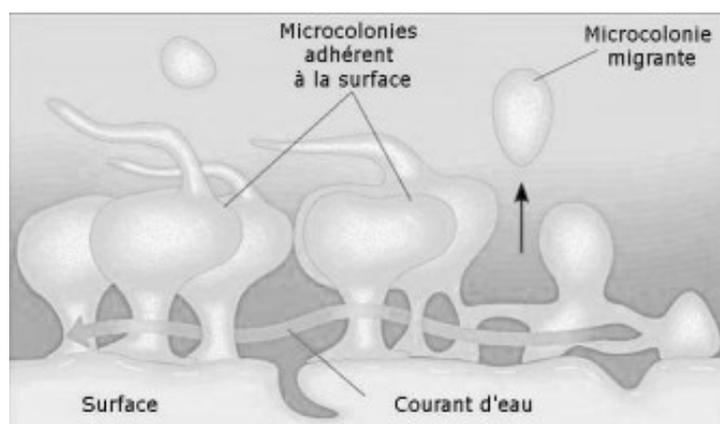


Figure 2 : Schématisation des micro-colonies bactériennes et des « espaces nutritifs » formant le biofilm bactérien

La biodiversité des micro-organismes et la capacité d'adhésion de certains d'entre eux font que toutes les surfaces sont susceptibles d'être colonisées quels que soient les environnements et les conditions physico-chimiques.

La capacité de former un biofilm est reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs micro-organismes. On estime d'ailleurs que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm (4). Au niveau de la sphère orale, on retrouve le biofilm dentaire.

2. Le biofilm dentaire

Le biofilm dentaire, autrement nommé plaque bactérienne ou plaque dentaire, est défini comme un dépôt mou, adhérent et plus ou moins coloré, souvent difficile à mettre en évidence à l'œil nu lorsqu'il n'est pas épais.

Le recours à des techniques de microscopie confocale à balayage laser a pu montrer que la plaque dentaire a une architecture aérée, ouverte, similaire à celle des biofilms provenant d'autres sites (6,7). Dans la cavité buccale, les surfaces dentaires et gingivales baignent continûment dans la salive et le fluide gingival, milieu humide et chaud qui permet la croissance d'une collection de micro-organismes, à l'origine de la formation du biofilm (8).

La plaque dentaire est capable de se fixer tant sur les surfaces dentaires que sur des éléments prothétiques, orthodontiques ou sur certaines obturations.

Il existe deux types de plaque dentaire, la plaque supra-gingivale et la plaque sous-gingivale.

Le biofilm dentaire fait encore aujourd'hui l'objet de nombreuses études car il est directement lié à la santé bucco-dentaire. En effet, c'est dans la plaque que se trouvent les micro-organismes responsables de la formation des caries et des parodontites (1).

2.1. Formation du biofilm dentaire

L'adhérence des bactéries sur une surface dentaire permet la formation d'une communauté organisée, intime, multi-espèces en biofilm.

Comme tout biofilm, le développement du biofilm dentaire est un processus dynamique qui peut être décomposé en plusieurs étapes successives (**Figure 3**) :

- 1) Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)
- 2) Colonisation bactérienne avec, dans un premier temps, fixation des bactéries pionnières
- 3) Maturation du biofilm
- 4) Détachement cellulaire (1,9,10)

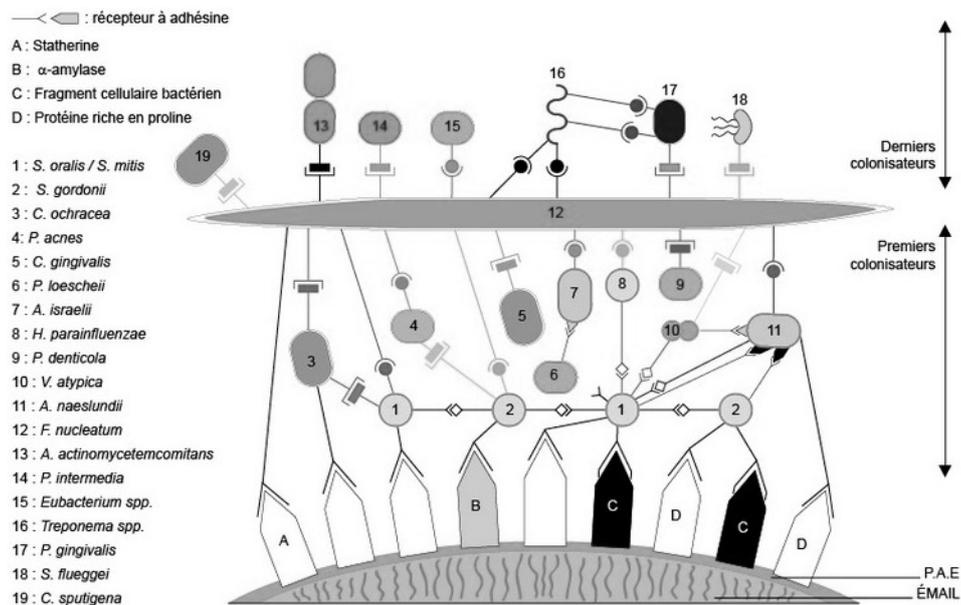


Figure 3 : Formation du biofilm dentaire (d'après Kolenbrander et London) (11)

➤ Première étape : Formation de la pellicule acquise exogène :

La PAE est un film protéique d'origine salivaire qui apparaît spontanément à la surface des dents quelques minutes après le brossage. Elle se forme par adsorption sélective de protéines et glycoprotéines salivaires qui se lient à l'hydroxyapatite de l'émail. Son épaisseur varie entre 0,1µm et 1µm.

Sa formation est une condition majeure dans la constitution du biofilm dentaire car elle permet la fixation des bactéries pionnières, étape initiale dans son développement.

➤ Deuxième étape : Colonisation bactérienne :

La phase initiale de colonisation débute par l'adhérence de bactéries pionnières sur la PAE. Seul un nombre restreint de bactéries à la capacité de s'y attacher directement, essentiellement les Streptocoques du groupe *mitis* (*Streptococcus sanguis*, *gordonii*, *oralis* et *mitis*) et *Actinomyces naeslundii*. En effet, ces bactéries présentent des molécules adhésives à leur surface ou ligands (adhésines) leur permettant de se fixer spécifiquement à des récepteurs de la PAE. Elles sont indispensables à la fixation ultérieure d'autres espèces bactériennes.

➤ Troisième étape : Maturation du biofilm :

La multiplication des bactéries pionnières entraîne une confluence des micro-colonies et les adhésines exprimées à leur surface permettent la fixation de nouvelles espèces bactériennes. On parle de « co-adhésion cellulaire ». Ainsi, la co-adhérence de nouvelles espèces et leur multiplication concourent à la diversité du biofilm et à son accroissement en taille et en volume. Cela constitue l'étape de maturation. La co-adhérence correspond à la liaison entre une bactérie

libre et une bactérie déjà fixée et résulte d'une interaction spécifique de type ligand-récepteur. C'est par ce mécanisme que le biofilm dentaire se développe. Elle met en jeu soit l'adhésion d'une bactérie planctonique individualisée ou l'adhésion d'un agrégat formé de plusieurs espèces bactériennes (co-agrégats cellulaires). Par ailleurs, les bactéries adhérentes au biofilm vont synthétiser des polymères extracellulaires, qui contribuent à la formation de la matrice extracellulaire du biofilm dentaire, à l'adhésion bactérienne et donc à son épaissement.

Au fur et à mesure que le nombre de couche augmente, les conditions environnementales changent : modifications du gradient d'oxygène, du pH, de substrats. Ainsi, après plusieurs heures, la diminution du taux d'oxygène permet notamment le développement d'espèces anaérobies à Gram négatif appelées aussi colonisateurs secondaires tardifs : *Fusobacterium*, *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Treponema*, etc, ...

On observe également lors de la maturation un changement au niveau de la structure et de l'architecture du biofilm notamment avec la présence de canaux internes. Ils constituent l'axe d'acheminement de nutriments et l'évacuation des produits de dégradation. De plus, à ce stade des mécanismes de communication cellulaires se mettent en place.

➤ Quatrième étape : Détachement cellulaire :

Les conditions physico-chimiques environnementales vont amener certaines bactéries à se détacher du biofilm. En effet, le nombre croissant de bactéries et la dégradation enzymatique induisent un appauvrissement des ressources nutritives, qui favorise la dispersion de quelques bactéries du biofilm. Ces bactéries peuvent retourner à l'état planctonique et coloniser de nouvelles surfaces, ou être dégluties.

Le biofilm dentaire se développe préférentiellement sur les surfaces protégées des frictions mécaniques (1).

2.2. Composition du biofilm dentaire

Le biofilm dentaire consiste en une communauté microbienne organisée dans une matrice extracellulaire complexe composée de produits extracellulaires microbiens et de composants salivaires.

➤ La matrice extracellulaire :

La synthèse de la matrice extracellulaire résulte des modifications phénotypiques des bactéries colonisatrices primaires déclenchées par l'adhésion de ces dernières à la PAE.

Cette matrice permet notamment l'agrégation des bactéries colonisatrices secondaires et la

cohésion du biofilm. Elle inclut tous les éléments du biofilm autres que les micro-organismes. Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97%), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides (12).

➤ Les bactéries :

On dénombre au sein du biofilm dentaire environ 100 millions de bactéries par milligrammes de plaque. Certaines bactéries de ce biofilm, approximativement 50%, n'ont pas encore pu être cultivées et classifiées. Elles restent donc non identifiées, bien que l'on connaisse leur présence par des techniques modernes de biologie moléculaire (13,14).

Les principaux genres bactériens retrouvés au sein du biofilm dentaire sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Principaux genres bactériens présents dans la plaque dentaire, inspiré de Chardin H. *et al*, 2006 (1)

Cocci	Bacilles	
- <i>Neisseria</i>	- <i>Actinobacillus</i>	- <i>Klebsiella</i>
- <i>Peptococcus</i>	- <i>Actinomyces</i>	- <i>Lactobacillus</i>
- <i>Peptostreptococcus</i>	- <i>Bacteroides</i>	- <i>Leptotrichia</i>
- <i>Streptococcus</i>	- <i>Bifidobacterium</i>	- <i>Porphyromonas</i>
- <i>Veillonella</i>	- <i>Campylobacter</i>	- <i>Propionibacterium</i>
	- <i>Capnocytophaga</i>	- <i>Pseudomonas</i>
	- <i>Corynebacterium</i>	- <i>Rothia</i>
	- <i>Eubacterium</i>	- <i>Selenomonas</i>
	- <i>Fusobacterium</i>	- <i>Treponema</i>
	- <i>Haemophilus</i>	

Les espèces bactériennes présentes au sein du biofilm dentaire sont capables de co-agrégation, c'est-à-dire qu'elles forment avec une ou plusieurs espèces de bactéries des agrégats hétérogènes dénommés complexes ou clusters (Socransky *et al.*, 1998-1999) (15). Un équilibre écologique stable s'établit au fur et à mesure dans ces complexes et parmi les bactéries impliquées on différencie les complexes très pathogènes et les complexes peu pathogènes.

La composition microbienne de ce biofilm varie dans le temps et selon les sites (1).

II. Modèles expérimentaux de biofilms

1. Généralités

Les premières études menées par Henrichi au début du XX^{ème} siècle (16) et plus tard, par Costerton *et al.* (17,18), ont mis en évidence l'existence de populations microbiennes vivant sur des surfaces dans des milieux aquatiques (3). De nos jours, il est admis que, dans la plupart des environnements, les bactéries peuvent passer d'un état libre à un mode de vie sessile, formant un biofilm ayant des propriétés spécifiques. Hoiby, Costerton *et al.* ont été les premiers à suspecter une corrélation entre la croissance des bactéries établies en communauté et la persistance d'infections, notamment chez les patients atteints de fibrose kystique (ou mucoviscidose), dont les poumons sont colonisés par *Pseudomonas aeruginosa* (19,20). Depuis lors, la corrélation entre infections bactériennes et formation des biofilms est reconnue (65% des infections bactériennes sont due aux biofilms).

À partir de là, des modèles simplifiés de biofilms ont été développés, avec pour objectif d'étudier de quelle façon les bactéries, en incluant les pathogènes, forment des biofilms.

De nombreux modèles *in vitro* sont nés de la créativité des scientifiques, chacun d'eux étant spécialement adapté pour observer la formation de biofilm de bactéries spécifiques et dans des environnements spécifiques. Le succès de ces modèles et leurs limites, notamment leur incapacité à reproduire l'environnement de l'hôte, ont conduit à un développement rapide de multiples modèles *in vivo*, allant de modèles de substitution non-mammifères permettant une analyse à haut débit à des modèles plus sophistiqués faisant appel à des rongeurs ou d'autres animaux, plus nobles. À cause de considérations éthiques, le recours à des modèles mammifères *in vivo* a été rapidement limité par des réglementations légales, notamment la règle des 3 R élaborée en 1959 visant à la protection animale, impliquant l'évaluation des bénéfices scientifiques et médicaux des recherches, mais aussi prenant en compte le bien-être animal. Cela explique partiellement pourquoi les modèles non-mammifères de *substitution in vitro* et *in vivo* restent encore largement utilisés et continuent de se révéler d'une grande aide par rapport à la physiologie du biofilm (21).

➤ **Modèles de biofilms *in vitro***

Des modèles *in vitro* simplifiés ont permis d'approfondir les connaissances concernant la formation, la physiologie et l'architecture du biofilm. Ces modèles simplifiés offrent un certain nombre d'avantages tels qu'un faible coût et une mise en place aisée (22).

Les différents modèles de biofilms *in vitro* peuvent être classés en trois groupes distincts :

- Les modèles fermés ou statiques, dans lesquels il existe des nutriments et une aération limités. Cela inclut certains des modèles les plus populaires et les plus réussis, tels que les colonies de bactéries et les modèles de culture en plaques de microtitrage (23). De plus, ces modèles permettent une quantification rapide et directe de la masse du biofilm (via des colorants tels le cristal violet, la safranine ou le rouge Congo) ou des cellules vivantes (mesure de la viabilité par colorimétrie avec des sels de tétrazolium au moyen des tests MTT, XTT ou MTS).
- Les modèles ouverts ou dynamiques, dont le principe est celui des cultures continues, dans lesquelles la culture « usée », contenant des déchets, des sous-produits métaboliques, des cellules dispersées et mortes, est constamment remplacée par du milieu frais. Ils permettent généralement le contrôle de paramètres environnementaux tels que les forces de cisaillement, et ont donc été largement utilisées pour étudier la résistance physique et chimique des biofilms. Cependant, ils sont dans la plupart des cas moins adaptés à l'analyse à haut débit et exigent souvent des équipements spécialisés et des compétences techniques (24).
- Les microcosmes sont des modèles plus sophistiqués qui visent à imiter les conditions *in situ*. Ils incluent souvent plusieurs espèces bactériennes et utilisent du matériel provenant de l'environnement étudié, par exemple, l'addition d'hydroxyapatite et de salive pour les modèles de biofilms dentaires (25). Théoriquement, les systèmes ouverts et fermés pourraient être transformés en microcosmes. Ils comprennent plus de paramètres environnementaux et tiennent compte de la complexité et de l'hétérogénéité des paramètres naturels.

Bien que, souvent considérés comme trop simplistes, les modèles *in vitro* ont largement contribué à la connaissance actuelle de la physiologie du biofilm. Ils sont encore largement utilisés pour étudier le rôle des différents gènes impliqués dans les processus de formation et de régulation du biofilm, ainsi que pour d'autres applications, telles que l'affichage de bibliothèques d'agents antimicrobiens. Néanmoins, ces modèles ignorent certains paramètres importants, notamment lorsqu'ils caractérisent les biofilms pathogènes, ils ne prennent pas en compte les facteurs de l'hôte et d'autres signaux biotiques.

Tableau 2 : Liste non exhaustive de biofilms *in vitro* les plus couramment employés (21)

Modèles	Caractéristiques	Avantages
Systèmes fermés ou statiques		
Colonies bactériennes	<ul style="list-style-type: none"> - Les colonies sont cultivées sur gélose (agar) - Maintien des caractéristiques du biofilm (environnement structuré, gradients chimiques) 	<ul style="list-style-type: none"> - Reproductibles et simples - Dépistage à haut débit
Plaques de microtitrage	<ul style="list-style-type: none"> - Couramment utilisées - Les bactéries s'attachent aux surfaces des puits 	<ul style="list-style-type: none"> - Simples à mettre en œuvre - Dépistage à haut débit - Adaptées aux tests génétiques moléculaires
« Calgary Biofilm Device », désormais appelé « MBEC Assay » (MBEC : <i>minimal biofilm eradication concentration</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Basé sur des plaques de microtitrage 96 puits - Comprend un couvercle avec 96 chevilles sur lesquelles se développent les biofilms 	<ul style="list-style-type: none"> - Système disponible commercialement - Les chevilles peuvent être retirées individuellement sans ouvrir l'ensemble du système, évitant ainsi les contaminations - Force de cisaillement constante sur toutes les chevilles
Systèmes ouverts ou dynamiques		
Système Kadouri	<ul style="list-style-type: none"> - Basé sur le principe de plaques de microtitrage mais avec un renouvellement constant des milieux - Force de cisaillement minimale 	<ul style="list-style-type: none"> - Formation de biofilms matures dans les puits d'une plaque de microtitrage, ce qui constitue une grande quantité de biomasse qui peut être utilisée plus tard pour les puces à ADN et la protéomique
Cuve à flux continu (ou <i>flow cell</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - Chambres transparentes à parois plates irriguées par des milieux de culture sous microscope - Des coûts et une expertise sont à envisager - Le système est automatisé et disponible pour l'analyse d'image 	<ul style="list-style-type: none"> - Permet une observation non-destructive en temps réel du biofilm (permet la visualisation d'une seule cellule) - Excellente qualité d'image
Microcosmes		
Modèle de biofilm « zurichois »	<ul style="list-style-type: none"> - Forme de biofilms sur hydroxyapatite disposée dans des plaques de microtitrage à 24 puits 	<ul style="list-style-type: none"> - Peut étudier la dynamique, la résistance aux antibiotiques et la tolérance de la population en même temps - Débit semi-élevé
Epithélium humain reconstitué	<ul style="list-style-type: none"> - Les biofilms se forment sur les kératinocytes humains dérivés de la muqueuse buccale. 	<ul style="list-style-type: none"> - Prend en compte certains facteurs de l'hôte, par exemple la spécificité des récepteurs.
Dispositif Sorbarod multiple	<ul style="list-style-type: none"> - Dérive du système Sorbarod 	<ul style="list-style-type: none"> - Permet de multiples répliques

➤ Modèles de biofilms *ex vivo*

À mi-chemin entre les modèles *in vitro* et *in vivo*, les modèles *ex vivo* sont des modèles dans lesquels les tissus ou les organes sont extraits d'un organisme (généralement porcine ou murin) et sont placés dans un environnement artificiel pour des analyses et des expérimentations. Souvent négligés, ils permettent des conditions expérimentales plus contrôlées que les modèles *in vivo* et peuvent fournir une alternative à l'usage d'organismes vivants afin d'effectuer des expérimentations éthiquement discutables. Ils peuvent être particulièrement utiles pour analyser le déroulement de la colonisation bactérienne d'un organe ou d'un tissu donné, comme par exemple les dents (21).

Un modèle de biofilm *ex vivo* est présenté ci-dessous (*Figure 4*).

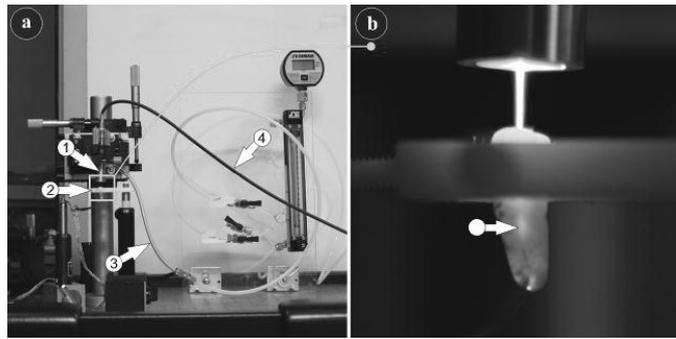


Figure 4 : Exemple de modèle de biofilm ex vivo sur un odonte (26)

Image a : échchantillon dentaire (flèche 1), mainteneur (flèche 2), tube à gaz (flèche 3), câble d'alimentation (flèche 4) ; Image b : échchantillon dentaire

➤ Modèles de biofilms in vivo non-mammifères

L'infection et la pathogénèse sont liées à une interaction continue entre l'hôte et les microbes et entre les microbes eux-mêmes. Ces interactions sont complexes et dynamiques, ce qui rend difficile leur étude de manière pertinente dans les modèles *in vitro*.

Les modèles *in vitro* offrent une vision simplifiée de l'environnement mais pour valider les résultats, il est important d'utiliser des modèles *in vivo* (21).

2. État des recherches en microbiologie orale : les modèles de biofilms oraux

La plupart des connaissances sur la physiologie et l'écologie des biofilms proviennent d'expérimentations faisant appel à des modèles de biofilms *in vitro*. De tels modèles peuvent être utilisés dans le but de reproduire des conditions environnementales au sein du laboratoire ou pour étudier plus spécifiquement certaines variables tels le taux de croissance ou le flux fluide.

Les microbiologistes ont travaillé sur le biofilm dentaire depuis des décennies. Afin de pouvoir les étudier autrement que dans l'environnement naturel (*in situ*) ou en les récoltant intacts pour les étudier au laboratoire (*ex situ*), les recherches ont nécessité le développement de modèles *in vitro* et *in vivo*. Toutefois, durant des années, l'écosystème buccal a été traité selon une approche réductionniste, les travaux se limitant à l'étude de chaque espèce de façon individuelle. Cette approche n'a pas permis de savoir comment les bactéries pouvaient s'établir en biofilm (27).

Le développement et la validation de modèles expérimentaux de biofilms dentaires pratiques, reproductibles et représentatifs s'est avéré essentiel. Cela a été un challenge que des esprits créatifs ont bien voulu relevé.

Si les colonies poussant sur boîtes ou la pellicule se formant à l'interface air-liquide constituent des biofilms (**Figure 5**), les chercheurs ont mis au point des moyens d'étude nettement plus sophistiqués afin de pouvoir étudier plus finement les étapes de la formation du biofilm et sa structure.

Les modèles de biofilm peuvent être classés en système fermé et système ouvert.

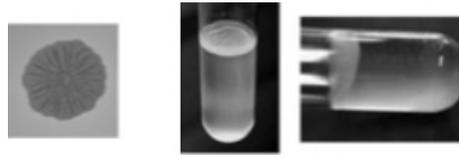


Figure 5 : Colonie sur boîte et biofilm à l'interface air-liquide

2.1. Le système fermé

Les modèles de culture microbienne dans le système fermé sont des modèles statiques. Il s'agit de modèles de culture discontinue. Ils ont un apport limité en nutriments. Le taux de croissance du biofilm est rapide au début de la mise en culture, lorsqu'il y a une quantité importante de nutriments. Cependant, ceci n'est pas commun dans la croissance naturelle du biofilm (22,24). En effet, *in vivo*, les conditions de croissance changent considérablement. Ainsi, les propriétés physiologiques et biologiques des biofilms formés en système fermé ne sont pas comparables avec celles de la cavité buccale.

Les microbiologistes ont utilisé ce type de modèles du fait de la simplicité, de la grande productivité, de la reproductibilité et de la contrôlabilité des conditions expérimentales. La culture sur gélose et le modèle en plaques de microtitrage sont les deux exemples de modèles de culture microbienne couramment utilisés en système fermé.

➤ La culture sur gélose

La culture sur gélose (*agar plate*) est l'un des modèles de culture microbienne les plus simples au laboratoire (**Figure 6**) (28). L'apport en nutriment n'est pas continu. La croissance bactérienne à la surface de la gélose ne peut se faire que jusqu'à ce que la totalité des nutriments soit épuisée. Donc, les résultats des études utilisant ce modèle simpliste doivent être interprétés avec précaution. La situation avec les géloses est différente de la croissance bactérienne à la surface des tissus durs car dans ce cas, le biofilm consomme les nutriments provenant du substrat.

Ce modèle a été utilisé afin de tester la sensibilité du biofilm oral à divers antimicrobiens.



Figure 6 : Gélose

➤ Le modèle de culture en lot (culture en batch ou « *batch biofilm model* »)

Le modèle de culture en lot se présente sous la forme de plaques de microtitrage multipuits (qui sont utilisés comme de petits tubes). Les microplaques sont généralement en polystyrène.

De nombreux laboratoires utilisent les modèles statiques, en microplaques multipuits, pour étudier les étapes précoces de la formation des biofilms. Cette formation est visualisée par une coloration au Cristal violet du biofilm sur les parois (**Figure 7**).

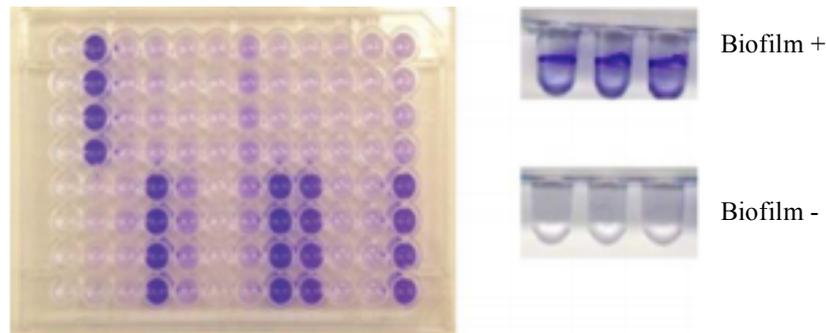


Figure 7 : Microplaques : modèle de culture de biofilm en condition statique et visualisé par coloration au cristal violet

Ce modèle est utilisé de sorte que les conditions environnementales changent pendant l'essai car les nutriments sont consommés et les produits métaboliques s'accumulent à moins que les milieux de croissance ne soient remplacés.

Contrairement à la cavité buccale, il n'y a pas de flux de fluides et de nutriments avec ces modèles, bien que certains modèles créent une force de cisaillement liquide en baignant les biofilms dans une solution saline ou un autre liquide pendant leur formation.

Cependant, les modèles de lots offrent des moyens de comparer simultanément plusieurs composés ou conditions d'essai ; ils nécessitent seulement de petites quantités de réactifs et sont pratiques, reproductibles et économiques à utiliser (24).

La microplaque est un outil standard dans les recherches en cariologie. Elle permet la croissance des biofilms de façon indépendante dans chaque puit.

L'un des modèles de biofilm en lot les plus utilisés est le modèle de biofilm de Zurich. Il a été développé par Guggenheim *et al.* Il s'agit d'un modèle de biofilm pluri-espèces basé sur une culture en lot (en « *batch* » ou discontinue) et non sur un système de culture continue permettant l'étude des interactions au sein d'une communauté bactérienne.

En 2001, Guggenheim a imaginé un modèle de biofilm *in vitro* pour l'étude de la plaque supra-gingivale. Les cinq espèces étudiées étaient les suivantes : *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeshlundii* et *Veillonella dispar*. Les biofilms ont été cultivés sur des

disques frittés d'hydroxyapatite, représentant la surface dentaire. Afin de permettre la formation d'une pellicule salivaire, chaque disque a été placé dans le puit d'une plaque stérile de culture cellulaire de 24 puits en polystyrène et incubé avec de la salive humaine pasteurisée (pendant 4 heures et à température ambiante). La salive a été aspirée de chaque puit et remplacée par un mélange de salive et de FUM (*Fluid Universal Medium*) enrichi, et les espèces bactériennes étudiées y ont également été placées. La plaque de culture cellulaire a été incubée à 37°C durant 30 minutes, 16,5 heures, 40,5 heures ou 64,5 heures. Le milieu a été renouvelé à 16,5 heures, puis à 24 heures, soit une fois pour les biofilms incubés durant 40,5 heures et 2 fois pour ceux incubés 64,5 heures (29).

En 2004, Guggenheim a, de nouveau, utilisé ce modèle. Afin de générer la formation de biofilms, des micro-organismes retrouvés dans la plaque supra-gingivale ont été utilisés : des streptocoques avec *Streptococcus oralis* et *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum* et enfin *Candida albicans*. Les biofilms se forment sur des disques d'hydroxyapatite ou d'émail bovin, préalablement placés dans de la salive non-stimulée. Les disques sont introduits dans les puits d'une microplaque stérile en comportant 24, contenant de la salive et du milieu. Le tout est incubé en anaérobiose à 37°C.

Une procédure expérimentale, y compris la phase préopératoire, dure cinq jours (**Figure 8**).

Dans ce système, les forces de cisaillement sont absentes. Les disques sont donc plongés dans une solution saline 3 fois par jour. Cette procédure engendre des forces de cisaillement.

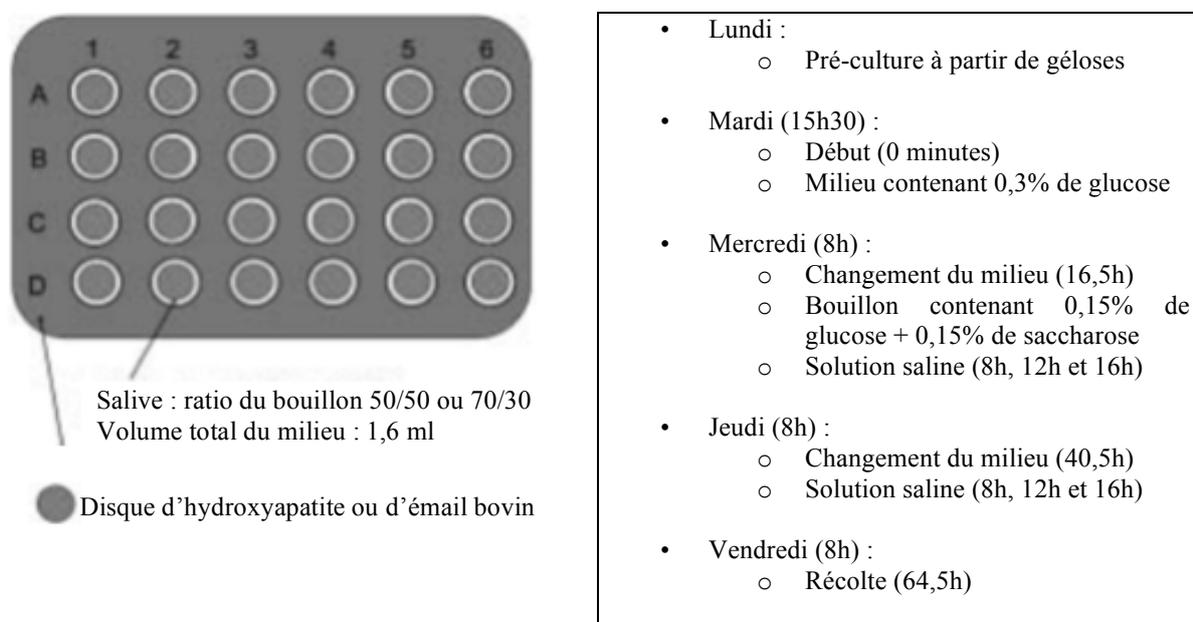


Figure 8 : Schéma résumant le déroulement de la procédure expérimentale utilisée pour étudier la formation des biofilms selon le modèle de biofilm de Zurich (30)

Le dispositif de biofilm de Calgary (*Calgary Biofilm Device*), développé en 1999, est un système de plaque à 96 puits utilisant des couvercles avec 96 chevilles pour la formation de biofilm (31). Ce modèle permet de tester rapidement la sensibilité aux antibiotiques dans un modèle de biofilm, avec ou sans agitation (29).

2.2. Le système ouvert

Le système ouvert peut être décrit comme un système de culture continue. Ce modèle permet l'apport de milieu de culture frais et le retrait des métabolites et du milieu de culture utilisé simultanément. De ce fait, la concentration de bactéries et de produits métaboliques reste constante. De plus, les biofilms peuvent rester dans un état stable ou maintenir un équilibre dynamique. Néanmoins, la répétabilité est faible à cause de l'hétérogénéité du biofilm dans le système ouvert. En outre, la possibilité de contamination peut être élevée en raison de la complexité de mise en œuvre (32).

Le système ouvert simule mieux l'environnement *in vivo* que le système fermé. Il permet également une meilleure régulation du taux de croissance du biofilm et d'autres variables. Les modèles courants de culture microbienne incluent le modèle du chémostat, le modèle de chambre à flux continu, les micro-fermenteurs avec le *constant depth film fermenter model*, le réacteur *drip-flow*, le modèle de multiple *Sorbarod* et le modèle de bouche artificielle.

➤ Le modèle du chémostat

Le chémostat est un modèle utilisé pour les expérimentations sur le biofilm, du fait de la culture continue qui assure l'homogénéité ainsi qu'un environnement stable (**Figure 9**). Les paramètres expérimentaux peuvent être examinés indépendamment.

Les bactéries orales croissent de façon planctonique dans un chémostat conventionnel. Un milieu de culture frais est fourni et les déchets métaboliques liquides sont éliminés, en proportion équivalente.

Dans ce type de modèle, les bactéries planctoniques ont tendance à former des biofilms à l'interface solide-liquide. Un substrat, comme une « tranche » de dent, peut y être placé, en suspension, afin de fournir une surface à la colonisation bactérienne et à la formation du biofilm. Il est généralement onéreux et prend beaucoup de place dans un laboratoire.

Des précautions doivent être prises afin de prévenir une croissance bactérienne excessive dans le chémostat, pouvant causer une obstruction des tubes (33).

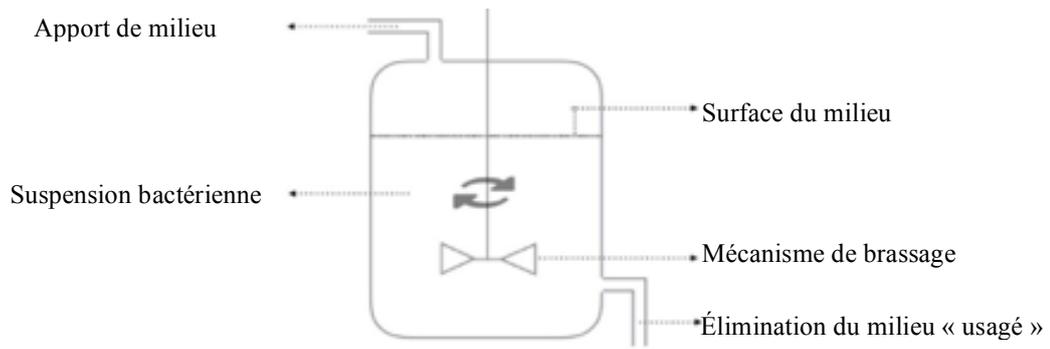


Figure 9 : Représentation schématique d'un chémostat

➤ Le modèle de chambre à flux continu

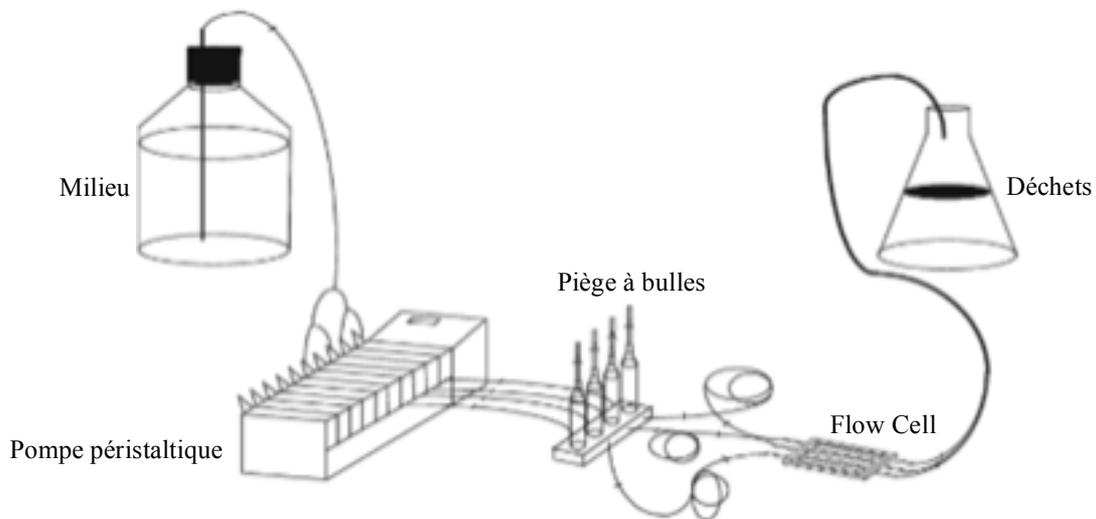
Le modèle de chambre à flux continu (cuves à flux continu, *Flow Cell Chamber System* ou *Flow Cell*) (**Figure 10**) consiste en de petites chambres de perfusion qui permettent la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide en présence d'une force de cisaillement et d'un apport continu d'éléments nutritifs. Ce système est utilisé pour observer la croissance initiale et la physiologie de bactéries sessiles (34) et reproduit assez bien les conditions auxquelles sont exposés les biofilms dans leur environnement naturel.

Les biofilms peuvent se développer à la surface d'échantillons dentaires (blocs) (35), de lames de verres ou de tiges en verre recouvertes de salive (36).

Le système *Flow Cell* de base consiste en une chambre au sein de laquelle le biofilm va se développer. Du milieu frais est continuellement pompé et distribué à la chambre, permettant la croissance des bactéries sessiles et l'évacuation des bactéries planctoniques.

L'introduction de diverses protéines fluorescentes et de colorants, ainsi que les progrès des techniques de microscopie, permettent l'analyse de la distribution spatiale et de la croissance des bactéries en temps réel.

A)



B)

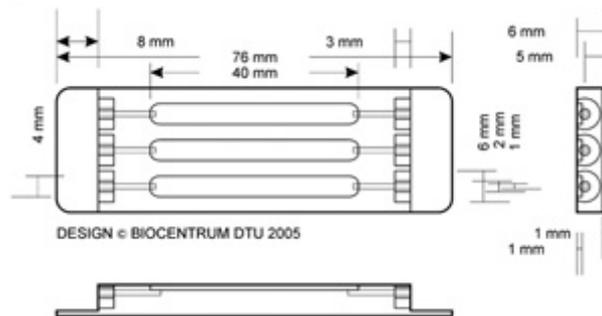


Figure 10 : A) Schéma du système dit en chambres à flux ou « flow-cell », B) Flow Cell

➤ Le Constant Depth Film Fermentor

Le fermenteur qu'est le *Constant Depth Film Fermentor* (CDFF) est un modèle de biofilm dynamique, particulièrement utile afin d'étudier les divers biofilms qui existent au sein de la cavité buccale. Il permet le contrôle de facteurs environnementaux tels le substrat, les sources de nutriments et le flux gazeux (37). L'épaisseur du biofilm peut être contrôlée. Les biofilms mono-espèces peuvent être étudiés, mais le principal avantage est de travailler avec des biofilms pluri-espèces mimant des conditions *in vivo* de façon la plus proche possible.

Le concept consiste en un cylindre en verre qui contient une plaque en acier inoxydable reliée à un moteur électrique qui permet la rotation de la plaque. Des ouvertures au sommet du cylindre permettent au gaz et au milieu d'entrer et de sortir. La température et le flux gazeux sont contrôlés et le milieu et la salive sont injectés par une pompe. Le *constant depth film fermentor* est un système complexe ne permettant de tester qu'une formule antimicrobienne à la fois et a donc été amélioré, et désormais deux traitements différents peuvent être appliqués en même temps (27).

Ce modèle a été utilisé pour étudier l'étiologie carieuse, évaluer l'effet antimicrobien de substances sur le biofilm et comprendre sa structure (38).

➤ **Le drip flow biofilm reactor**

Le modèle de *drip flow biofilm reactor* est souvent utilisé dans le but d'établir des biofilms à l'interface solide-liquide ou solide-air. Le modèle comprend généralement quatre chambres contenues dans un fermenteur incliné ajustable (**Figure 11**).

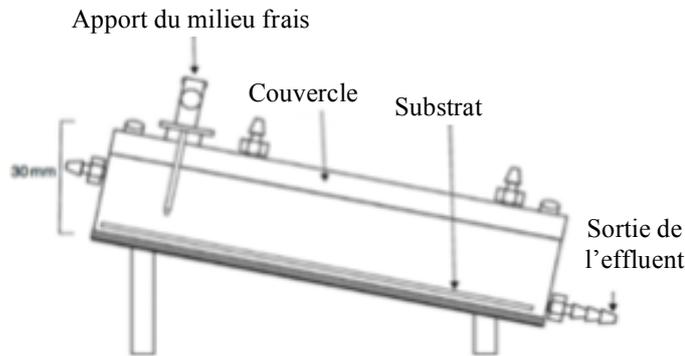


Figure 11 : Représentation schématique d'un drip flow biofilm reactor, adapté de McBain et al. (22)

L'inclinaison du fermenteur permet au milieu de s'écouler sur les surfaces dentaires recouvertes de biofilm avec de faibles forces de cisaillement pour le biofilm.

Le modèle permet la croissance de la plaque sur les surfaces dentaires et sa stabilisation, pour de plus longues périodes, ce qui permet un développement relativement stable des communautés microbiennes (39).

Ce modèle est disponible commercialement et est donc souvent utilisé par les chercheurs.

➤ **Le modèle de multiple Sorbarod**

Le modèle de multiple *Sorbarod* utilise une membrane *Sorbarod* perméable en tant que substrat. Le milieu frais est apporté par une perfusion continue à travers la membrane. Les bactéries planctoniques et les déchets métaboliques sont éliminés avec le milieu de culture usé. Dans ce modèle, le débit de milieu peut être contrôlé. Conséquemment, le taux de croissance du biofilm est contrôlable.

Il a été utilisé afin d'étudier l'effet des procédures d'hygiène orale sur les biofilms oraux anaérobies et pour évaluer les effets d'enzymes spécifiques sur la plaque.

Il développe un biofilm hétérogène. Il ne peut pas être utilisé dans les études pour lesquelles l'homogénéité du biofilm est importante (40).

➤ Le modèle de bouche artificielle

Depuis la fin du XIX^{ème} siècle, différents modèles de bouche artificielle ont été élaborés par des chercheurs du monde entier afin de comprendre ce qui se passe dans la bouche (41).

Initialement, le modèle de bouche artificielle utilisait un entonnoir cylindrique en verre, entonnoir qui a ensuite été remplacé par une chambre d'incubation en verre. Puis, le « *Column System* », utilisant des tubes en verre Pyrex, a vu le jour (42).

A partir de 1990, un modèle complexe de bouche artificielle a été développé, appelé « bouche artificielle multiplaque » (*multiple* ou *multiplaque artificial mouth*).

La bouche artificielle multiplaque est un modèle commandé par ordinateur et possédant des stations multiples. Il est de mise en œuvre plus complexe que l'ensemble des modèles suscités. Ce modèle peut précisément simuler un environnement *in vivo* grâce au contrôle par ordinateur (43). Il a différentes micro-stations, qui sont relativement indépendantes les unes des autres (**Figure 12**). Différentes conditions expérimentales peuvent être appliquées simultanément dans différentes micro-stations.

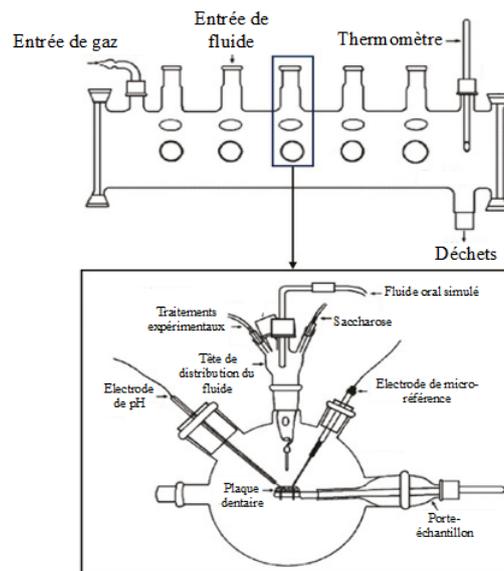


Figure 12 : Représentation schématique d'une bouche artificielle multiplaque, adapté de Sissons et al, 2000 (43)

Diverses variables environnementales peuvent être aisément contrôlées avec ce modèle. Il permet des analyses du biofilm durant son développement, sans risque de contaminer les autres échantillons. L'acidité peut être contrôlée. Le fait de contrôler ces conditions améliore la standardisation et la flexibilité de la bouche artificielle multiplaque, et par conséquent, accroît son aptitude à produire des biofilms similaires à la flore orale naturelle.

Ce modèle visant à imiter l'environnement buccal de façon la plus fidèlement possible, les substituts salivaires jouent un rôle très important.

III. Techniques d'identification bactérienne : Les méthodes de diagnostic microbiologique

Historiquement, l'identification et la classification des eubactéries se sont fondées sur des caractéristiques phénotypiques. Les premières techniques moléculaires utilisées dans la classification bactérienne étaient basées sur le taux de GC* ou l'étude du profil plasmidique.

Actuellement, deux applications moléculaires fondamentales sont grandement utilisées dans la détection et l'identification bactérienne. Elles se basent sur l'hybridation et le séquençage nucléotidique (44).

* Taux de GC : Le taux de GC d'une séquence d'ADN correspond au pourcentage de guanine (G) et de cytosine (C) que contient une molécule d'ADN. Ces deux bases azotées constituent font partie des constituants de l'ARN et de l'ADN.

1. Diagnostic conventionnel : Méthodes d'identification phénotypiques

L'identification phénotypique repose sur des méthodes traditionnelles de microbiologie, dites pasteurienne. L'identification et le dénombrement des micro-organismes se font sur des critères morphologiques ou de coloration, ou encore par des tests biochimiques après isolement et culture sur boîtes de Pétri ou en milieux liquides (45). La technique consiste en la comparaison de divers caractères phénotypiques de la souche à étudier vis à vis de ceux d'une souche de référence.

Cette identification utilise un faible nombre de caractères considérés comme importants. De fait, elle ne reflète qu'un nombre réduit d'informations, les caractères considérés comme importants étant subjectifs et dépendant des conditions environnementales.

1.1. L'examen direct

L'examen direct au microscope à contraste de phase permet d'observer les espèces mobiles (*Campylobacter*, *Selenomonas*, *Treponema*, etc ...) et permet également d'apprécier la forme végétative des micro-organismes (3).

1.2. L'examen après coloration

L'examen après coloration permet d'observer des bactéries tuées fixées sur une lame et ayant subi l'action d'un ou plusieurs colorants.

Les colorations, réalisées sur des frottis secs et fixes, sont classées en :

- Coloration simple, avec un unique colorant. La coloration au bleu de méthylène apporte des informations concernant l'agencement et la morphologie des germes ;

- Coloration différentielle de Gram (*cf. Annexe 2*) ;
- Coloration spéciale des structures bactériennes (capsules, spores, ...) (46).

La coloration différentielle de Gram est la coloration de référence en bactériologie pour l'identification bactérienne. Toutefois, cet examen ne permet pas l'obtention de données précises quant à l'espèce ou au genre bactérien. La coloration de Gram ne donne qu'un faisceau de présomption d'identification (caractérisation des bactéries par leur morphologie, le Gram positif ou négatif et leur disposition spatiale).

1.3. Identification après mise en culture

L'intérêt de la culture bactérienne porte sur le développement de la bactérie et son isolement (obtention d'une culture pure pour les tests phénotypiques), ses caractéristiques culturelles ... Cela nécessite de regrouper des conditions d'atmosphère (aérobie, anaérobie, enrichi en CO₂), de température et de culture favorable au développement microbien.

La flore orale est extrêmement diversifiée et chaque espèce présente des conditions de culture propres. Chez l'adulte sain, elle est composée de plusieurs centaines d'espèces bactériennes. On estime à près de 10%, le nombre de micro-organismes pouvant être régulièrement isolés en utilisant des méthodes de culture conventionnelles. En règle générale, l'identification des bactéries anaérobies est plus contraignante et peut demander un temps de culture de plusieurs jours.

Au laboratoire, l'inoculum estensemencé pur et/ou dilué. Six milieux permettent d'identifier les flores dominantes, ils seront choisis selon le genre à identifier :

- La gélose au sang en aérobiose permet la croissance des espèces aérobies ;
- La gélose au sang en anaérobiose permet la croissance des espèces anaérobies facultatifs ou stricts (streptocoques oraux, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, etc) ;
- La gélose au sang avec vancomycine et kanamycine en anaérobiose permet la sélection des bacilles Gram négatifs anaérobies stricts (*Porphyromonas*, *Fusobacterium*, etc) ;
- La gélose chocolat (sang cuit) sous 5% de CO₂ est utilisée pour les espèces microaérophiles (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, etc) ;
- La gélose à la bacitracine sous 5% de CO₂ est un milieu sélectif pour les bactéries du genre *Haemophilus* par exemple ;
- Le milieu « Actinobacillus » sous 5% de CO₂ est un milieu dépourvu de sang contenant du sérum de veau, de l'extrait de levure, de la vancomycine, de la bacitracine et de l'amphotéricine B. Il est notamment sélectif de l'espèce bactérienne *A. actinomycetemcomitans*.

Le prélèvement initial et les boîtes de culture pour les bactéries anaérobies doivent rester le moins longtemps possible à l'aire libre, soit environ 20 à 30 minutes. Les cultures anaérobies sont réalisées sous sachets scellés ou en jarre contenant un sachet générateur d'anaérobiose, ou encore en enceinte anaérobie reliée à une pompe ou à des bouteilles de gaz. Les boîtes en anaérobiose sont incubées durant 24 heures, et toutes les autres au moins 5 jours à 37°C. Le bactériologiste détermine les colonies prédominantes à ré-isoler pour identification (1,47).

Les techniques d'identification « après culture » :

➤ **Examen macroscopique : Analyse des caractères cultureux :**

L'aspect des colonies dépend du milieu de culture utilisé, de la durée ainsi que de la température d'incubation (47). Les milieux de culture contenant du sang permettent de mettre en évidence une éventuelle hémolyse.

➤ **Examen microscopique des bactéries : Analyse morphologique :**

L'examen microscopique se fait par l'étude des bactéries isolées d'un prélèvement. Un frottis est réalisé à partir de la culture bactérienne, coloré au Gram et examiné au microscope (1).

➤ **Etude des caractères biochimiques :**

Les caractères biochimiques sont détectés par diverses techniques commerciales (galeries API, systèmes Vitek, Phoenix, Biolog...). L'identification repose sur l'utilisation de galeries d'identification. Elles permettent une identification rapide des bactéries (47).

Parmi l'ensemble de ces systèmes, la galerie API (*analytical profile index*) est couramment utilisée. Elle se présente sous forme de cupules prêtes à l'emploi contenant les substrats lyophilisés nécessaires aux différents tests biochimiques. Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles de la micro-galerie, les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs. Elles ont l'avantage de standardiser les caractères biochimiques recherchés. Elles limitent la variabilité technique et permettent l'identification d'une centaine de bacilles à Gram négatif (48).

1.4. Les limites de l'identification phénotypique

Les méthodes d'identification conventionnelles présentent des limites. Elles permettent de différencier les espèces mais elles sont lentes, nécessitent suffisamment de cultures et un certain nombre de variantes échappent à la classification car elles ne présentent pas tous les caractères de

l'espèce type. Certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement pour diverses raisons. En effet, certaines expriment peu de caractères phénotypiques. Pour d'autres espèces, une situation de stress peut avoir altéré ces caractères. Une identification basée exclusivement sur le phénotype bactérien peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, les bactéries rares ne sont pas répertoriées dans les bases de données des systèmes commercialisés et en conséquence, les techniques d'identification conventionnelles ne permettront pas de les identifier. Enfin, pour certaines bactéries à croissance difficile, les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification (49).

2. Diagnostic moléculaire : Méthodes d'identification protéomiques et génotypiques

L'identification des bactéries, isolées à partir de prélèvements biologiques a été basée, pendant des années, uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Le développement et l'utilisation des techniques de biologie moléculaire ont révolutionné toutes les disciplines biologiques au XX^{ème} siècle et ont permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyse biologique. Le microbiologiste peut se tourner vers ces méthodes d'identification pour deux applications principales. La première correspond à l'identification de bactéries isolées en culture mais dont l'identification par les méthodes conventionnelles est difficile. La seconde correspond à l'utilisation de la technique directement sur des prélèvements cliniques.

Ces techniques permettent de caractériser les micro-organismes d'un échantillon, qu'ils soient cultivables ou non, dans leur environnement naturel. Les méthodes moléculaires peuvent s'affranchir de la mise en culture (50). Certaines applications de biologie moléculaire, dans un souci de spécificité, nécessitent une étape préliminaire d'extraction d'ADN.

Les techniques de biologie moléculaire peuvent également permettre de détecter et d'identifier les supports moléculaires des résistances aux antibiotiques et des facteurs de virulence (51).

L'identification bactérienne moléculaire peut se faire par méthodes protéomique ou génotypique.

2.1. Méthodes d'identification protéomiques

La protéomique consiste à étudier (identifier, caractériser et quantifier) l'ensemble des protéines d'un organisme, d'un fluide biologique, d'un organe, d'une cellule ou même d'un compartiment cellulaire. Cet ensemble de protéines est nommé « protéome ». La bactérie possède un protéome. Elle est constituée à 55% de protéines.

L'analyse protéomique se compose de trois étapes :

- 1) Séparation des protéines contenues dans l'échantillon biologique étudié par électrophorèse bidimensionnelle (E-2D) ;
- 2) Traitement et mise en image de la séparation protéique permettant l'établissement d'une carte protéique ;
- 3) Spectrométrie de masse, notamment la technique MALDI-TOF.

2.2. Méthodes d'identification génomiques

Chaque espèce possède dans son génome au moins une séquence d'acides nucléiques (ADN ou ARN) qui lui est propre et qui la distingue des autres espèces. Le diagnostic moléculaire fait appel à des techniques fondées sur l'étude, la détection et la modification de ces séquences. En microbiologie, ces techniques permettent d'étudier, de classer et d'identifier les micro-organismes. Ainsi, dans le cadre du diagnostic microbiologique, on peut rapidement et simultanément détecter, identifier, voire quantifier les bactéries en s'affranchissant des techniques conventionnelles. De plus, contrairement aux méthodes de culture, il n'est pas nécessaire de préserver la vitalité cellulaire en biologie moléculaire.

Les techniques moléculaires ont un bénéfice clinique lié à un gain de sensibilité, de spécificité, de temps et une détection d'organismes morts ou difficilement cultivables (1).

2.2.1. La technique d'électrophorèse des acides nucléiques sur gel

L'électrophorèse sur gel consiste en la séparation des macromolécules (acides nucléiques et également protéines) en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques. Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique (52). La technique se fait sur gel d'agarose ou de polyacrylamide.

L'électrophorèse des acides nucléiques sur gel est une technique de base au laboratoire de biologie moléculaire. Elle peut être utilisée :

- Soit à des fins analytiques, dans le but de séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité ;
- Soit à des fins préparatives, afin de purifier un fragment d'ADN de taille connue.

La taille des fragments d'ADN qu'il est possible de séparer est comprise entre 0,2 et 50 kilobases. Ces derniers sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BEI). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 nanogrammes). La technique est très sensible ; elle est de plus rapide et simple à mettre en œuvre (52,53).

2.2.2. Les techniques d'hybridation (identification bactérienne avec sondes nucléiques)

Le principe des sondes nucléiques est de faire agir l'ADN ou l'ARN bactérien à identifier (la cible), avec une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique de la bactérie recherchée (la sonde). Cette technique repose sur le phénomène d'hybridation qui se produit entre ces deux séquences d'acides nucléiques et qui peut s'effectuer sur un support solide ou en milieu liquide. De plus, l'une de ces séquences est toujours marquée de manière radioactive, enzymatique ou chimique. De cette façon, lorsque l'hybridation entre la sonde et la cible se produit, un signal est émis par le complexe, et il peut être étudié. Cette méthode permet alors la détection et l'identification de la cible (54).

Il existe deux types d'hybridation : l'hybridation *in situ* et l'hybridation après transfert. L'hybridation *in situ* ou HIS est une technique qui permet de mettre en évidence et de localiser des séquences d'acides nucléiques dans les cellules ou les tissus par l'utilisation de sondes complémentaires. Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radioactifs ou par des produits non radioactifs fluorescents (hybridation *in situ* en fluorescence ou FISH, *fluorescent in situ hybridization*) ou non fluorescents (55). La technique offre également des informations sur la forme des bactéries, les regroupements inter-bactériens et leurs rapports avec les cellules hôtes (1).

L'hybridation après transfert comprend les techniques de *Southern* et *Northern blot* (transfert à partir d'un gel d'électrophorèse) (56), le *dot* et le *slot blot* (57) et les puces à ADN (47).

2.2.3. Les méthodes d'amplification génique

Afin d'améliorer la sensibilité des méthodes diagnostiques, des systèmes permettant d'amplifier le signal obtenu lors d'une hybridation moléculaire entre la cible et la sonde ont été développés. Ces méthodes mettent en œuvre soit l'amplification des sondes, soit l'amplification du signal (proprement dit), soit l'amplification de la cible (58).

➤ L'amplification des sondes

Elle permet d'obtenir un nombre de copies comparable à celui qui est obtenu par l'amplification des cibles. Il s'agit notamment la réaction de ligation en chaîne ou LCR, *Ligase Chain Reaction*, qui est une méthode permettant l'amplification d'une sonde complémentaire d'une cible ADN. Elle met en jeu deux couples de sondes spécifiques de la séquence nucléique à rechercher, et une enzyme de type ligase. Les deux sondes sont adjacentes sur le brin. Une ligase réalise une ligature entre les deux sondes en formant une liaison covalente. Il en résulte la formation d'un ADN

constitué des deux sondes, qui pourra servir de matrice dans les cycles suivants (59).

➤ **L'amplification du signal (proprement dit)**

La technique de l'ADN branché ou « *branched DNA* » (bDNA) permet l'amplification d'une ou plusieurs sondes hybridées à un acide nucléique cible. Elle est basée sur l'amplification du signal de détection.

L'acide nucléique, après avoir été libéré des particules virales, est hybridé à des sondes spécifiques de la cible qui sont ensuite immobilisées sur un support solide. Ces sondes s'hybrident à d'autres sondes, aboutissant à l'émission d'un signal quantifiable. Cette technique a été développée pour détecter et quantifier des ADN ou des ARN (60).

➤ **L'amplification de la cible**

Elle peut s'effectuer soit par des méthodes d'amplification *in vivo* utilisant des bactéries, le clonage, soit par des méthodes d'amplification *in vitro* par voie enzymatique, la *Polymerase Chain Reaction (PCR) ou réaction de polymérisation en chaîne / amplification en chaîne par polymérase, en français*.

Le clonage consiste à insérer une séquence, appelée insert, dans un vecteur (plasmide bactérien ou bactériophage) par des techniques de recombinaison / insertion, pour obtenir un ADN recombinant qui se répliquera dans une bactérie. Cela permet de disposer de plusieurs copies identiques d'une séquence (gène ou fragment de gène) *in vivo*. Cette technique permet la constitution d'une banque d'ADN complémentaire et génomique. Ces séquences peuvent ensuite être étudiées, notamment par séquençage. Cette approche, bien qu'exhaustive, n'est actuellement pas utilisable en routine pour le diagnostic microbiologique en odontologie, du fait de sa mise en œuvre longue et fastidieuse. Toutefois, cette technique a permis d'étudier la diversité microbienne du sillon gingivo-dentaire.

Les méthodes d'amplification par voie enzymatique (PCR et méthodes variantes) sont fondées sur l'utilisation d'une enzyme ADN polymérase qui permet de recopier à partir d'une amorce (amorce d'ADN) une séquence cible (ADN cible) connue (61).

La PCR fournit une méthode ingénieuse afin d'amplifier spécifiquement une séquence d'ADN de façon exponentielle *in vitro*. Cette méthode publiée par Mullis *et al.*, en 1987, repose sur la succession de cycles d'amplification. Elle est constituée d'une trentaine de cycles, chacun d'eux comportant trois étapes essentielles :

1. La dénaturation thermique des ADN double brin en ADN simple brin ;
2. L'hybridation de deux oligonucléotides (couples d'amorces) de part et d'autre de la séquence à amplifier (sur les brins cibles dénaturés) ;
3. L'extension ou élongation enzymatique des amorces par une ADN polymérase thermorésistante. Cette dernière phase permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire par une ADN polymérase ADN dépendante thermostable (la *Taq* polymérase étant la plus utilisée). Elle reste fonctionnelle tout au long de la PCR (51).

Le contrôle de ces trois étapes est réalisé par la modification de la température du milieu réactionnel. La spécificité de la méthode dérive des amorces d'oligonucléotides synthétiques utilisées, qui s'apparient de manière complémentaire aux brins d'ADN matrices et définissent par conséquent les extrémités et la taille des séquences devant être amplifiées. Les fragments d'ADN cibles sont amplifiés de façon exponentielle. En effet, à partir d'une matrice cible, un nombre considérable de copies identiques est généré : les amplicons (ADN double brin bordé par les amorces). Ainsi, celle-ci est détectée plus facilement, *a posteriori*.

La détection est différente suivant le type de PCR mis en œuvre. La PCR conventionnelle peut être définie comme une PCR en point final et elle est opposée à la PCR en temps réel.

- La PCR en point final : Les amplicons sont séparés en fonction de leur masse par électrophorèse sur gel d'agarose, et visualisés à l'aide d'un agent intercalant fluorescent (bromure d'éthidium) sous lumière ultraviolette (UV). La vitesse de migration est dépendante du nombre de bases de l'ADN testé, la présence et la taille des amplicons pourra donc être vérifiée.
- La PCR en temps réel (real-time PCR) ou PCR quantitative (ou qPCR) consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent. Cette technique sera traitée plus précisément dans la suite de cet exposé.

Il existe de nombreuses variantes de la PCR, parmi lesquelles la « *nested* » PCR et la « *semi-nested* » PCR (51), la PCR multiplexe (62), la PCR « universelle » 16S ou PCR séquençage de l'ARN 16S (63), la RT-PCR (PCR après transcription inverse) et la PCR allèle-spécifique (62).

IV. La PCR quantitative (qPCR)

Technique apparue dès les années 1990, la qPCR se base sur le concept de PCR (64).

Depuis son invention, la PCR est devenue la technique la plus utilisée pour la détection de l'ADN et de l'ARN. La nature exponentielle de la technique la rend attrayante pour des analyses quantitatives. En effet, une relation quantitative existe entre la quantité de la séquence cible de départ et la quantité du produit amplifié à n'importe quel cycle. Pour une telle approche, la PCR conventionnelle présente des limites car le résultat de l'amplification est analysé à la fin du processus d'amplification, c'est-à-dire lorsque les échantillons se trouvent dans la phase stationnaire de la réaction. L'analyse en point final n'est pas appropriée pour déterminer la quantité d'une molécule d'ADN particulière dans un échantillon (65).

1. Qu'est-ce que la qPCR ?

1.1. Les étapes préliminaires

Pour la qPCR, comme pour la PCR conventionnelle, les premières étapes sont l'extraction et la purification des acides nucléiques. La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR. Afin d'obtenir des acides nucléiques hautement purifiés exempts de tout contaminant visible, des méthodes d'extraction adéquates doivent être appliquées.

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique requiert la lyse cellulaire, l'inactivation des nucléases cellulaires et la séparation de l'acide nucléique souhaité des débris cellulaires (66).

1.2. Le principe

Le principe de la qPCR repose sur le suivi cycle par cycle de la réaction d'amplification enzymatique au moyen d'une molécule *reporter* fluorescente capable d'émettre dans des conditions bien définies un rayonnement fluorescent dont l'intensité sera directement mesurée à un moment donné au cours de chaque cycle PCR. Le *reporter* est introduit dans le mélange réactionnel et permet la détection et la quantification de l'ADN fluorimétrique. Par ce suivi, il est possible de tracer une courbe qui va suivre la cinétique de la réaction de PCR, de caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle (**Figure 13**).

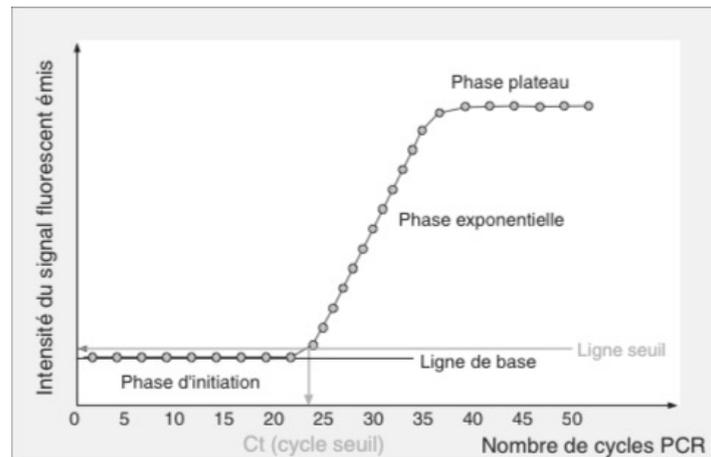


Figure 13 : Cinétique de la réaction de qPCR

La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases : une phase d'initiation, une phase exponentielle et une phase plateau. La courbe est construite à partir de plusieurs points d'amplification. Un point d'amplification est un point présentant pour coordonnées le nombre de cycles PCR par rapport à l'intensité de fluorescence émise.

La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil (*baseline threshold*) correspond au seuil de détection optique au-delà duquel la variation en intensité de fluorescence suit une loi exponentielle. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil (*Ct pour threshold cycle*) qui est le point de départ de la phase exponentielle et qui se trouve directement lié à la quantité de cible initialement présente dans un échantillon. De cette façon, un échantillon moins riche en ADN devra passer par plus de cycles d'amplification afin que sa fluorescence dépasse le bruit de fond, le Ct sera donc plus élevé. La quantification par qPCR n'étudie pas la fin de la réaction et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique.

Pour effectuer une quantification par PCR quantitative en temps réel, un échantillon standard titré en nombre de copies de gènes (ADN de référence) est dilué en série, permettant l'élaboration d'une gamme d'étalonnage, et est soumis au protocole de qPCR. Une courbe d'amplification, reliant le Ct à la fluorescence est obtenue pour chaque dilution effectuée (**Figure 14A**). La droite standard, exprimant les variations du Ct en fonction de la quantité d'acide nucléique cible contenue dans chaque point de la gamme, est ainsi établie.

La droite standard permet de connaître l'efficacité E de la PCR et est calculée à partir de la pente de la droite standard par la formule suivante : $E = 10^{1/\text{pente}}$. On considère que le domaine acceptable d'efficacité est compris entre 75% et 125%.

A partir de cette droite, la concentration cellulaire d'échantillons à tester peut être quantifiée (**Figure 14 A et B**) (67,68).

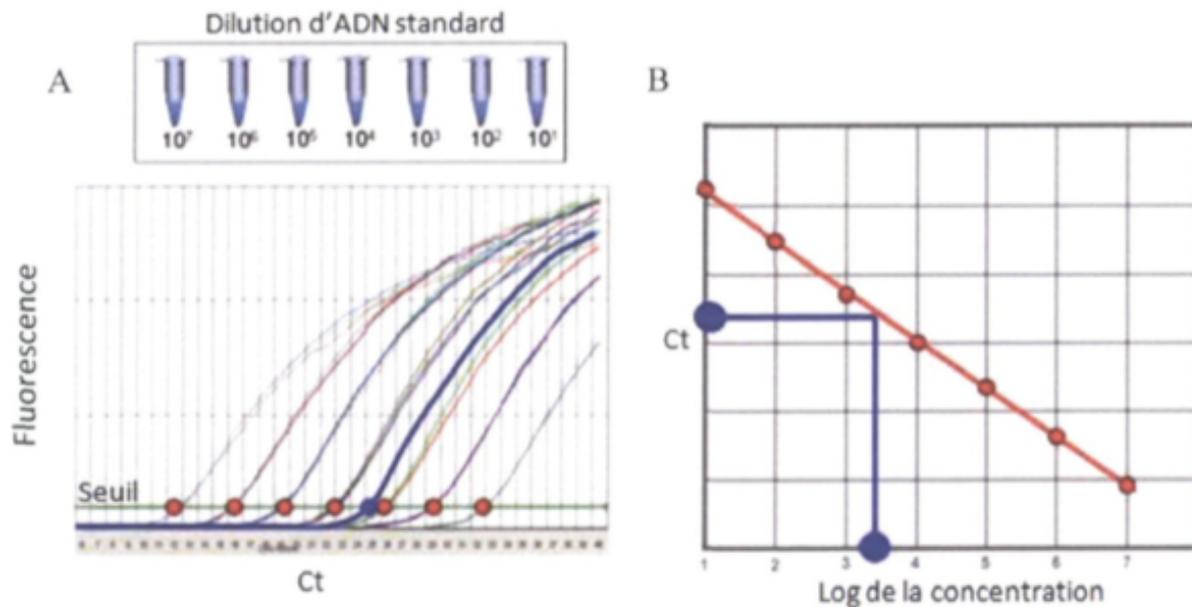


Figure 14 : Courbes d'amplification et courbe standard de qPCR

A) Un échantillon standard est dilué en série et soumis à la qPCR. Cela aboutit à l'obtention de courbes d'amplifications reliant le Ct à la fluorescence (points rouges).
 B) Les Ct de l'échantillon standard sont reportés en fonction des Log des concentrations relatives (régression linéaire des Ct) : on établit ainsi une droite standard. Le Ct obtenu à partir d'un échantillon inconnu (point bleu) permettra, lorsqu'il sera reporté sur le droite, d'obtenir le log de la concentration en molécules cibles de cet échantillon.

La qPCR est une technique d'identification offrant donc la possibilité de quantifier la charge en ADN mais elle présente plusieurs autres avantages, dont le fait qu'il ne soit pas nécessaire de procéder à des manipulations supplémentaires pour mettre en évidence les amplicons une fois l'amplification terminée. Cette technique limite donc de façon non négligeable le risque de contamination « tube à tube » qui existe avec la PCR conventionnelle.

1.2.1. Les systèmes de détection

Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplicons générées après chaque cycle d'amplification font appel soit à un agent se liant à l'ADN double brin, soit à une sonde fluorogénique allant s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible amplifié (69).

A. Les agents se liant à l'ADN double-brin (Lightcycler assay)

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin (*double-stranded DNA binding dyes*) peuvent être divisées en deux classes :

- Les agents intercalants, se fixant directement sur l'ADN double brin, tels que le bromure d'éthidium (Higuchi *et al.*, 1992), le YO-PRO-1 (Ishiguro *et al.*, 1995 ; Tseng *et al.*, 1997) ou encore le SYBR® Green I (Morrison *et al.*, 1998) ;

- Les agents se fixant au sillon mineur (*minor groove binders*) comme le Hoeschst 33258 (Searle et Embrey, 1990 ; Nielsen, 1991).

Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN bicaténaire. Pour être utilisés dans une réaction de qPCR, ces agents doivent répondre à deux exigences : augmenter en fluorescence lors de la liaison à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR.

Le système de détection le plus simple, repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBR® Green I (70) qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. Ce colorant ne devient fluorescent qu'après liaison. Il s'agit de l'agent se liant à l'ADN double brin le plus fréquemment utilisé.

À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR® Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR (71) (**Tableau 3**).

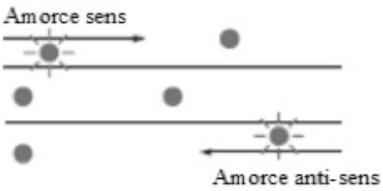
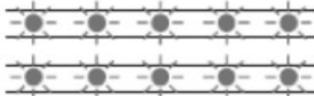
La technologie basée sur le SYBR® Green I est économique, simple et très sensible. Elle ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur le choix des amorces (71). Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques (72).

Les amorces conditionnent donc la spécificité. Le SYBR® Green I marque toutes les molécules d'ADN double brin, qu'elles soient spécifiques ou non de la séquence d'intérêt. De ce fait, tous les produits de PCR non spécifiques ainsi que les dimères d'amorces (*primer-dimers*) éventuellement formés vont également engendrer un signal de fluorescence. Cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle. Il y a donc un défaut de spécificité, mais pour pallier celui-ci, le SYBR® Green I permet de tester la spécificité d'une réaction PCR par l'établissement et l'analyse d'une courbe de fusion post-PCR puis par la détermination de la température de fusion (T_m : *melting temperature*) des produits amplifiés (69). Chaque produit de l'amplification est caractérisé par sa température de fusion, qui dépend de la composition et de la longueur de sa séquence nucléotidique. Elle correspond à la température pour laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié (la moitié des hybrides formés est sous forme bicaténaire et l'autre sous forme monocaténaire). La courbe de fusion permet d'apprécier la diminution de la fluorescence en fonction de l'augmentation de la température. Deux produits de PCR diffèrent par leur température de fusion. Il est ainsi possible de détecter des produits non-spécifiques. Un pic de fusion d'un produit PCR va aisément se distinguer des pics de fusion de produits non

spécifiques qui vont fondre à des températures plus faibles en présentant des pics généralement plus larges.

L'autre limite du système est liée au fait que l'intensité générée est proportionnelle à la masse d'ADN double brin produite et par conséquent à la taille des amplicons. Ce qui n'est pas le cas des systèmes utilisant une sonde fluorogénique pour lesquels la production d'un signal de fluorescence est indépendante de la longueur du produit amplifié et spécifique de l'amplicon détecté.

Tableau 3 : La chimie SYBR® Green I

SYBR® Green I	
<p><u>Principe de la réaction</u></p> <p>Le SYBR® Green I émet une fluorescence lorsqu'il est associé à un double brin d'ADN</p>	
<p><u>1) Dénaturation</u></p> <p>Lorsque l'ADN est dénaturé, l'émission fluorescente du SYBR® Green I est limitée</p>	
<p><u>2) Polymérisation</u></p> <p>Durant l'élongation, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation</p>	
<p><u>3) Polymérisation achevée</u></p> <p>Lorsque la polymérisation est achevée, l'intensité de l'émission fluorescente est optimale puisque le SYBR® Green I se lie à tout ADN double-brin</p>	

B. Les sondes fluorogéniques

➤ **Principe de base : quenching par FRET**

Une sonde fluorogénique est un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié et portant un ou deux groupements fluorophores. Un groupement fluorophore est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse et ainsi de passer à un état excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission fluorescente en retournant à son état initial.

À chaque cycle d'amplification PCR, l'hybridation spécifique d'une molécule de sonde fluorogénique sur chaque molécule d'amplicon générée, couplée à une mesure de l'intensité de la fluorescence émise par le groupement fluorophore excité, vont permettre le suivi en direct de la

réaction d'amplification. Cependant, l'émission de fluorescence mesurée ne doit se produire que lorsque la sonde s'est hybridée sur sa cible spécifique. D'où l'introduction d'un second fluorophore allant plus ou moins complètement absorber l'énergie émise par le fluorophore excité et réduire voire empêcher l'émission de fluorescence lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel. Afin d'obtenir un signal intense avec un très faible bruit de fond, le système permettant la détection des produits d'amplification exploite le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : *fluorescence resonance energy transfer*) entre une molécule électroniquement excitée (le fluorophore donneur) et une molécule voisine (le fluorophore accepteur ou *quencher*). Suite à ce transfert d'énergie, le fluorophore donneur excité retourne à son état initial et l'énergie transférée au *quencher* est, soit absorbée par ce dernier, soit dissipée dans l'environnement sous forme de chaleur. Ce processus de capture et de transfert d'énergie lumineuse est appelé *quenching*. Le fluorophore *quencher* est la molécule qui réalise le *quenching* de fluorescence.

Deux conditions sont essentielles pour obtenir un *quenching* efficace par FRET : un chevauchement spectral compatible du couple donneur / accepteur et un rayon dit de Förster (distance optimale entre donneur et accepteur) compris entre 40 et 100 Angströms (69).

Selon la nature du *quencher* participant au processus FRET, plusieurs systèmes de détection ont été élaborés. À l'heure actuelle, les stratégies de détection les plus employées sont celles utilisant comme sonde fluorogénique, les sondes TaqMan® ou sondes d'hydrolyse (73), les sondes FRET en tandem ou sondes LightCycler® et les sondes Beacon®. D'autres systèmes comme le système Scorpion®, le système Amplifluor® et le système des sondes peptidiques light-up ou sondes *peptide nucleic acids* (PNA) ont été récemment développés.

Selon Wittwer *et al.* (1997), ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente. Cependant, elles présentent des différences au niveau de la spécificité (71).

➤ Les sondes d'hydrolyse ou sondes TaqMan®

Cette chimie permet d'obtenir un signal fluorescent à partir d'une sonde bi-marquée et dont l'augmentation de fluorescence est proportionnelle au produit de PCR. Elle est appelée chimie TaqMan® (brevet déposé par Hoffman La Roche) et la sonde est appelée sonde TaqMan®.

La sonde TaqMan® est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores à ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorochrome (ou fluorophore) émetteur ou donneur (*reporter*) qui est un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX ou VIC®). À l'extrémité 3', se trouve le fluorochrome suppresseur (*quencher*) qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA).

Du fait de la proximité des deux groupements fluorochromes, liée à la petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides, soit moins de 55 Angströms entre les deux fluorochromes), l'énergie absorbée par le *reporter* excité est transférée par FRET au *quencher*. Le spectre d'excitation du TAMRA ne chevauchant pas le spectre d'émission du *reporter*, le *quencher* absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence. Le processus de FRET est à l'origine d'une dissipation calorique de l'énergie plutôt que d'une émission fluorescente (72).

Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la *Taq* polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. La particularité du système TaqMan® est donc d'exploiter l'activité 5'-3' nucléase de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique. Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le *reporter* de l'effet *quenching* exercé par le TAMRA et ainsi de rétablir son émission de fluorescence (**Tableau 4**). Celle-ci augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. L'intensité de la fluorescence émise par le *reporter* est mesurée en fin de chaque cycle d'amplification.

Étant donné que l'activité 5'-exonucléasique de la *Taq* polymérase est spécifique à l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise.

De par son mode de fonctionnement, le système TaqMan® utilise des conditions d'amplification particulières en deux étapes, une étape de dénaturation à 94 °C et une seconde étape combinant hybridation et élongation réalisées à une température identique (aux alentours de 60 °C). La sonde ne pouvant être clivée que lorsqu'elle est hybridée à son brin complémentaire, la température d'extension des amorces doit être compatible avec la température d'hybridation de la sonde. Les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape.

La majorité des sondes ont une T_m (température de fusion) autour de 70°C ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Ainsi, dans le cas d'une sonde TaqMan®, la T_m doit donc être élevée et voisine de cette valeur, 70 °C, ce qui impose une conception rigoureuse des amorces mais facilite l'application d'un profil de thermocyclage standard. Par ailleurs, le système TaqMan® impose l'utilisation d'une ADN polymérase obligatoirement dotée d'une activité 5'-3' exonucléase dont l'efficacité conditionnera la qualité et l'intensité du signal émis (74).

Le clivage de la sonde étant irréversible, le système TaqMan® ne permet pas l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR.

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage, par rapport aux agents se liant à l'ADN,

une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage.

La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (*primer-dimers*).

Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR.

Tableau 4 : La chimie TaqMan®

TaqMan®	
<p>1) Polymérisation</p> <p>Un fluorochrome émetteur (<i>Reporter R</i>) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et un second fluorochrome suppresseur (<i>quencher Q</i>) est lui fixé à l'extrémité 3'</p>	
<p>2) Déplacement du brin d'ADN</p> <p>Lorsque la sonde est intacte, l'émission du <i>reporter</i> est inhibée par le <i>quencher</i></p>	
<p>3) Clivage</p> <p>Durant chaque cycle d'élongation, l'ADN polymérase clive le <i>reporter</i> de la sonde</p>	
<p>4) Fin de la polymérisation</p> <p>Une fois séparé du <i>quencher</i>, le <i>reporter</i> émet sa fluorescence caractéristique</p>	

C. Comparaison entre SYBR® Green et TaqMan®

Tableau 5 : Comparaison entre les chimies SYBR® Green I et TaqMan® (75)

	Sonde d'hydrolyse TaqMan®	Agent intercalant SYBR® Green I
Généralités	Utilise une sonde fluorogénique pour la détection d'un produit de PCR spécifique au fur et à mesure qu'il s'accumule pendant les cycles de PCR.	Utilise le colorant SYBR Green I, un colorant de liaison à l'ADN double brin très spécifique, pour détecter le produit de PCR lorsqu'il s'accumule pendant les cycles de PCR.
Spécificité	Détecte uniquement les produits d'amplification spécifiques.	Détecte tous les ADN double brin amplifiés, y compris les produits de réaction non spécifiques.
Applications	<ul style="list-style-type: none"> • qPCR en une étape pour la quantification de l'ARN • qPCR en deux étapes pour la quantification de l'ARN • Quantification ADN : ADNc : • Discrimination allélique • Tests plus / moins utilisant un contrôle positif interne 	<ul style="list-style-type: none"> • qPCR en une étape pour la quantification de l'ARN • qPCR en deux étapes pour la quantification de l'ARN • Quantification ADN : ADNc
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> • Une hybridation spécifique entre la sonde et la cible est nécessaire pour générer un signal fluorescent, réduisant de manière significative le bruit de fond et les faux positifs • Les sondes peuvent être étiquetées avec différents « colorants marqueurs », ce qui offre la possibilité d'amplifier deux séquences distinctes dans un tube de réaction • Le traitement post-PCR est éliminé, ce qui réduit les coûts de main d'œuvre et de matériel 	<ul style="list-style-type: none"> • L'amplification de toute séquence d'ADN double brin peut être surveillée • Aucune sonde n'est requise, ce qui réduit la configuration de l'analyse et les coûts d'exploitation • Plusieurs colorants peuvent se lier à une seule molécule amplifiée, augmentant la sensibilité pour détecter les produits d'amplification
Inconvénients	Une sonde différente doit être synthétisée pour chaque séquence cible unique.	Du fait de la possible liaison du colorant SYBR Green I à n'importe quelle séquence d'ADN bicaténaire contenant des ADN double brin, des signaux faux positifs peuvent être générés

1.2.2. Les stratégies de quantification

La concentration en acide nucléique cible peut être mesurée, soit de façon « absolue » après établissement d'une courbe d'étalonnage à partir d'un standard homologue externe, soit de façon relative après normalisation par rapport à un gène de référence (gène endogène validé) ou un calibrant (échantillon servant de référence).

Les stratégies de quantification « absolue » expriment la concentration en cible d'intérêt en tant que valeur absolue, c'est-à-dire en nombre de copies par μL ou en unités de concentration (par exemple en moles d'acide nucléique par μL) ; celles de quantification relative mesurent la concentration en cible d'intérêt, relativement par rapport à la référence choisie, c'est-à-dire au moyen d'un rapport cible / référence (69,76).

2. Les études ayant fait appel à la PCR quantitative

2.1.1. Les différents domaines d'application de la qPCR

De nombreuses études ont employé cette technique afin de pallier les limites de la PCR conventionnelle, notamment du fait de l'hétérogénéité des résultats obtenus. L'avènement de la qPCR, depuis les années 2000, s'explique en majeure partie par sa facilité à produire des résultats *a priori* pertinents et favorise entre autres, la standardisation des techniques (65).

La qPCR est un outil puissant pour l'analyse en biologie moléculaire et en biotechnologie. Son utilisation dans le cadre de la recherche, et plus particulièrement en biologie et en clinique est sans cesse croissante (77).

En 1993, Peccoud évoquait les applications de la qPCR, qui étaient déjà nombreuses, tant en recherche biologique qu'en analyse médicale (78).

En 2003, Tse *et al.* ont publié une revue traitant des principales applications de la qPCR en biologie médicale. Cette revue décrit les principes de base de la quantification par PCR ainsi que ceux des chimies les plus employées pour la détection en tube clos des acides nucléiques, les agents intercalants et les sondes fluorogéniques (69).

➤ En microbiologie :

○ Parasitologie :

La toxoplasmose, infection parasitaire dont l'agent est le protozoaire *Toxoplasma gondii*, a été l'objet de nombreuses études.

En 2007, Maubon *et al.* (65) ont procédé à une revue des protocoles de qPCR dans le cadre d'une étude portant sur le diagnostic de la toxoplasmose. À ce jour, plus d'une vingtaine de protocoles de PCR qualitative *Toxoplasma* sont dénombrés. Cette grande diversité des protocoles « maisons » donne lieu à une grande hétérogénéité des résultats. Dans cette étude, les gènes d'intérêt sont sensiblement identiques à ceux utilisés au préalable en PCR qualitative. Le système de quantification par FRET et la gamme d'étalonnage est établie par dilution d'ADN extrait de souche de référence. Dans plusieurs études, la qPCR a montré des résultats performants en termes de sensibilité, spécificité et rapidité diagnostique. Toutefois, entre les différents systèmes de détection des produits d'amplification, la qPCR utilisant le FRET offre les meilleurs résultats en termes de sensibilité.

Jaureghui *et al.*, en 2001, avaient déjà employé la technique de qPCR *Toxoplasma* en pathologie animale. Cette étude a suggéré l'utilisation possible de cette technique dans le dépistage des viandes parasitées (79).

En parasitologie, la qPCR a également été employée pour l'étude de la Leishmaniose, maladie causée par différents parasites du genre *Leishmania*, transmis par la piqûre d'insectes.

En 2004, Martorino *et al.*, ont mené une étude traitant du diagnostic de la Leishmaniose canine par qPCR (76).

En 2011, Weirather *et al.*, ont utilisé des essais de qPCR afin de détecter, identifier et quantifier le parasite dans des échantillons humains. Le SYBR® Green I a été principalement utilisé, avec un recours à la technologie TaqMan® pour validation, dans certains cas (80).

- En virologie :

Dès 1993, Clementi *et al.* ont sorti une publication portant sur la qPCR en virologie (81). En 2002, Mackay *et al.* en firent de même (72).

Watzinger *et al.*, en 2004 se sont intéressés aux infections virales infantiles. Ils ont ainsi mené des essais de qPCR sur des virus pathogènes pour l'homme, chez des patients pédiatriques immunodéprimés. Un panel de tests de PCR quantitative basés sur la technologie TaqMan® a été développé pour la détection et la surveillance de 16 virus et familles de virus. Ils ont montré que chez les patients immunodéprimés avec des infections virales invasives, la surveillance par qPCR peut permettre la détection de l'augmentation de la charge virale de plusieurs jours à plusieurs semaines avant l'apparition des symptômes cliniques. Dans les infections virales pour lesquelles un traitement spécifique est disponible, cette technique fournit un outil diagnostique fiable pour l'initiation en temps opportun d'une thérapie appropriée (82).

En 2008, Engelmann *et al.* ont développé des essais de qPCR visant à la détection simultanée de plusieurs virus. Une spécificité et une sensibilité élevées ont pu être atteintes (83).

- En mycologie :

Dans le domaine de la mycologie, un certain nombre d'études se sont intéressées aux champignons retrouvés dans les lavages broncho-alvéolaires.

En 2005, Brancart *et al.* ont développé un test TaqMan® qPCR pour la détection et la quantification de *Pneumocystis jiroveci*, champignon opportuniste responsable de pneumopathies létales, dans des échantillons de lavage bronchoalvéolaire (LBA) basés sur des amorces et une sonde ciblant le gène codant pour la bêta-tubuline, protéine structurale des microtubules (84).

Dans un article publié en septembre 2017 dans *Le Journal de Mycologie Médicale*, Scherer *et al.* ont procédé à des travaux rétrospectifs se basant sur plusieurs études ayant montré que la détection d'ADN de mucorales par PCR quantitative dans le sérum permettait un diagnostic précoce des mucormycoses. Ils ont montré que la détection d'ADN de mucorales par qPCR sur le LBA permet d'obtenir un argument supplémentaire en faveur du diagnostic de mucormycose (85).

➤ En médecine :

Dans le domaine de la biologie clinique, il est important de noter que le recours à la qPCR permet souvent de travailler sur des échantillons dont le prélèvement requiert un désagrément aussi mineur que possible pour le sujet ou le patient. En effet, le volume requis peut être extrêmement faible (< 1 mL) (78).

➤ Dans l'industrie agroalimentaire :

En 2002, Alary *et al.* ont appliqué les essais de qPCR à la quantification des organismes génétiquement modifiés (OGM) (86).

En œnologie, la qPCR est très souvent utilisée pour la détection des levures *Brettanomyces* qui sont des bactéries altérant la qualité des vins. En 2017, une équipe de l'université de Bourgogne a publié un article à propos de *Brettanomyces bruxellensis*. De nombreuses études portant sur la qPCR ont conduit au développement de kits commerciaux permettant de dénombrer spécifiquement cette espèce (87,88).

D'autres auteurs, ayant effectué des recherches dans l'industrie alimentaire, ont utilisé cette technique de quantification, parmi lesquels Vitali en 2003 (89), Gueimonde *et al.* en 2006 (90) ou encore Lauri et Mariani en 2009 (91).

La qPCR a été employée dans bien d'autres domaines, tels la botanique (92,93), la zoologie (94) ou encore l'écologie (45,95,96).

2.1.2. La qPCR en microbiologie orale

La qPCR est couramment utilisée pour identifier et quantifier les micro-organismes oraux en raison de leur rapidité d'exécution ainsi que de leur haute sensibilité et spécificité (97).

Jusqu'à il y a peu, la PCR a été majoritairement employée afin d'identifier et de quantifier les espèces bactériennes impliquées dans les pathologies orales (caries et parodontopathies), dans des modèles *in vivo* ou dans des échantillons de plaque dentaire. Cependant, dans des études plus récentes, la qPCR a également été utilisée dans le but d'identifier des espèces dans des modèles *in vitro*, aussi bien après culture ou directement au sein du biofilm (27).

Suzuki *et al.*, en 2004, puis en 2005 ont mené des travaux sur le biofilm oral et la quantification des espèces le constituant par qPCR en utilisant la sonde TaqMan®.

Dans la première étude, une PCR TaqMan® a été développée pour quantifier les micro-organismes colonisateurs précoces dans les biofilms dentaires. La clé du succès de cette méthode

est la conception de sondes et d'amorces spécifiques basées sur la séquence nucléotidique de l'organisme cible. Pour concevoir ces amorces spécifiques aux espèces et ces sondes, une hybridation soustractive génomique a été utilisée (98).

La seconde étude, de 2005, a consisté au développement et à l'utilisation de la PCR TaqMan® pour la quantification des bactéries impliquées dans les pathologies orales. Ils ont défini le rôle de cette méthode d'identification dans le diagnostic des pathologies infectieuses buccales et leur étiologie. En comparaison avec d'autres méthodes de quantification des pathogènes oraux, notamment la cytométrie de flux ou l'hybridation, cette technique présente des avantages en termes de sensibilité, de précision et de rapidité dans la mesure où elle s'affranchit de l'électrophorèse sur gel.

Suzuki *et al.* se sont basés sur l'étude menée par Holland *et al.*, en 1991. Cette équipe a été la première à mettre en place une technique faisant appel à l'activité 5'-3' exonucléase de la *Taq* polymérase (qPCR TaqMan®) dans le cadre d'une analyse quantitative de l'ADN (99).

Un biofilm de prothèse dentaire pluri-espèces *in vitro*, contenant diverses bactéries et levures commensales orales et pathogènes a été modélisé par Sherry *et al.*, en 2006. La composition et la viabilité du biofilm ont été évaluées par des méthodes de culture (CFU : *colony-forming unit* ou UFC : unité formant colonie) et moléculaires (qPCR). La microscopie électronique à balayage et la microscopie confocale à balayage laser ont également été utilisées pour visualiser les changements de structure des biofilms de prothèses dentaires, selon les procédures d'hygiène opérées (brossage seul, nettoyage seul ou brossage combiné au nettoyage des prothèses dentaires). La qPCR a été utilisée pour déterminer les cellules vivantes et totales persistant dans le biofilm suivant chaque protocole. Dans cette étude, l'agent intercalant SYBR® Green a été employé (100).

Dans une étude de 2007 de Dalwai *et al.*, un modèle *in vitro* de plaque supra-gingivale associée à la gingivite a été caractérisé, notamment, par qPCR. Avec les progrès des techniques moléculaires, une plus grande proportion d'espèces présentes dans la cavité buccale que la proportion détectable par les techniques de culture traditionnelles a été détectée, et le nombre d'espèces bactériennes présentes dans la plaque dentaire est maintenant estimée à plus de 630. La qPCR a le potentiel de rendre compte de la partie incultivable de la communauté microbienne orale ainsi que des espèces plus difficiles à cultiver, comme *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et les tréponèmes oraux.

En utilisant le modèle CDFD pour les biofilms oraux, Dalwai *et al.* ont pu identifier la gamme des espèces cultivables présentes dans ce système *in vitro* et surveiller les changements au niveau des espèces et des genres spécifiques en réponse aux changements des conditions environnementales par qPCR (101).

Le gène de l'ARNr 16S est le marqueur génétique le plus connu, utilisé pour identifier et classer les bactéries. Il est d'ailleurs couramment employé comme gène cible dans la PCR conventionnelle ou la qPCR afin de détecter les espèces bactériennes. Dans certaines études récentes, un ARN polymérase ADN dépendant (*rpoB*) a été utilisé au lieu de l'ARNr 16S pour l'identification bactérienne. Park *et al.*, en 2011, ont développé des amorces spécifiques, les amorces Pg-F/Pg-R ou « Pg-F/Pg-R primers », en se basant sur la séquence nucléotidique du *rpoB* pour la quantification de *Porphyromonas gingivalis*. La spécificité de ces amorces a été testée par PCR conventionnelle alors que la sensibilité l'a été par qPCR, cela afin de déterminer la limite de détection de l'ADN génomique de *Porphyromonas gingivalis* dans des dilutions sérielles. TaqMan® et SYBR® Green ont été utilisés. Avec la sonde TaqMan®, la précision est légèrement supérieure mais cette méthode est plus coûteuse. Toutefois, bien que sa spécificité soit inférieure, la méthode SYBR® Green peut être raisonnablement utilisée (102).

Dans une étude menée en 2012, Ammann *et al.* avaient pour objectif d'établir une technique de qPCR afin de quantifier les bactéries utilisées dans leur modèle de biofilm sous-gingival *in vitro* de dix espèces et de comparer les résultats quantitatifs obtenus avec un dénombrement par microscopie en fluorescence après hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) ou immunofluorescence et un dénombrement après culture sur gélose. La qPCR et la microscopie en fluorescence peuvent être facilement combinées l'une avec l'autre pour quantifier les espèces bactériennes spécifiques présentes au sein d'un biofilm. Cependant, les cultures bactériennes conventionnelles ne peuvent être combinées aussi efficacement en utilisant ces méthodes de détection moléculaire.

Dans cette étude, comme dans celle de Sherry *et al.* en 2006, le SYBR® Green a été utilisé. Les amorces utilisées ont été élaborées en utilisant l'outil bio-informatique Primer-BLAST, sur le site international du « National Center for Biotechnology Information » (NCBI). Cette banque de données permet la recherche et la mise au point du couple d'amorces spécifiques de la séquence cible (103). Les mêmes auteurs, en 2013 ont de nouveau eu recours à la PCR quantitative, en comparant cette fois la technique à la microscopie confocale à balayage laser après hybridation en fluorescence *in situ* (FISH) afin de comparer la distribution quantitative des bactéries et la structure 3D des biofilms en présence ou non des espèces colonisatrices primaires (27).

➤ Études menées en cariologie :

En 2003, Yoshida *et al.* ont développé un essai TaqMan® de qPCR 5' nucléase dont l'objectif était de détecter les bactéries cariogènes majeures que sont *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus*, par une approche quantitative (104).

En 2011, Zaura *et al.* ont eu recours à la technique de qPCR afin d'observer les modifications de l'écosystème bactérien buccal dues à l'effet du champignon shiitake (*Lentinula edodes*) ou Lentin du Chêne sur un modèle de biofilm cariogène in vitro (27).

En 2012, Kuribayashi *et al.* ont utilisé la PCR quantitative afin d'effectuer des mesures intra-orales du pH de lésions carieuses au moyen d'un capteur micro-pH (105).

➤ Études menées en parodontie :

Nombre d'études faisant appel à des essais de PCR quantitative ont été menées depuis de nombreuses années dans le domaine de la parodontie, les maladies parodontales étant parmi les affections les plus courantes affectant les êtres humains (106). Les maladies parodontales sont d'origine multifactorielle. Leur initiation et leur progression nécessitent l'implication de plusieurs facteurs, dont des bactéries qui contribuent à la formation d'un biofilm polymicrobien au niveau sous-gingival, d'où cet intérêt, depuis des décennies, pour les recherches dans le domaine de la microbiologie parodontale.

Les bactéries des complexes rouge et orange de Socransky ont été étudiées (15).

Partant du postulat que pour comprendre l'étiologie bactérienne de la maladie parodontale, il est nécessaire de procéder à une quantification précise du nombre de cellules d'espèces bactériennes individuelles dans des échantillons de plaque dentaire, Lyons *et al.*, en 2000, ont mis en place un essai TaqMan® de qPCR. En utilisant ce système, ils ont pu déterminer à la fois la quantité de *Porphyromonas gingivalis*, bactérie étroitement apparentée à l'initiation et à la progression des parodontopathies, et le nombre total de cellules bactériennes présentes dans les échantillons de plaque. En utilisant des amorces spécifiques à l'espèce et une sonde fluorescente, la détection de l'ADN à partir de dilutions sérielles de cellules de *Porphyromonas gingivalis* était linéaire sur une large gamme de concentrations d'ADN. Le nombre total de cellules de toutes les espèces bactériennes a été déterminé en utilisant des amorces universelles et une sonde fluorescente (107).

En 2003, Maeda *et al.* se sont également intéressés aux maladies parodontales. Cette étude a été conçue afin d'évaluer la sensibilité, la spécificité et l'efficacité de quantification de la PCR quantitative utilisant le « GeneAmp® PCR Sequence Detection System » avec les chimies TaqMan® et SYBR Green®. Les amorces et les sondes ont été conçues pour les espèces étudiées et les bactéries totales basées sur les séquences nucléotidiques des gènes de leur ARN ribosomique 16S respectif. Comme la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques est l'un des problèmes cruciaux de la thérapie parodontale, la détection quantitative du gène *tetQ*, qui confère une résistance à la tétracycline, a été incluse dans l'examen (108).

En 2004, Kuboniwa *et al.* ont développé une méthode sensible et spécifique utilisant un essai TaqMan® de PCR quantitative afin de détecter et de quantifier six bactéries parodontales. Les résultats de l'étude suggèrent que la méthode de PCR quantitative avec les ensembles sonde / amorce conçus permet une détection sensible des six bactéries parodontales (109).

La même année, une étude assez similaire a été menée par Morillo *et al.*, visant à la quantification de trois espèces uniquement, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (espèce bactérienne désormais dénommée *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* et *Tannerella forsythensis*, provenant d'échantillons de plaque sous-gingivale (110). En 2003, ces auteurs avaient établi une méthode de quantification pour deux de ces espèces parodontopathogènes, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et *Porphyromonas gingivalis*, toujours par qPCR. Basée sur SYBR® Green I, cette technique a été ajustée pour quantifier séparément les deux espèces (111).

Lau *et al.* ont inclus dans leurs travaux les trois mêmes espèces que celles étudiées en 2004 par Morillo *et al.* Le but de cette étude était de valider un essai de qPCR pour identifier et quantifier ces trois espèces à partir d'échantillons de plaque sous-gingivale prélevés chez des sujets avec différentes conditions parodontales (sujets atteints de parodontite, de gingivite ou sains), et de confronter cette technique avec les méthodes conventionnelles de culture bactérienne. Les auteurs ont pu conclure à une concordance entre la technologie de qPCR et la culture (112).

Nonnenmacher *et al.* ont développé une technique qPCR sensible pour le dénombrement de cinq espèces bactériennes ainsi que des eubactéries totales sous-gingivales. La quantification a été réalisée avec des séquences cibles d'ARN ribosomique 16S spécifiques avec des sondes marquées par double fluorescence et des dilutions en série de plasmide standard par qPCR (113).

En 2009, Hyvärinen *et al.*, ont mis en place une étude visant à générer un nouveau test de qPCR basé sur un seul gène, pour cinq pathogènes parodontaux majeurs (114).

Dans la majorité des travaux menés sur le nombre de bactéries parodontales, la plaque sous-gingivale, et non la salive, a été employée comme échantillon. Or, la présence, ainsi que nombre de certaines espèces de bactéries salivaires ont été associées à des parodontites dans plusieurs études. Cependant, le nombre d'études portant sur les concentrations bactériennes salivaires déterminées par qPCR et en particulier les associations bactériennes est limité. C'est pourquoi, en 2005, Salminen *et al.* ont étudié les taux salivaires de quatre pathogènes parodontaux importants par qPCR, se référant aux investigations menées en 2012 par Hyvärinen *et al.*, chez plus de quatre-cents sujets, afin de déterminer si les bactéries salivaires sont des biomarqueurs adéquats de la parodontite. De plus, les auteurs ont étudié si la combinaison de pathogènes salivaires, c'est-à-dire, la charge bactérienne salivaire, fournit plus de valeur diagnostique que les niveaux de pathogènes individuels (115).

En 2016, Karched *et al.* ont utilisé uniquement la qPCR et ont montré que six espèces parodontales étaient capables de former un biofilm pluri-espèces en huit jours, dans des conditions *in vitro*, en l'absence des colonisateurs primaires de la plaque dentaire (27).

Cette même année, Marin *et al.* ont détaillé les procédures pour la quantification de différents pathogènes parodontaux en utilisant la qPCR, les principaux problèmes les plus fréquemment rencontrés et les moyens pour y remédier. En outre, les auteurs ont énoncé un protocole détaillé de PCR quantitative multiplexe pour la détection de deux espèces parodontopathogènes, *Porphyromonas gingivalis* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (116).

Très récemment, en août 2017, Tomás *et al.*, ont publié un article présentant leurs travaux menés sur le développement d'un modèle prédictif pour le diagnostic ou le pronostic de la parodontite chronique basée sur la quantification par qPCR du microbiote sous-gingival. Pour l'analyse des échantillons de plaque sous-gingivale de patients atteints de parodontite chronique généralisée modérée et sévère, ils ont eu recours à la PCR quantitative en utilisant des sondes TaqMan® et des amorces spécifiques pour déterminer les concentrations bactériennes. (106).

Dans l'ensemble des études susmentionnées, la conclusion des différents auteurs a été que la PCR quantitative représentait une méthode fiable et valable pour la quantification bactérienne. La PCR a démontré une sensibilité, une spécificité et une efficacité suffisantes pour constituer un outil puissant d'examen microbiologique.

Partie II : TRAVAUX EXPÉRIMENTAUX

Comme nous l'avons exposé dans la première partie, la PCR quantitative est un outil diagnostique dont l'utilisation ne cesse de croître, et ce, dans divers domaines, notamment en microbiologie orale, dans le cadre de l'étude des biofilms oraux.

Au laboratoire de microbiologie de l'Université d'Odontologie de Bordeaux, dirigé par Madame le Docteur Marie-Cécile BADET, Madame le Docteur Darrène LOPEZ-NGUYEN a développé un modèle de biofilm oral dynamique *in vitro* pluri-espèces, avec pour objectif de se rapprocher le plus fidèlement possible des conditions régnant au sein de la cavité buccale et d'étudier les interactions parmi les communautés bactériennes. Ce modèle a été imaginé à partir de celui développé, en 2001, par Guggenheim.

I. But de l'étude

En se basant sur les travaux réalisés au laboratoire, un protocole de PCR quantitative a été mis en œuvre afin de pouvoir quantifier, de manière relative, les espèces bactériennes, se différenciant ainsi d'autres techniques d'identification n'offrant qu'un résultat qualitatif (présence/absence des bactéries au sein du biofilm). La méthode d'identification par PCR quantitative a été appliquée à plusieurs variantes de ce modèle dynamique.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel

1.1. Souches bactériennes et milieux de culture

➤ Les souches utilisées :

Les souches utilisées dans ce biofilm pluri-espèces proviennent de *l'American Type Collection and Culture* (ATCC) et sont les suivantes :

- *Streptococcus mutans* ATCC 25175
- *Streptococcus oralis* ATCC 20627
- *Streptococcus salivarius* ATCC 20560
- *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277
- *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953
- *Actinomyces viscosus* ATCC 15987
- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 33384
- *Tannerella forsythia* ATCC 43037

➤ Les milieux de culture :

Ces bactéries sont cultivées dans leurs milieux de culture spécifiques (*cf. Annexe 1*) et placées dans une étuve à 37°C :

- Le bouillon BHI (*Brain Heart Infusion*) + Cystéine pour *A. actinomycetemcomitans*
- Le bouillon WCA (Wilkins - Chalgren Anaerobe) pour *F. nucleatum* et *P. gingivalis*
- Le bouillon « ANA », bouillon pour bactéries anaérobies, pour *T. forsythia*
- Le bouillon TS (Tryptone-Soja) pour les Streptococcus et *A. viscosus*

1.2. Modèles de biofilms

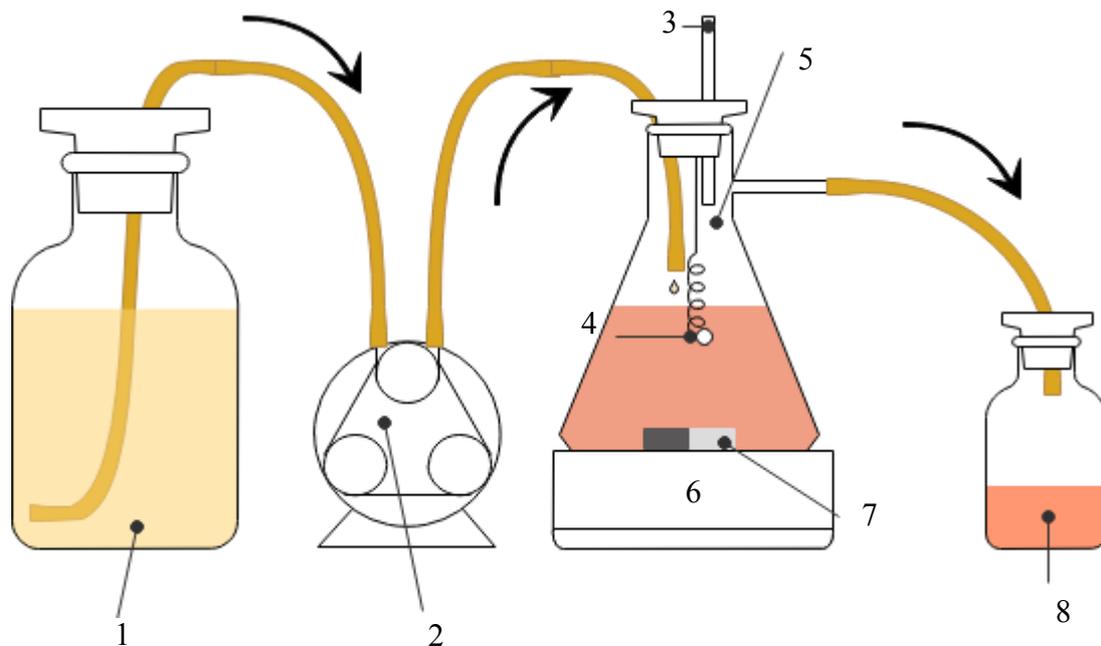
Le modèle de biofilm de référence est celui mis en place par Mesdames les Docteurs Darrène LOPEZ-NGUYEN et Hinarii CHONSUI dans le cadre de leurs travaux de thèse respectifs (*Figure 15*). Il s'agit d'un modèle de culture continue, une « bouche artificielle », élaboré pour la formation, sur 72 heures, d'un biofilm sur pluri-espèces.

Principe de fonctionnement :

Entre 72 à 96 heures avant la mise en place du biofilm, les bactéries sont mises en culture dans du FUM, puis incubées à 37°C.

Le jour de la mise en place, les densités optiques sont mesurées ($DO_{550nm} = 1 \pm 0,05$), au moyen d'un spectrophotomètre. Les suspensions bactériennes ainsi que du sérum de cheval (25 millilitres) sont alors ajoutés dans l'erlenmeyer au travers de la pipette. La quantité de bactéries est variable d'un biofilm à l'autre car elle est dépendante de la quantité de culot disponible, mais, pour un même biofilm, toutes les espèces sont inoculées à volume égal.

À 24 heures, la pompe péristaltique est activée et réglée à un débit de 0,35 ml/min. 48 heures plus tard, le milieu et le disque sont recueillis.



Légende :

1. Bouteille contenant du FUM enrichi (FUMe) en glucose (0,15%) +/- saccharose (0,15%) ;
2. Pompe péristaltique permettant l'apport continu de FUMe ;
3. Pipette permettant l'apport du sérum de cheval et des bactéries ;
4. Disque d'hydroxyapatite représentant la surface dentaire, permettant l'adhésion bactérienne ;
5. Erlenmeyer contenant du FUM (*Fluid Universal Medium*) maintenu à une température de 37°C. Le FUM est utilisé comme milieu universel pour la croissance des bactéries dans les biofilms pluri-espèces ;
6. Agitateur magnétique chauffant réglé à une température de 65°C et réglé à 90 tours par minute ;
7. Aimant permettant un mouvement perpétuel, rendant le biofilm dynamique.
8. Récipient de récupération des déchets

Figure 15 : Représentation schématique du modèle de biofilm oral dynamique pluri-espèces in vitro de base mis au point au sein du laboratoire de l'Université d'Odontologie de Bordeaux

Dans le cadre de nos expérimentations, nous avons appliqué des modifications environnementales à ce biofilm de référence. Dix-huit biofilms ont ainsi été mis en place (*cf. Annexe 4*), auxquels les variations suivantes ont été appliquées :

- Variation du type et du nombre d'espèces bactériennes en présence ;
- Compositions différentes du milieu de croissance des bactéries (contenu de l'erlenmeyer) ;
- Absence de sucre, avec un apport de FUM et non de FUMe au milieu de croissance. L'apport nutritif pour les bactéries se retrouve ainsi inhibé ;
- Enrichissement du milieu de renouvellement (FUMe) au glucose uniquement ou association glucose – saccharose pour un apport nutritif d'autant plus important ;
- Incorporation d'un probiotique, ajouté aux espèces bactériennes incluses dans le biofilm, cela, à deux instants différents (à J0 et J+2) ;
- Établissement d'un environnement cariogène dès le départ avec un milieu de croissance enrichi en glucose et saccharose ;
- Variation du pH avec un pH = 4 du milieu de renouvellement et du milieu de croissance des bactéries (adjonction d'acide chlorhydrique).

La souche probiotique choisie provenait des travaux de thèse menés par Madame le Docteur Anaël JABOL ; cet isolat clinique de *S. salivarius* ayant montré une activité antibactérienne intéressante.

1.3. Matériel de qPCR

➤ Amorces et « mix » utilisées :

Dans la mise au point de la réaction PCR quantitative, le choix des amorces est crucial. Les amorces spécifiques à chaque espèce bactérienne de notre biofilm ont été commandées auprès de la société Sigma-Aldrich (**Tableau 6**). Dès réception, elles sont mises en solution, suivant les instructions du fabricant, et congelées à -20°C.

Nous avons eu recours, pour ces expérimentations, à la chimie SYBR Green, pour sept des huit espèces.

Pour la dernière espèce, nous avons employé une sonde fluorescente (chimie TaqMan®).

Tableau 6 : Liste des amorces (et sonde) utilisées dans notre étude

Espèces bactériennes	Amorces sens et anti-sens	Séquences (5'-3')	Longueur (paires de base)	Gènes cibles	Références
<i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus salivarius</i>	STREP-F	GATACATAGCCGACCTGAG	17	16S rRNA	Dalwai <i>et al.</i> (101)
	STREP-R	CCATTGCCGAAGATTCC	20		Dalwai <i>et al.</i> (101)
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (PG)	PG-F	GGAAGAGAAGACGTAGCAC AAGGA	-	<i>rpoB</i>	Park <i>et al.</i> (102)
	PG-R	GAGTAGGCGAAACGTCCAT CAGGTC	-		Park <i>et al.</i> (102)
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (FN)	FN-F	GGATTTATTGGGCGTAAAGC	22	16S rRNA	Dalwai <i>et al.</i> 104
	FN-R	GGCATTCTACAAATATCTA CGAA	23		Dalwai <i>et al.</i> (101)
Aggregatibacter actinomycetemcomitans (AA)	AA-F	CTTACCTACTCTTGACATCG AA	-	16S rRNA et <i>tetQ</i>	Maeda <i>et al.</i> (108)
	AA-R	ATGCAGCACCTGTCTCAAAG C	-		
<i>Tannerella forsythia</i> (TF)	TF-F	GGGTGAGTAACGCGTATGT AACCT	-	16S rRNA	Shelburne <i>et al.</i> (117)
	TF-R	ACCCATCCGCAACCAATAA A	-		

Espèces bactériennes	Amorces sens et anti-sens & Sonde	Séquences (5'-3')	Longueur (paires de base)	Gènes cibles	Références
<i>Actinomyces viscosus</i> (AV)	AV-F	ATGTGGGTCTGACCTGCTGC	96	<i>Sau3AI</i>	Suzuki <i>et al.</i> (98)
	AV-R	CAAAGTCGATCACGCTCCG	96		
	Sonde FAM-Tamra	[6FAM]ACGGAGGTCGGGAA CGGTGGAAG[TAM]			

La quantification de l'expression génétique est réalisée en utilisant :

- Le iQ SYBR® Green Supermix (*Bio-Rad*), pour toutes les espèces, à l'exception de *A. viscosus* ;
 - Le iQ Supermix (*Bio-Rad*), pour *A. viscosus*.
- Appareil de qPCR :

L'appareil utilisé est le MyiQ (*iCycler iQ Real Time PCR Detection System*), combiné au logiciel iQ5 V.2.1 Standard de Bio-Rad.

2. Méthodes d'étude des biofilms

2.1. Les étapes préalables à la qPCR

2.1.1. Recueil du biofilm et ensemencement

- Recueil du milieu et du disque :

Le recueil doit se faire dans des conditions d'asepsie. Pour cela, l'ensemble des manipulations sont réalisées dans un volume stérile constitué par la flamme d'un bec Bunsen.

Le disque est recueilli dans un premier temps et placé dans un tube stérile en plastique contenant 1 millilitre d'eau stérile. Au moyen d'une pipette graduée, 1 millilitre de milieu est prélevé et transféré dans un second tube stérile.

Consécutivement, un certain volume de milieu, entre 10 et 20 millilitres, est prélevé et conservé dans un flacon pour prélèvement.

Le pH du milieu est contrôlé.

- Recueil du biofilm à la surface du disque d'hydroxyapatite et des bactéries présentes au sein du milieu :

Les tubes stériles en plastique contenant respectivement disque et milieu sont soumis, dans un premier temps, à une sonification, durant deux minutes, suivie, dans un second temps, d'un vortexage vigoureux, pendant deux minutes également, afin de mettre les cellules en suspension.

- Ensemencements des milieux gélosés et conservation :

À partir des deux tubes contenant les suspensions mères, pour le disque et le milieu, des dilutions au vingtième, à 10^{-2} , 10^{-4} et 10^{-6} , sont réalisées. Les solutions mères et les dilutions des disques et

milieux sont ensemencées (50 microlitres), par un étalement au râteau, sur géloses. Trois types de géloses sont utilisées (*cf. Annexe 1*) :

- Gélose Columbia au sang (GS) (*Oxoid™ Thermo Fisher Scientific*) ;
- Gélose *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA) ;
- Gélose de *Schaedler* au sang frais (SCH).

Les géloses sont mises en anaérobiose à 37° pendant 72 heures. Suite à ces 72 heures d'incubation, les colonies formées sur chaque gélose sont identifiées. Afin de vérifier les espèces retrouvées sur ces différents milieux spécifiques, des colorations de Gram sont effectuées.

Dans trois micro-tubes (triplicatas), nommés Ax1, Ax2 et Ax3, le milieu est conservé (2 mL x 3). La suspension du disque l'est également, dans un micro-tube, Bx (0,8 mL x 3). Ces quatre micro-tubes sont congelés à -80°C, pour extraction d'ADN, ultérieurement.

L'opération est répétée pour chaque biofilm.

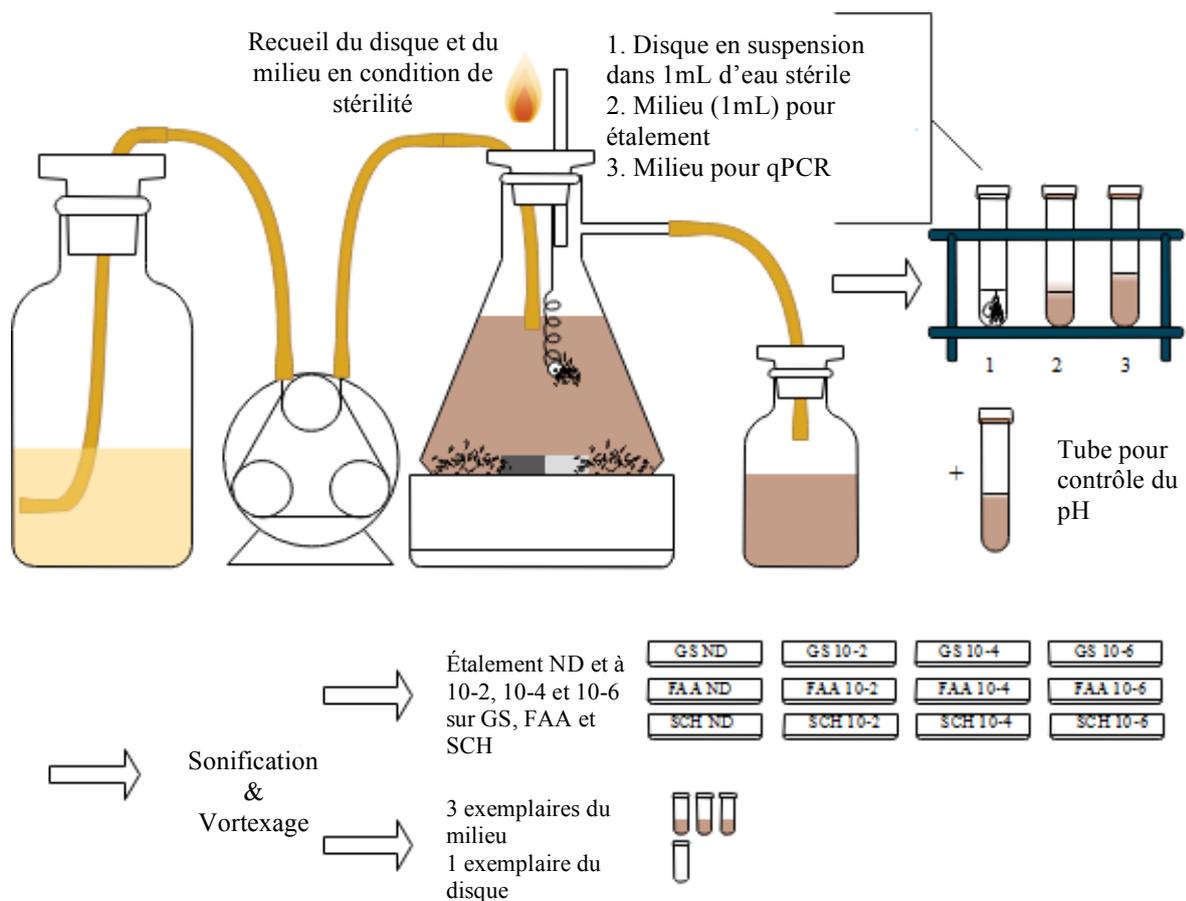


Figure 16 : Représentation schématique des étapes de recueil du biofilm et d'ensemencement

Après incubation, les géloses sont analysées. Les colonies sont identifiées par coloration de Gram. Pour les biofilms 9 à 13, un recueil des colonies a été effectué, avec un écouvillon, suivi d'une mise en suspension dans des micro-tubes contenant de l'eau stérile (GxD et GxM).

2.1.2. Réalisation des dilutions sérielles pour gammes d'étalonnage et ensemencement

À partir des souches pures de chaque bactérie, des dilutions décimales en cascade sont réalisées. Ainsi, sont obtenus sept flacons contenant respectivement : la solution mère et ses dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-6} , soit six dilutions au dixième.

Des triplicatas des différentes solutions mères et de leurs dilutions sont réalisées, pour l'établissement des gammes étalons, par prélèvement de 3 x 2 millilitres de suspension que l'on transfère dans des micro-tubes. Le tout est conservé à -80°C .

Dans le même temps, les solutions mères et leurs dilutions sérielles (50 μL) sont étalées sur gélose Columbia au sang et incubées à 37°C pendant 3 à 4 jours.

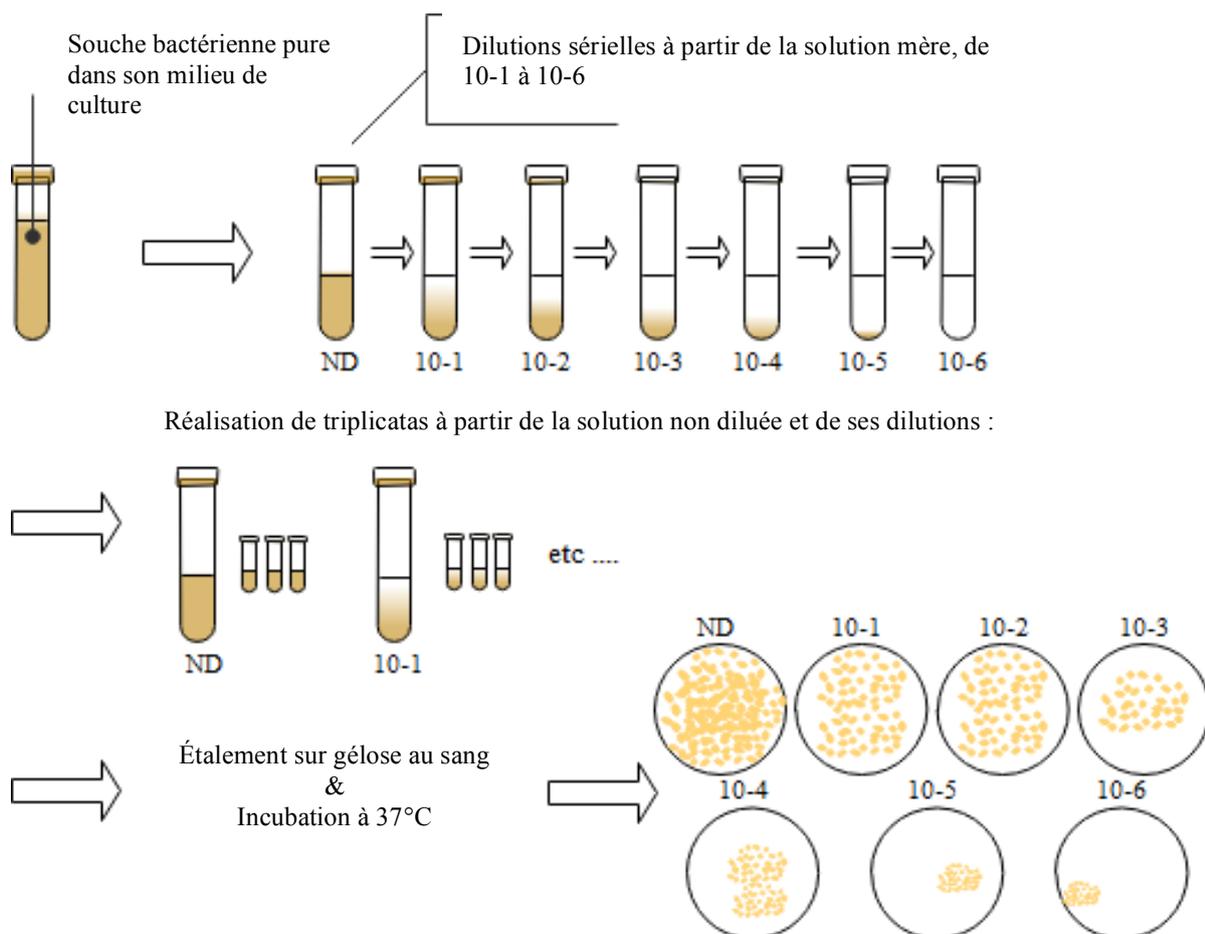


Figure 17 : Représentation schématique des étapes de dilution des souches bactériennes et d'ensemencement

2.1.3. Extraction d'ADN

Vient ensuite l'étape de l'extraction d'ADN (*cf. Annexe 3*). Celle-ci est réalisée pour les triplicatas de souches, de milieux, pour les disques et les géloses.

Les ADN sont extraits suivant un protocole classique, au moyen d'un kit d'extraction d'ADN génomique bactérien de la société Sigma-Aldrich (*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*). Cette étape permet l'isolement et la purification de l'ADN génomique.

L'ADN isolé ainsi obtenu est congelé à -20°C, jusqu'à l'analyse par qPCR.

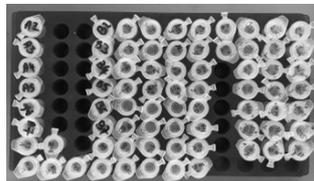
2.2. Protocole de qPCR

2.2.1. Établissement d'un plan de plaque

Le mix pour PCR quantitative (*iQTM SYBR® Green Supermix* ou *iQTM Supermix*) et les échantillons d'ADN sont décongelés et placés à température ambiante. Le mix est conservé à l'abri de la lumière.

L'étape initiale consiste en l'établissement d'un plan de plaque. Sur un portoir, les micro-tubes d'échantillons sont agencés et la disposition choisie est notée, pour les analyses ultérieures (**Figure 18**). La manière dont les micro-tubes sont placés sur le portoir correspond à celle dont leur contenu sera réparti sur la plaque 96 puits.

A)



B)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A2	AV 0		B2	A11 1	A11 2	A11 3	G9 M	G13 M	AV ND 1	AV ND 2	A ND 3
B	A3			B3	A12 1	A12 2	A12 3	G9 D	G13 D	AV 10 ⁻¹ 1	AV 10 ⁻¹ 2	AV 10 ⁻¹ 3
C	A4			B4	A13 1	A13 2	A13 3	G10 M		AV 10 ⁻² 1	AV 10 ⁻² 2	AV 10 ⁻² 3
D	A5			B5	A16 1	A16 2	A16 3	G10 D		AV 10 ⁻³ 1	AV 10 ⁻³ 2	AV 10 ⁻³ 3
E	A6			B6	A17 1	A17 2	A17 3	G11 M		AV 10 ⁻⁴ 1	AV 10 ⁻⁴ 2	AV 10 ⁻⁴ 3
F	A7			B7	A18 1	A18 2	A18 3	G11 D		AV 10 ⁻⁵ 1	AV 10 ⁻⁵ 2	AV 10 ⁻⁵ 3
G	A9 1	A9 2	A9 3	B9	B11	B12	B13	G12 M		AV 10 ⁻⁶ 1	AV 10 ⁻⁶ 2	AV 10 ⁻⁶ 3
H	A10 1	A10 2	A10 3	B10	B16	B17	B18	G12 D				

Figure 18 : Exemple de plan de plaque sur portoir (A) et report à l'écrit (tapuscrit) nécessaire pour les analyses ultérieures (B)

2.2.2. Préparation du mélange réactionnel

Un mélange réactionnel est élaboré dans un micro-tube stérile, contenant le mix pour PCR quantitative (*iQTM SYBR® Green Supermix* ou *iQTM Supermix*), les amorces sens et anti-sens, (+/- de la sonde fluorescente) ainsi que de l'eau stérile (*cf. Annexe 5*). Le mélange réactionnel est minutieusement vortexé afin d'assurer l'homogénéité de l'ensemble.

2.2.3. Préparation de la plaque 96 puits

Une fois le plan de plaque établi, le volume approprié de mélange réactionnel est transféré dans les puits de la plaque.

Pour cela, les micro-tubes d'échantillons d'ADN sont vortexés et 1 microlitre de solution est minutieusement pipeté et déposé dans les puits contenant le mélange réactionnel.

Au moins un puit doit servir de témoin. C'est un puit dans lequel du mélange réactionnel est placé, sans ADN.

À l'issue de ces manipulations, la plaque de réaction est recouverte d'un film adhésif transparent et brièvement centrifugée, si nécessaire, afin d'éliminer les bulles d'air. Elle est ensuite placée dans le thermocycleur.

2.2.4. qPCR

Des configurations sont effectuées sur le logiciel d'analyse équipant l'appareil de PCR quantitative : report du plan de plaque avec détermination des « puits d'échantillons standards », des « puits d'inconnus », des « puits zéro » (puits « tests » permettant de s'assurer de la justesse des résultats de qPCR).

Le programme de thermocyclage, notamment la température, est programmé (*Tableau 7*). La température d'hybridation (T_a : *annealing temperature*) doit être définie selon la nature des amorces. Elle est calculée en fonction du T_m des deux amorces en présence.

Tableau 7 : Programmes de thermocyclage

Programme de thermocyclage employé pour les streptocoques, <i>P. gingivalis</i>, <i>F. nucleatum</i>, <i>T. Forsythia</i> et <i>A. actinomycetemomitans</i>				
Cycles	Répétition des cycles	Étape(s)	Température	Durée
1	1 X	Étape 1	95,0 °C	10 minutes
2	40 X	Étape 1	95,0 °C	30 secondes
		Étape 2	55,0 °C	1 minute
		Étape 3	72,0 °C	1 minute
		Collecte des données et analyse en temps réel activées.		
3	71 X	Étape 1	60,0 °C-95,0 °C	10 secondes
	Augmentation de la température de consigne après le cycle 2 par palier de 0,5°C. Collecte des données des courbes de fusion et analyse activée.			
4	1 X	Étape 1	25,0 °C	-

Une courbe de dissociation (courbe de fusion) est construite dans la plage de 60 ° C à 95 ° C (au cours du cycle 3, suivant l'étape d'amplification) avec l'agent intercalant SYBR® Green.

Programme de thermocyclage employé pour <i>A. viscosus s</i>				
Cycles	Répétition des cycles	Étape(s)	Température	Durée
1	1 X	Étape 1	50,0 °C	2 minutes
2	1 X	Étape 1	95,0 °C	10 minutes
3	60 X	Étape 1	95,0 °C	15 secondes
		Étape 2	58,0 °C	1 minute
		Collecte des données et analyse en temps réel activées.		
4	1 X	Étape 1	25,0 °C	-

➤ qPCR des gammes d'étalonnage :

Dans un premier temps, nous réalisons la qPCR des échantillons d'ADN des dilutions sérielles (gammes d'étalonnage) de chaque souche bactérienne utilisée dans nos travaux (= triplicatas des souches non diluées et de leurs six dilutions au dixième).

Pour chacune des dilutions, la cinétique de la réaction de PCR est suivie en temps réel afin de déterminer le cycle seuil correspondant.

➤ qPCR des biofilms :

Dans un second temps, nous soumettons l'ADN de l'ensemble des biofilms à la qPCR : milieu x 3 (Ax), disque x 1 (Bx), gélose milieux x 1 (GxM) et gélose disque x 1 (GxD).

La qPCR des biofilms permet de connaître les valeurs des Ct, qui correspondent aux ordonnées à l'origine (y) de chacun des points inconnus à replacer sur la droite de la gamme d'étalonnage. L'abscisse (x) correspond aux valeurs des concentrations, que nous devons déterminer.

Pour calculer x , l'équation est la suivante, avec $slope = a$ et $y-int = b$:

$$x = \frac{CTech - y - int}{slope}$$

Cette équation change en fonction des espèces car elle est définie par la droite représentative de la gamme d'étalonnage.

Une fois le calcul de l'ensemble des x effectué, la concentration est obtenue en élevant 10 à la puissance x . Le logarithme de x ou $\lg(x)$ est ainsi défini.

III. Résultats

Sur le total des dix-huit biofilms mis en place, quatre n'ont pas été intégrés à nos analyses. Il s'agit des biofilms 1, 8, 14 et 15, avec lesquels nous avons été confrontés à des aléas (contaminations, problème de pompe, disque inexploitable).

1. Gammes d'étalonnage

La qPCR des gammes d'étalonnage permet l'obtention des courbes d'amplification de chaque dilution des échantillons. À partir de ces courbes d'amplification, nous définissons la ligne seuil (*baseline threshold*). Nous ajustons cette ligne manuellement et cela nous permet de déterminer les Ct avec justesse. De cette façon, nous obtenons une droite standard, tracée à partir des moyennes des Ct des triplicatas de chaque concentration, dont l'efficacité (E) tend vers 100% et le coefficient de corrélation r^2 vers 1.

Dans l'analyse de nos résultats, *A. viscosus* et *T. forsythia* n'ont pas été pris en compte. En effet, les données recueillies pour ces deux espèces se sont avérées inexploitables. Nous les avons retrouvées par coloration de Gram, donc elles étaient bien présentes, mais nous ne disposions pas du protocole adéquat permettant leur détection correcte. Malheureusement, par souci de temps, nous n'avons pas pu réitérer les expérimentations.

Nos analyses se sont donc focalisées sur *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* et *A. actinomycetemcomitans*. Les gammes d'étalonnage de ces espèces nous ont donné des résultats corrects et fiables. En effet, sur les courbes standard obtenues, les trois points correspondant aux triplicatas de chaque dilution sont proches (les Ct des triplicatas sont assez semblables) (**Figure 19**).

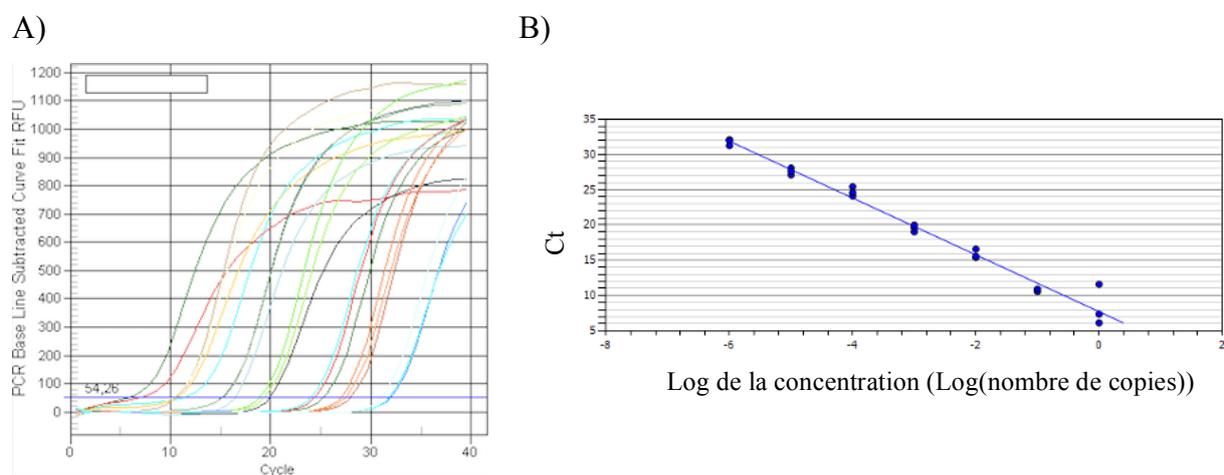


Figure 19 : Courbes d'amplification et droite standard obtenues pour *S. oralis*

A) Courbes d'amplification de *S. oralis* avec une ligne de bruit de fond ajustée à 54,26

B) Droite standard obtenue à partir de la valeur des Ct.

2. Biofilms

Un rapport de qPCR (*quantification detailed report*) est édité à l'issue de chaque protocole, avec entre autres, les courbes d'amplification et les courbes de fusion.

➤ Ct et courbes d'amplification :

À partir des courbes d'amplification des échantillons de biofilms obtenues, la ligne de bruit de fond est ajustée pour chaque espèce en fonction du seuil défini par les gammes d'étalonnage.

Nous obtenons les valeurs des Ct des échantillons de biofilms (**Figure 20**).

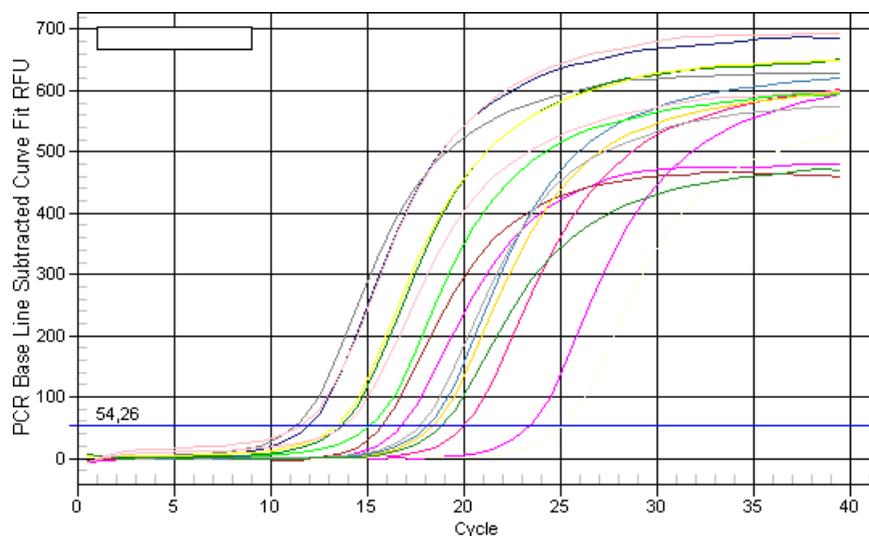


Figure 20 : Courbes d'amplification obtenue par qPCR d'échantillons de biofilms avec l'espèce *S. oralis*

Réglage de la ligne de bruit de fond à une valeur de 54,26 (valeur définie à partir des courbes d'amplification des gammes d'étalonnage)

Pour certaines espèces, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* et *A. Actinomycetemcomitans*, le bruit de fond est important (**Figure 21**).

Le nombre de cycle d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif est important. De fait, les Ct sont plus élevés. Nous pouvons déjà supposer que ces trois bactéries sont présentes à de faibles concentrations (plus Ct est élevé, moins l'échantillon est concentré).

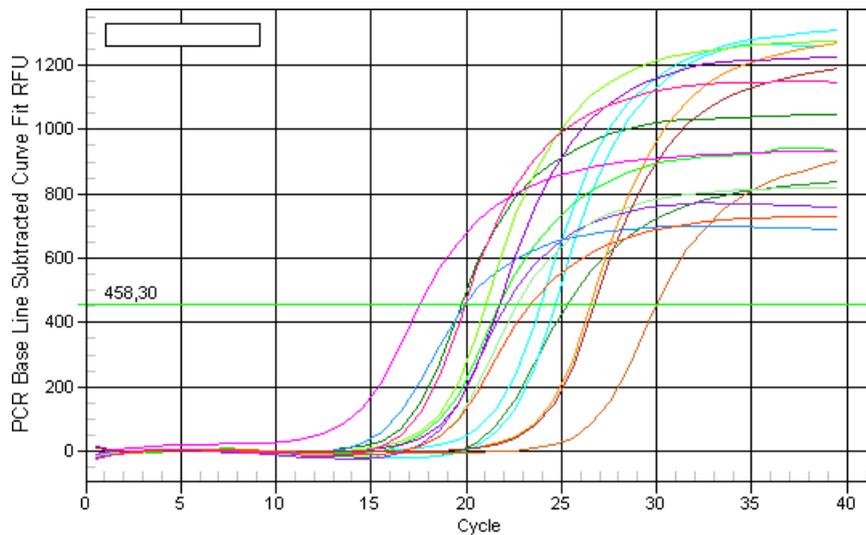


Figure 21 : Courbes d'amplification de *F. nucleatum* avec ligne de bruit de fond ajustée à 458,30

➤ Courbes de fusion :

Pour toutes les espèces dont nous faisons l'analyse, l'agent intercalant SYBR® Green, a été utilisé.

Une courbe de fusion post-PCR a donc été établie, afin de vérifier la spécificité du produit d'amplification.

Pour les bactéries du genre *Streptococcus*, *F. nucleatum* et *A. actinomycetemcomitans*, des courbes de fusion unimodales, avec un pic spécifique unique, ont été obtenues (**Figure 22A**). Un produit PCR unique a été amplifié (la bonne molécule d'ADN amplifiée dans l'ensemble des échantillons). La spécificité est optimale.

Pour *P. gingivalis*, par contre, la courbe de fusion montre des pics parasites. Ces pics sont éliminés et les échantillons correspondant sont supprimés de notre analyse (**Figure 22B**).

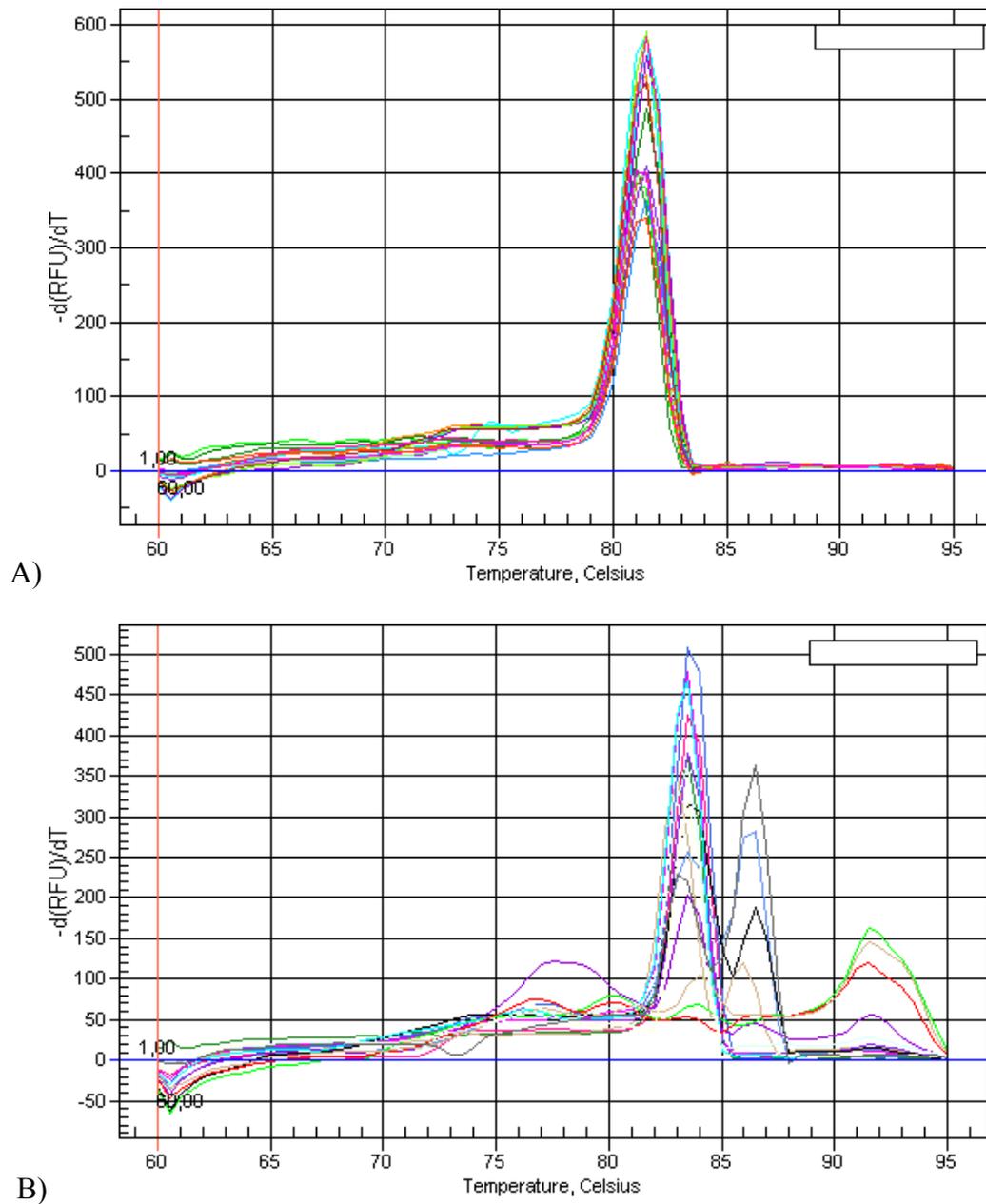


Figure 22 : Courbe de fusion unimodale de *F. nucleatum* (A) et courbe de fusion de *P. gingivalis* avec des pics parasites

3. Concentrations bactériennes

Toutes les espèces ayant été incluses dans nos analyses ont pu être détectées par qPCR. Nous avons pu obtenir leurs concentrations dans les différents biofilms et dans chacun d'eux, la concentration entre biofilm du milieu et du disque (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Concentrations bactériennes retrouvées par qPCR pour chaque biofilm (milieu Ax et disque Bx)

		Espèces bactériennes analysées					
		SS	SO	SM	PG	FN	AA
Biofilm 2	A2			6,18E-01	1,08E-05	1,32E-02	
	B2			1,10E-02	1,83E-06	6,67E-04	
Biofilm 3	A3	1,92E-02	4,66E-02			1,18E-02	
	B3	2,64E-03	8,84E-03			5,23E-06	
Biofilm 4	A4			1,82E-01	1,08E-05	2,97E-01	
	B4			1,91E-02	1,52E-05	1,55E-02	
Biofilm 5	A5			2,25E-01	7,03E-06	9,08E-03	
	B5			1,94E-01	6,62E-06	1,40E-02	
Biofilm 6	A6			3,76E-02	6,49E-06	5,85E-02	
	B6			1,20E-02	3,37E-06	5,00E-04	
Biofilm 7	A7	1,21E-04	3,61E-04			2,19E-03	
	B7	1,31E-01	4,86E-01			9,73E-07	
Biofilm 9	A9			5,23E+00	1,78E-02	6,05E-02	9,19E-06
	B9			3,45E+00	7,51E-03	8,55E-04	3,52E-03
Biofilm 10	A10			1,05E+00	8,70E-05	3,11E-02	
	B10			7,43E-01	3,89E-01	1,50E-05	
Biofilm 11	A11			3,81E-01	8,37E-03	2,85E-01	1,46E-06
	B11			2,88E-01	3,95E-02	8,46E-04	1,37E-03
Biofilm 12	A12			2,78E-01	1,56E-02	7,23E-03	2,61E-06
	B12			2,31E-01	1,43E-01	2,89E-03	1,71E-03
Biofilm 13	A13			1,52E-01	9,03E-03	2,39E-02	1,31E-06
	B13			1,28E-01	2,57E-01	5,13E-03	5,56E-03
Biofilm 16	A16			1,58E-01	1,10E-02	4,08E-01	2,61E-06
	B16			1,29E-01	6,71E-03	1,45E-04	2,76E-03
Biofilm 17	A17			8,64E-01	7,60E-03	2,88E-02	2,17E-05
	B17			4,01E-01	8,47E-02	1,14E-03	2,81E-03
Biofilm 18	A18			1,85E-02	2,16E-02	1,22E-01	2,93E-04
	B18			1,32E-02	2,68E-03	3,66E-03	1,43E-02

Espèces majoritairement représentées
 Espèces non incluses

N.B. :

- Des biofilms 9 à 18, Ax correspond à la moyenne des triplicatas.
- Les nombres indiqués dans ce tableau correspondent à des rapports de concentrations (pas d'unité)

Nos analyses sont faites à partir de ces concentrations (semi-quantification des acides nucléiques).

3.1. Entre les biofilms

Le genre *Streptococcus* est, globalement, celui qui prédomine au sein des différents biofilms mis en place. Parmi les streptocoques, *S. mutans* est l'espèce la plus représentée. Elle est retrouvée en nombre dans la totalité des biofilms dans lesquels nous l'avons incluse, à l'exception des biofilms 16 et 18, pour lesquels *F. nucleatum* se trouve être l'espèce majoritaire.

P. gingivalis et *A. actinomycetemcomitans* sont les espèces présentes en plus faibles quantités. La qPCR nous permet de constater que les concentrations d'*A. actinomycetemcomitans* sont infinitésimales. Cela est vrai dans la totalité des biofilms dans lesquels l'espèce a été incluse. Les concentrations s'expriment en nombres décimaux allant du dix-millièmes (10^{-4}) au dix-millionièmes (10^{-7}) et dans l'un des biofilms, le numéro 16, elle n'a pas été retrouvée sur le disque (**Figure 23**).

De façon simpliste, les résultats peuvent être résumés comme suit : [*Streptococcus*] > [*Fusobacterium nucleatum*] > [*Porphyromonas gingivalis*] > [*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*]

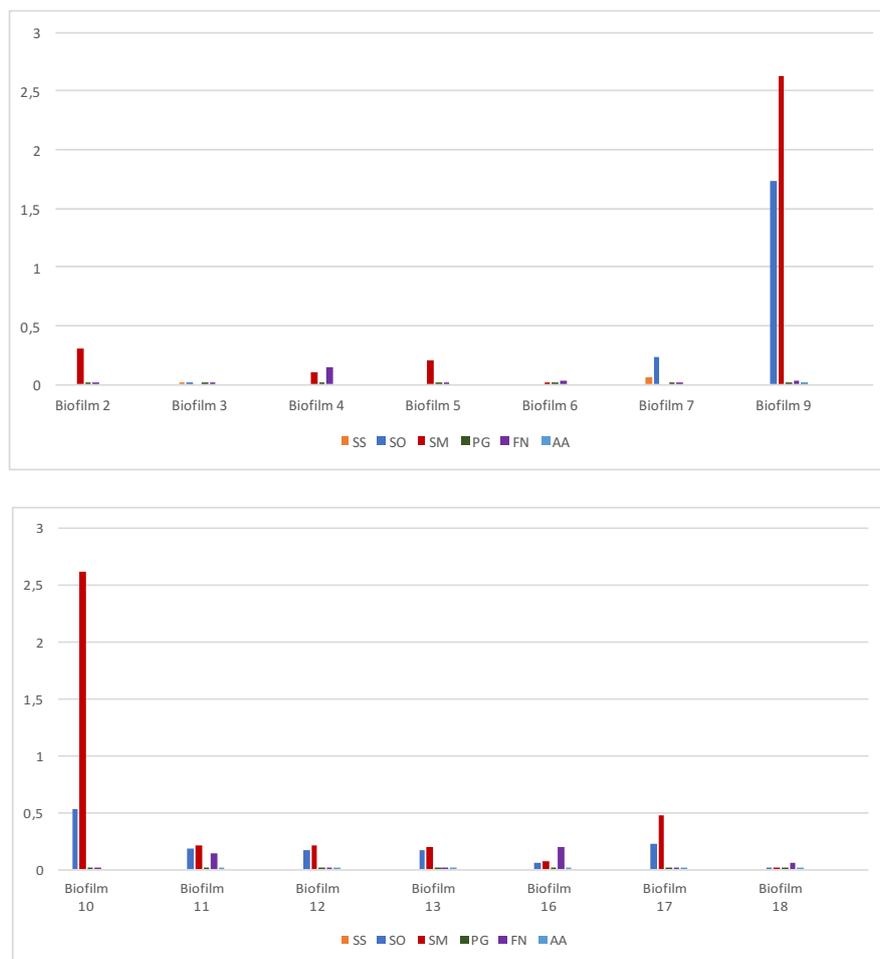


Figure 23 : Moyenne des concentrations milieu / disques pour chaque espèce en fonction des biofilms

Entre certains biofilms, bien que les mêmes conditions aient été appliquées, il y a des différences dans les résultats obtenus.

Dans les biofilms 2, 4, 5 et 6, les espèces inoculées étaient *S. mutans*, (*A. viscosus*), *P. gingivalis* et *F. nucleatum*, avec un enrichissement du milieu de remplacement au glucose seul.

Dans les biofilms 2 et 5, *S. mutans* est l'espèce prédominante (concentrations respectives de 0,62 et 0,23 dans le biofilm du milieu et 0,01 et 0,19 sur le disque).

Dans les biofilms 4 et 6, avec des conditions expérimentales similaires, des différences sont à noter quant aux résultats obtenus. En effet, les concentrations de *S. mutans* dans le milieu sont inférieures à celles de *F. nucleatum*. Dans le biofilm 4, la concentration de *F. nucleatum* est de 0,30, alors que celle de *S. mutans* est de 0,18. Dans le biofilm 6, la concentration de *F. nucleatum* est également supérieure bien que la différence soit moins significative (**Figure 24**).

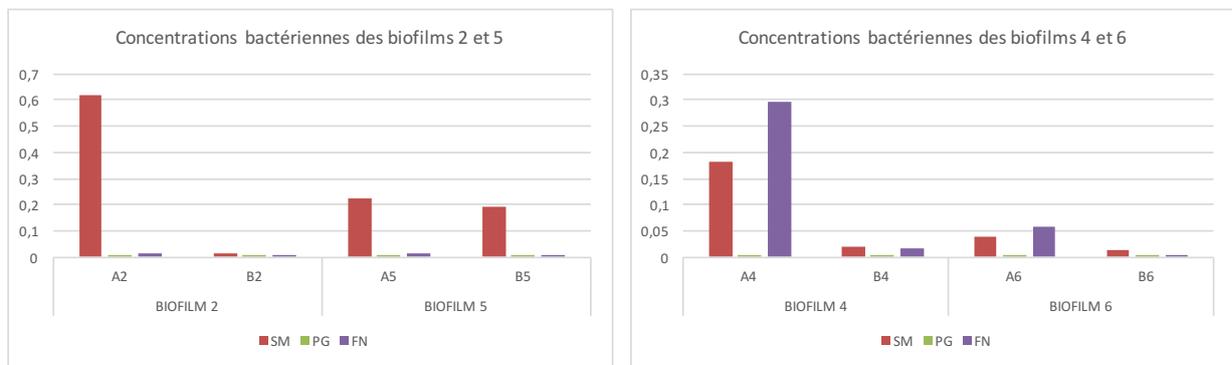


Figure 24 : Graphiques présentant les concentrations bactériennes des biofilms 2 et 5 comparées à celles des biofilms 4 et 6

Dans les biofilms 3 et 7, les espèces inoculées étaient *S. salivarius*, *S. oralis*, *A. viscosus*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, avec un enrichissement au glucose et au saccharose. *S. salivarius* et *S. oralis* se sont substitués à *S. mutans*.

Dans le biofilm 3, *S. oralis* est l'espèce « dominante » (concentrations de 0,05 dans le milieu et près de 0,01 sur le disque). Les différences ne sont toutefois pas significatives avec les autres espèces en présence.

Dans le milieu du biofilm 7, les concentrations de l'ensemble des espèces sont très faibles. Ici encore, *S. oralis* est l'espèce la plus représentée avec 0,0004. Sur le disque, cependant, les concentrations sont plus élevées avec une concentration de *S. oralis* de 0,5 (**Figure 25**).

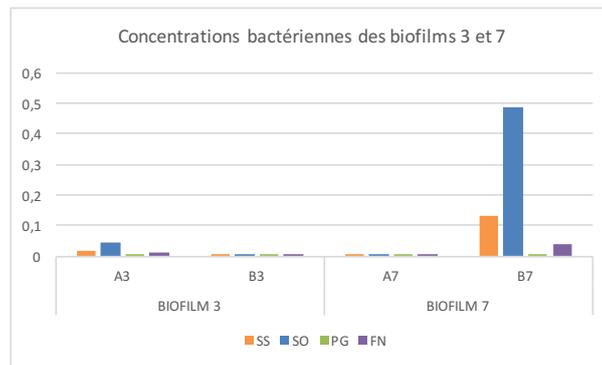


Figure 25 : Graphique présentant les concentrations bactériennes des biofilms 3 et 7

La qPCR nous permet, en plus de l'identification et de la quantification (semi-quantification) de mettre en évidence les variabilités « intra et inter-expérimentales » et de les chiffrer.

3.2. Entre milieux et disques des biofilms

La PCR quantitative nous a permis de nous rendre compte des différences de concentration bactérienne entre le biofilm prélevé dans le milieu et celui s'étant développé sur le disque au sein d'un même biofilm.

Sur géloses, nous avons remarqué que, dans l'ensemble, l'étalement des suspensions de disque donnait moins de colonies bactériennes (unités formant colonies moindres) que les étalements de milieu.

Cela se retrouve dans les concentrations obtenues par qPCR mais nous pouvons souligner le fait que les différences de concentrations milieu / disque sont parfois minimales pour certaines espèces. Nous pouvons prendre en exemple le biofilm 5, dans lequel les concentrations milieu / disque sont presque similaires (*S. mutans* = 0,23 / 0,19 ; *P. gingivalis* = 7.10^{-6} / 7.10^{-6} ; *F. nucleatum* = 0,01 / 0,01). On se rend ici compte d'une croissance quasi-identique des espèces inoculées, dans le milieu et à la surface du disque ; ce phénomène ne se reflétant pas sur les étalements sur géloses. Autre exemple, dans le biofilm 7, les concentrations des différentes espèces sont assez nettement supérieures à la surface du disque que dans le milieu. Au niveau des UFC, ce rapport n'a pas été objectivé.

4. Détection de *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum a été détecté par qPCR alors que la microscopie optique après coloration de Gram ne nous avait pas permis de le faire.

Des biofilms 9 à 13, après mise en culture des suspensions de milieu et de disque, nous avons procédé à des prélèvements de colonies avec un écouvillon. Les produits recueillis ont été soumis à la qPCR. Le but de ces manœuvres était de rechercher la présence de *F. nucleatum*, espèce que nous ne parvenions pas à identifier par coloration de Gram, mais que nous avons cependant réussi à identifier dans le milieu environnant par microscopie optique directement après recueil.

Les résultats obtenus par qPCR nous ont permis de mettre en exergue la présence de cette espèce dans nos expérimentations. Les concentrations trouvées sont, toutefois, mineures (**Figure 26**).

Le problème d'identification de *F. nucleatum* se trouve au niveau des gélules.

A)

	SO	SM	PG	FN	AA
G9D	6,16E-01	1,12E+00	2,89E-06	2,45E-06	1,03E-06
G9M	8,16E+00	1,04E+01	7,52E-05	7,92E-06	1,08E-06
G10D	8,25E-01	9,45E-01	3,18E-06	2,94E-07	0,00E+00
G10M	3,70E-01	4,43E-01	8,26E-06	4,04E-07	0,00E+00
G11D	2,86E-01	2,93E-01	3,98E-06	4,61E-07	2,70E-07
G11M	6,02E-01	7,18E-01	3,29E-06	5,86E-06	7,95E-07
G12D	4,30E-01	7,22E-01	5,28E-06	2,36E-07	1,19E-06
G12M	3,92E-06	8,19E-06	2,57E-06	2,09E-07	0,00E+00
G13D	5,02E-01	1,19E+00	3,90E-06	5,26E-07	1,92E-07
G13M	4,34E-02	4,79E-02	1,46E-06	4,58E-07	1,62E-07

B)

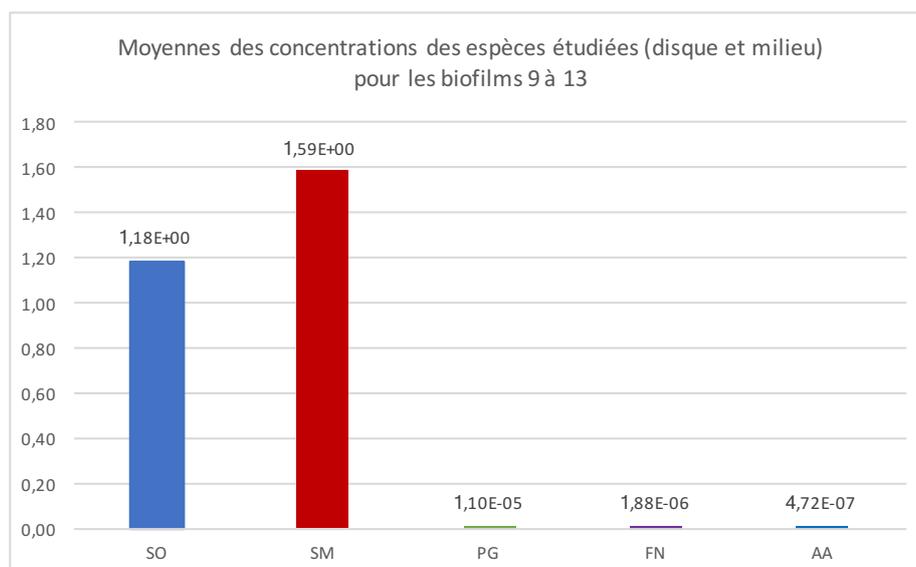


Figure 26 : Concentrations obtenues par qPCR permettant d'objectiver la présence de *F. nucleatum* dans les biofilms 9 à 13 (A) et graphique obtenu à partir des moyennes de ces concentrations (B)

5. Unités Formant Colonies (UFC)

Les UFC dénombrées sur gélose peuvent être reportées aux concentrations des biofilms.

Tableau 9 : Résultat des comptages des UFC des gammes d'étalonnage

Espèce	Concentration	UFC
SM	Non diluée	21 100
	10 ⁻¹	6 592
	10 ⁻²	1 560
	10 ⁻³	616
	10 ⁻⁴	70
	10 ⁻⁵	9
	10 ⁻⁶	1
SO	Non diluée	8 000
	10 ⁻¹	2 000
	10 ⁻²	1 120
	10 ⁻³	130
	10 ⁻⁴	15
	10 ⁻⁵	10
	10 ⁻⁶	0
AV	Non diluée	13 568
	10 ⁻¹	10 960
	10 ⁻²	3 280
	10 ⁻³	604
	10 ⁻⁴	62
	10 ⁻⁵	3
	10 ⁻⁶	1
PG	Non diluée	Nappes
	10 ⁻¹	Nappes
	10 ⁻²	Nappes
	10 ⁻³	Nappes
	10 ⁻⁴	3 877
	10 ⁻⁵	572
	10 ⁻⁶	55
FN	Non diluée	21 100
	10 ⁻¹	4 960
	10 ⁻²	2 800
	10 ⁻³	308
	10 ⁻⁴	97
	10 ⁻⁵	8
	10 ⁻⁶	1
AA	Non diluée	Nappes
	10 ⁻¹	Nappes
	10 ⁻²	Nappes
	10 ⁻³	Nappes
	10 ⁻⁴	4 160
	10 ⁻⁵	510
	10 ⁻⁶	44
TF	Non diluée	Nappes
	10 ⁻¹	Nappes
	10 ⁻²	Nappes
	10 ⁻³	11 000
	10 ⁻⁴	1 532
	10 ⁻⁵	141
	10 ⁻⁶	1

6. Comparaison avec les résultats obtenus avec d'autres techniques d'identification

Pour l'étude des biofilms, différentes techniques d'identification bactérienne ont été employées. L'identification bactérienne par microscopie optique après coloration de Gram et par qPCR a été réalisée pour l'ensemble des biofilms. D'autres techniques d'identification ont été appliquées à certains biofilms. Ces expérimentations ont été menées par Madame le Dr. Hinarii CHONSUI (118) dans le cadre de ses travaux de thèse. Elle a mis en place trois protocoles pour l'identification bactérienne. :

- Protocole 1 : Identification par microscopie optique après coloration de Gram, suivie d'une identification par spectrométrie de masse – MALDI-TOF et par PCR conventionnelle ;
- Protocole 2 : Identification par microscopie optique après coloration de Gram et spectrométrie de masse – MALDI-TOF (avec ou sans extraction préalable des protéines) ;
- Protocole 3 : Identification par microscopie optique après coloration de Gram et qPCR.

L'identification bactérienne par microscopie optique après coloration de Gram (*cf. Annexe 7*), spectrométrie de masse – MALDI-TOF ou PCR conventionnelle n'a pas permis la détection de l'ensemble des bactéries.

L'identification de *F. nucleatum* s'est révélée complexe. Seule la microscopie optique a, en de rares cas, permis de mettre en évidence la présence de cette espèce.

Les résultats du MALDI-TOF ont été négatifs dans la majorité des cas (négatifs avec le protocole sans extraction de protéines et positifs pour *S. mutans* et *A. viscosus* après protocole d'extraction) et ont révélés la présence de contaminations. Seul *S. mutans* a pu être identifié par cette technique. Les résultats de PCR conventionnelle ont été positifs pour tous les tests réalisés sur *S. mutans* mais négatifs pour les autres espèces.

Les résultats obtenus avec ces techniques nous montrent que dans un certain nombre de cas, bien que telle ou telle espèce ait été inoculée au départ, son identification n'a pas été faite.

DISCUSSION

La technologie de PCR quantitative combine la sensibilité de la PCR classique avec la génération d'un signal fluorescent quantifiable et connaît une utilisation croissante. La PCR quantitative permet la détection des produits de PCR produits à chaque étape de la réaction.

Nos travaux avaient pour objectif de procéder à l'identification bactérienne par PCR quantitative appliquée à un modèle dynamique *in vitro* de biofilm oral pluri-espèces. Pour cela, nous nous sommes basés sur des travaux menés antérieurement au laboratoire de microbiologie. Jusqu'à présent, les techniques d'identification appliquées à ce modèle de biofilm avaient été la coloration de Gram, le MALDI-TOF et la PCR conventionnelle. Les espèces bactériennes en présence n'avaient donc jamais pu être « chiffrées », ces techniques permettant simplement de juger de la présence ou non des espèces bactériennes.

Il nous a donc paru intéressant d'appliquer une méthode d'identification autre, nous permettant d'obtenir des informations supplémentaires et tentant de pallier les lacunes des techniques précédemment employées.

En partant du modèle de biofilm développé par Mesdames les Docteurs LOPEZ-NGUYEN et CHONSUI, nous avons successivement mis en place différents biofilms, auxquels des modifications ont été successivement apportées (différentes combinaisons d'espèces inoculées, variations des conditions environnementales). Nous avons procédé au recueil de ces biofilms (milieux et disques), dont nous avons congelé des échantillons. Parallèlement à cela, en prévision des étapes de PCR quantitative, les souches pures des bactéries inoculées ont été diluées en série. Nous avons, dans un premier temps, soumis les échantillons de ces dilutions sérielles (gamme d'étalonnage) à la qPCR, nous permettant ainsi d'obtenir des droites standards, spécifiques à chaque espèce. A partir de ces standards, les échantillons de chaque biofilm ont été analysés en appliquant le même *modus operandi*.

Pour la qPCR, nous avons employé deux systèmes de détection, l'agent intercalant SYBR® Green et la sonde TaqMan®. Sur les huit espèces étudiées, seuls six ont pu faire l'objet de nos analyses. Ces six espèces (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*) ont été détectées avec le SYBR® Green. La spécificité de la réaction de qPCR s'est révélée bonne (courbes de fusion). Pour les deux espèces non incluses (*Actinomyces viscosus* et *Tannerella forsythia*), les protocoles dont nous disposions ne permettaient pas de les détecter avec justesse.

Les résultats obtenus par qPCR nous ont permis d'apprécier les concentrations de chaque espèce inoculée dans chacun des biofilms mis en place.

Les six espèces incluses dans nos analyses ont pu être quantifiées (semi-quantification), pour chaque biofilm et pour chacun d'eux, pour le milieu d'une part et d'autre part, pour le disque.

Les espèces prédominantes sont celles du genre *Streptococcus*. Sur les quatorze biofilms analysés, les streptocoques ont les concentrations les plus élevées, dans treize d'entre eux. Cela s'est retrouvé par coloration de Gram, où les streptocoques ont été facilement identifiés (retrouvés en abondance). Par spectrométrie – MALDI-TOF et PCR conventionnelle, l'identification de l'espèce s'est révélée plus difficile.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans est l'espèce ayant les concentrations les plus faibles, qu'importent les autres bactéries auxquelles elle est associée et les conditions environnementales. Nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour retrouver *Fusobacterium nucleatum* sur nos étalements. Sur le total des quatorze biofilms, l'espèce n'a été retrouvée qu'à quatre reprises par coloration de Gram. La spectrométrie – MALDI-TOF et la PCR conventionnelle n'ont pas permis sa détection. La qPCR nous apporte ici de précieuses informations puisque nous nous apercevons qu'elle est bien présente dans nos différents biofilms, et ce à des concentrations assez importantes. La technique est fiable.

La qPCR nous a offert un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques d'identification employées jusqu'alors :

- Elle offre une plus grande sensibilité et une spécificité ;
- Malgré un travail préalable assez fastidieux, elle permet un gain de temps (technique moins chronophage que le MALDI-TOF et que la PCR) et de standardisation (reproductibilité) ;
- L'absence de manipulation post-PCR, réduit le risque de contamination.

La qPCR permettant de connaître le nombre de bactéries dans les biofilms, elle peut être utilisée pour comprendre le rôle des bactéries orales dans leur formation. La technique nous permet de jauger, de façon plus concrète, la relation s'établissant entre les bactéries.

Les pathologies orales, carieuses et/ou parodontales, sont initiées par la coopération entre différentes espèces. La qPCR permet d'objectiver ce phénomène de coopération.

A partir des résultats que nous avons obtenu par qPCR, des travaux, centrés sur l'analyse des biofilms pour lesquels des variations environnementales ont été appliquées, les biofilms 11 à 18, ont été menés par Jennyfer CHANE KAM HO, dans le cadre de ses travaux de thèse.

Il serait intéressant de poursuivre les investigations, en essayant d'améliorer certains paramètres. A partir de ce biofilm oral *in vitro* pluri-espèces, des travaux pourraient être menés et des changements opérés :

- Nous n'avons pas été en mesure d'analyser les résultats obtenus pour *Actinomyces viscosus* et *Tannerella forsythia*, du fait d'une défaillance des protocoles dont nous disposions. Il serait nécessaire d'établir des protocoles de qPCR viables, permettant une détection correcte de ces deux espèces. Les pourcentages des différentes espèces pourraient ainsi être connus.
- Ayant recouru à l'agent intercalant SYBR Green pour les six espèces analysées, il serait intéressant, à partir des mêmes souches inoculées, de mettre en œuvre des essais de PCR quantitative TaqMan®. Les résultats pourraient, ainsi, être comparés à ceux que nous avons obtenu. La chimie TaqMan®, plus précise du fait de l'utilisation d'amorces et de sondes spécifiques à la séquence nucléotidique du micro-organisme cible, permet de faire la distinction entre les pathogènes cibles et les nombreuses espèces apparentées dans le biofilm oral. Cette technique est, toutefois, plus onéreuse et complexe.
- L'utilisation d'un autre support, l'émail, pour le développement de notre biofilm pluri-espèces peut être envisagée, la formation de la plaque dentaire et l'adhésion bactérienne étant différente sur des surfaces artificielles et des tissus durs dentaires naturels. Comme nous l'avons rapporté dans les résultats de qPCR, à quelques exceptions près, les concentrations bactériennes retrouvées sur le disque sont inférieures à celle du milieu. Nous pensons qu'il y aurait un intérêt à remplacer le disque d'hydroxyapatite, que nous avons utilisé, par un vrai support dentaire et de procéder à des comparaisons après qPCR.
- Une discrimination des cellules viables et des cellules mortes pourrait être faite, en associant le monoazide de propidium à la qPCR. En effet, la qPCR, détecte toutes les cellules d'un échantillon, entraînant ainsi une surestimation de la quantité de bactérie. La qPCR-PMA représente une solution pour palier à ce défaut. Le recours à cette technique pourrait être judicieux dans ce biofilm, et *a fortiori* dans l'ensemble des biofilms oraux pluri-espèces, puisqu'il s'agit de la forme sous laquelle les bactéries s'agencent afin de pouvoir survivre.

Notre étude a consisté à quantifier la population bactérienne de biofilms développés *in vitro*. Nous avons étudié des bactéries mise en culture. Pour aller plus loin, il pourrait être intéressant d'investiguer, par qPCR, des biofilms *in vivo*, de mener ces expérimentations sur des échantillons de plaque, provenant de patients sains et atteints de pathologies orales (cariées et/ou parodontales), en s'affranchissant de la culture bactérienne. La structure de ces biofilms est complexe et notre biofilm, se limitant à quelques espèces bactériennes uniquement, reflète sommairement la réalité. De plus, certaines espèces bactériennes ont du mal à croître en culture.

CONCLUSION

En raison du fait que les techniques employées, jusqu'à présent, pour l'identification bactérienne du modèle de biofilm oral dynamique pluri-espèces développé au sein du laboratoire de microbiologie de l'UFR d'Odontologie de Bordeaux, se sont limitées à la simple identification des micro-organismes concernés (présence ou absence), nous avons choisi de recourir une autre technique, la PCR quantitative.

L'objectif de notre étude était de procéder à l'identification des bactéries incluses dans ce biofilm, au travers de leur quantification.

Des études bibliographiques, menées antérieurement, nous ont permis de définir des protocoles de qPCR, pour chacune des espèces.

Sur les huit souches inoculées, six ont pu être correctement identifiées : les bactéries du genre *Streptococcus* (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis* et *Streptococcus sobrinus*), *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Le protocole de qPCR que nous avons mis en place a pu être validé pour ces espèces. Nous avons obtenu une bonne spécificité.

Nonobstant les résultats non entièrement analysables, nous avons fondé nos analyses sur des concentrations, et non sur des pourcentages.

Nous avons ainsi pu obtenir les concentrations des six espèces dans le milieu et sur disque et apprécier les différences de concentrations entre les biofilms, suivant les variations environnementales. Des espèces que nous ne parvenions pas à identifier, ou difficilement, par les autres techniques d'identification, ont pu l'être par la qPCR. Cela concerne notamment *Fusobacterium nucleatum*. Nous nous sommes aperçu que les concentrations bactériennes étaient parfois infimes, ce qui explique le fait que les espèces n'aient pas pu être identifiées par d'autres techniques moins spécifiques et précises.

Cette première étape d'investigation semi quantitative dans l'étude d'un modèle de biofilm pluri-espèces dynamique encourage à la poursuite des expérimentations pour affiner les résultats et standardiser leur analyse.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M.** Microbiologie en odonto-stomatologie. Paris: Maloine; 2006.
2. **Poulsen LV.** Microbial Biofilm in Food Processing. *LWT - Food Science and Technology.* sept 1999;32(6):321- 6.
3. **Donlan RM, Costerton JW.** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews.* 1 avr 2002;15(2):167- 93.
4. **Tremblay YDN, Hathroubi S, Jacques M.** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res.* avr 2014;78(2):110- 6.
5. **Characklis WG, Marshall KC,** éditeurs. *Biofilms.* New York: Wiley; 1990. 796 p. (Wiley series in ecological and applied microbiology).
6. **Marsh PD.** Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6(Suppl 1):S14.
7. **Marsh PD.** Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Diseases.* juin 2003;9(s1):16- 22.
8. **Marsh PD, Martin M.** *Oral microbiology.* 5th ed. Edinburgh ; New York: Elsevier; 2009. 222 p.
9. **Jhajharia K, Mehta L, Parolia A, Shetty K.** Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry.* 2015;5(1):1.
10. **Mouton C.** *Bactériologie bucco-dentaire.* Paris: Masson; 1994.
11. **Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ.** Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* sept 2002;66(3):486- 505, table of contents.
12. **Sutherland IW.** The biofilm matrix--an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.* mai 2001;9(5):222- 7.
13. **Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE.** Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* nov 2005;43(11):5721- 32.
14. **Saini R, Saini S, Sharma S.** **Biofilm: A dental microbial infection.** *J Nat Sci Biol Med.* janv 2011;2(1):71- 5.
15. **Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL.** Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* févr 1998;25(2):134- 44.
16. **Henrici AT.** *Studies of Freshwater Bacteria: I. A Direct Microscopic Technique.* *J Bacteriol.* mars 1933;25(3):277- 87.
17. **Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.** How bacteria stick. *Sci Am.* janv 1978;238(1):86- 95.
18. **Geesey GG, Richardson WT, Yeomans HG, Irvin RT, Costerton JW.** Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol.* déc 1977;23(12):1733- 6.
19. **Costerton JW.** The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev Infect Dis.* oct 1984;6 Suppl 3:S608-616.
20. **Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW.** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun.* mai 1980;28(2):546- 56.
21. **Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C.** From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 13 mai 2013;2(2):288- 356.
22. **McBain AJ.** Chapter 4 In Vitro Biofilm Models. In: *Advances in Applied Microbiology* [Internet]. Elsevier; 2009 [cité 27 oct 2017]. p. 99- 132. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216409690043>
23. **Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al.** Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* déc 1985;22(6):996- 1006.
24. **Coenye T, Nelis HJ.** In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods.* nov 2010;83(2):89- 105.
25. **Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al.** A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol.* déc 2012;113(6):1540- 53.
26. **Schaudinn C, Jaramillo D, Freire MO, Sedghizadeh PP, Nguyen A, Webster P, et al.** Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth. *Int Endod J.* oct 2013;46(10):930- 7.
27. **Darrene L-N, Cecile B.** Experimental Models of Oral Biofilms Developed on Inert Substrates: A Review of the Literature. *Biomed Res Int* [Internet]. 2016 [cité 27 oct 2017];2016.
28. **Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA.** Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* juill 2005;Chapter 1:Unit 1B.1.
29. **Guggenheim B, Guggenheim M, Gmür R, Giertsen E, Thurnheer T.** Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res.* juin 2004;38(3):212- 22.
30. **Guggenheim B, Giertsen E, Schüpbach P, Shapiro S.** Validation of an in vitro Biofilm Model of Supragingival Plaque. *J Dent Res.* 1 janv 2001;80(1):363- 70.
31. **Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A.** The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol.* 6 janv 1999;37(6):1771- 6.
32. **Sim CPC, Dashper SG, Reynolds EC.** Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent.* juill 2016;50:1- 11.
33. **Xuelian H, Qiang G, Biao R, Yuqing L, Xuedong Z.** Models in Caries Research. In: *Dental Caries* [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2016 [cité 27 oct 2017]. p. 157- 73. Disponible sur: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-47450-1_9
34. **Palmer RJ.** Microscopy flowcells: perfusion chambers for real-time study of biofilms. *Meth Enzymol.* 1999;310:160- 6.
35. **Hodgson RJ, Lynch RJ, Watson GK, Labarbe R, Treloar R, Allison C.** A continuous culture biofilm model of cariogenic responses. *J Appl Microbiol.* mars 2001;90(3):440- 8.
36. **Foster JS, Kolenbrander PE.** Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol.* juill 2004;70(7):4340- 8.
37. **Pratten J.** Growing oral biofilms in a constant depth film fermentor (CDFF). *Curr Protoc Microbiol.* août 2007;Chapter 1:Unit 1B.5.
38. **Sharma P, Rozenbaum RT, Woudstra W, de Jong ED, van der Mei HC, Busscher HJ, et al.** A constant depth film fermenter to grow microbial biofilms. *Protocol Exchange* [Internet]. 8 mars 2017 [cité 27 oct 2017];
39. **Ledder RG, McBain AJ.** An in vitro comparison of dentifrice formulations in three distinct oral microbiotas. *Archives of Oral Biology.* 1 févr 2012;57(2):139- 47.
40. **McBain AJ, Sissons C, Ledder RG, Sreenivasan PK, De Vizio W, Gilbert P.** Development and characterization of a simple perfused oral microcosm. *J Appl Microbiol.* 2005;98(3):624- 34.
41. **Tang G, Yip H-K, Cutress TW, Samaranyake LP.** Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* mars 2003;31(3):161- 71.
42. **Rahim ZHA, Fathilah AR, Irwan S, Nordini Hasnor WIW.** An Artificial Mouth System (NAM Model) for Oral Biofilm Research. *Research Journal of Microbiology.* 1 juin 2008;3(6):466- 73.
43. **Sissons CH, Cutress TW, Hoffman MP, Wakefield JS.** A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res.* nov 1991;70(11):1409- 16.
44. **Long SS, Prober CG, Fischer M.** Principles and practice of pediatric infectious diseases [Internet]. 2018 [cité 27 oct 2017].

45. **Juzan L, Pernelle JJ, Dabert P.** Les outils de la biologie moléculaire pour l'analyse microbiologique des boues activées. *Sciences Eaux & Territoires.* 2012;(9).
46. **Bailey WR, Finegold SM, Martin WJ, Scott EG.** Bailey and Scott's Diagnostic microbiology: a textbook for the isolation and identification of pathogenic microorganisms. 5th ed. Saint Louis: C. V. Mosby; 1978. 514 p.
47. **Freney J.** Précis de bactériologie clinique. Paris: Éd. Eska; 2007.
48. **Venter LNS, Lotter H L, Haas D, MacDonald DW.** The use of the analytical profile index in the identification of activated sludge bacteria: problems and solutions. *Water SA.* 1 oct 1989;15(4):265- 7.
49. **Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P.** The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *J Clin Microbiol.* déc 2005;43(12):6123- 5.
50. **Huybens N, Mainil J, Marnier D.** Les techniques de biologie moléculaire d'analyse des populations bactériennes complexes. *Annales de médecine vétérinaire.* 2009;(153):112- 28.
51. **Roux V, Rolain JM.** Identification des bactéries par biologie moléculaire. EMC - Maladies infectieuses. 2014;11(1):1- 11.
52. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** Gel Electrophoresis of DNA. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. New-York: Sambrook, J., Fritsch, E.F. et Maniatis, T. (eds.); (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
53. **Westemeier R.** Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations [Internet]. Weinheim, FRG: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004 [cité 27 oct 2017]. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527603468>
54. **Hilario E.** Overview of hybridization and detection techniques. *Methods Mol Biol.* 2007;353:27- 38.
55. **Volpi E, Bridger J.** FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques.* oct 2008;45(4):385- 409.
56. **Rack K.** Apport des techniques d'hybridation in situ fluorescente (FISH) dans les hémopathies malignes. 1998. 241 p.
57. **Brown T.** Dot and slot blotting of DNA. *Curr Protoc Mol Biol.* mai 2001;Chapter 2:Unit2.9B.
58. **Kamal R, Dayal R, Katoch VM, Katoch K.** Analysis of gene probes and gene amplification techniques for diagnosis and monitoring of treatment in childhood leprosy. *Lepr Rev.* juin 2006;77(2):141- 6.
59. **Vassias I.** LCR (ligase chain reaction). EMC - Biologie médicale. 2003;12(1).
60. **Vassias I.** ADN branché ou bDNA. EMC - Biologie médicale. 2012;7(1):1- 3.
61. **Mullis KB.** Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris).* 1990;48(8):579- 82.
62. **Vassias I.** Principe de l'amplification en chaîne par polymérase. EMC - Biologie médicale. 2012;7(1):1- 5.
63. **Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D.** A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods.* mai 2007;69(2):330- 9.
64. **Garibyan L, Avashia N.** Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* mars 2013;133(3):e6.
65. **Maubon D, Brenier-Pinchart M-P, Fricker-Hidalgo H, Pelloux H.** Real-time PCR in the diagnosis of toxoplasmosis: the way to standardisation?. *Pathol Biol.* juill 2007;55(6):304- 11.
66. **Demeke T, Ratnayaka I, Phan A.** Effects of DNA extraction and purification methods on real-time quantitative PCR analysis of Roundup Ready soybean. *J AOAC Int.* août 2009;92(4):1136- 44.
67. **Bustin SA.** A-Z of quantitative PCR. La Jolla, CA: International University Line; 2004. 882 p. (IUL biotechnology series).
68. **VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM.** Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *BioTechniques.* avr 2008;44(5):619- 26.
69. **Tse C, Capeau J.** [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. *Ann Biol Clin (Paris).* juin 2003;61(3):279- 93.
70. **Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY).* avr 1992;10(4):413- 7.
71. **Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* oct 2000;25(2):169- 93.
72. **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A.** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 15 mars 2002;30(6):1292- 305.
73. **Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K.** Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* juin 1995;4(6):357- 62.
74. **Kreuzer K-A, Bohn A, Lass U, Peters U, Schmidt C.** Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. *Molecular and Cellular Probes.* avr 2000;14(2):57- 60.
75. **Tajadini M, Panjehpour M, Javanmard SH.** Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Adv Biomed Res [Internet].* 28 févr 2014 [cité 28 oct 2017];3.
76. **Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C.** Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania. *Parassitologia.* juin 2004;46(1- 2):163- 7.
77. **Dooms M, Chango A, Abdel-Nour A.** Quantitative PCR (qPCR) and the Guide to good practices MIQE: adapting and relevance in the clinical biology context. *Annales de Biologie Clinique.* 2014;56(3):265-269.
78. **Peccoud J.** La PCR quantitative : un nouvel outil pour l'analyse médicale. *Dossier technique médecine / sciences.* 1993;9(12):1378- 85.
79. **Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK.** Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. *J Clin Microbiol.* juin 2001;39(6):2065- 71.
80. **Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, et al.** Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol.* nov 2011;49(11):3892- 904.
81. **Clementi M, Menzo S, Bagnarelli P, Manzin A, Valenza A, Varaldo PE.** Quantitative PCR and RT-PCR in virology. *PCR Methods Appl.* févr 1993;2(3):191- 6.
82. **Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al.** Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol.* nov 2004;42(11):5189- 98.
83. **Engelmann I, Petzold DR, Kosinska A, Hepkema BG, Schulz TF, Heim A.** Rapid quantitative PCR assays for the simultaneous detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human herpesvirus 6 DNA in blood and other clinical specimens. *J Med Virol.* mars 2008;80(3):467- 77.
84. **Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne P-A, Peres-Bota D, Liesnard C.** Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Microbiol Methods.* juin 2005;61(3):381- 7.
85. **Emeline S, Bellanger A-P, Iriart X, Dupont D, Guitard J, Gabriel F, et al.** Détection d'ADN de mucorales par PCR quantitative dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire : intérêt pour le diagnostic des mucormycoses. *Journal de Mycologie Médicale.* 1 sept 2017;27(3):e13.
86. **Alary R, Gautier M-F, Joudrier P.** La PCR quantitative en temps réel : application à la quantification des OGM. *OCL.* 9(6):468- 73.
87. **Remize F, Tessonière H, Bach B, Massini L, Barnavon L.** Quantification de Brettanomyces dans les vins : Développement et validation d'une méthode directe, sensible et fiable par PCR quantitative. 2008.
88. **Longin C, Julliat F, Serpaggi V.** Quantification des Brettanomyces par qPCR: Étude de la fiabilité, répétabilité et reproductibilité des kits. *Revue des oenologues et des techniques vitivinicoles et oenologiques: magazine trimestriel d'information professionnelle.* 2017;44(164):53- 6.
89. **Vitali B, Candela M, Matteuzzi D, Brigidi P.** Quantitative Detection of Probiotic Bifidobacterium Strains in Bacterial Mixtures by Using Real-time PCR. *Systematic and Applied Microbiology.* janv 2003;26(2):269- 76.
90. **Gueimonde M, Debtor L, Tölkö S, Jokisalo E, Salminen S.** Quantitative assessment of faecal bifidobacterial populations by real-time PCR using lanthanide probes. *Journal of Applied Microbiology.* 8 sept 2006;0(0):061120055200067- ???
91. **Lauri A, Mariani PO.** Potentials and limitations of molecular diagnostic methods in food safety. *Genes Nutr.* mars 2009;4(1):1- 12.

92. **Li J, Han J, Hu Y, Yang J.** Selection of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR during Flower Development in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.). *Front Plant Sci* [Internet]. 21 avr 2016 [cité 28 oct 2017];7.
93. **Zeng S, Liu Y, Wu M, Liu X, Shen X, Liu C, et al.** Identification and validation of reference genes for quantitative real-time PCR normalization and its applications in lycium. *PLoS ONE*. 2014;9(5):e97039.
94. **Leung WTM, Thomas-Walters L, Garner TWJ, Balloux F, Durrant C, Price SJ.** A quantitative-PCR based method to estimate ranavirus viral load following normalisation by reference to an ultraconserved vertebrate target. *J Virol Methods*. nov 2017;249:147- 55.
95. **Cassler M, Peterson CL, Ledger A, Pomponi SA, Wright AE, Winegar R, et al.** Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. *Microb Ecol*. avr 2008;55(3):384- 94.
96. **Smith CJ, Osborn AM.** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. janv 2009;67(1):6- 20.
97. **Millhouse E, Jose A, Sherry L, Lappin DF, Patel N, Middleton AM, et al.** Development of an in vitro periodontal biofilm model for assessing antimicrobial and host modulatory effects of bioactive molecules. *BMC Oral Health*. 28 juin 2014;14:80.
98. **Suzuki N, Nakano Y, Yoshida A, Yamashita Y, Kiyoura Y.** Real-Time TaqMan PCR for Quantifying Oral Bacteria during Biofilm Formation. *J Clin Microbiol*. août 2004;42(8):3827- 30.
99. **Suzuki N, Yoshida A, Nakano Y.** Quantitative analysis of multi-species oral biofilms by TaqMan Real-Time PCR. *Clin Med Res*. août 2005;3(3):176- 85.
100. **Sherry L, Lappin G, O'Donnell LE, Millhouse E, Millington OR, Bradshaw DJ, et al.** Viable Compositional Analysis of an Eleven Species Oral Polymicrobial Biofilm. *Front Microbiol* [Internet]. 10 juin 2016 [cité 28 oct 2017];7.
101. **Dalwai F, Spratt DA, Pratten J.** Use of Quantitative PCR and Culture Methods To Characterize Ecological Flux in Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1 sept 2007;45(9):3072- 6.
102. **Park S-N, Park J-Y, Kook J-K.** Development of Porphyromonas gingivalis-specific quantitative real-time PCR primers based on the nucleotide sequence of rpoB. *J Microbiol*. avr 2011;49(2):315- 9.
103. **Ammann TW, Bostanci N, Belibasakis GN, Thurnheer T.** Validation of a quantitative real-time PCR assay and comparison with fluorescence microscopy and selective agar plate counting for species-specific quantification of an in vitro subgingival biofilm model. *J Periodont Res*. août 2013;48(4):517- 26.
104. **Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T.** Development of a 5' Nuclease-Based Real-Time PCR Assay for Quantitative Detection of Cariogenic Dental Pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol*. sept 2003;41(9):4438- 41.
105. **Kuribayashi M, Kitasako Y, Matin K, Sadr A, Shida K, Tagami J.** Intraoral pH measurement of carious lesions with qPCR of cariogenic bacteria to differentiate caries activity. *J Dent*. mars 2012;40(3):222- 8.
106. **Tomás I, Regueira-Iglesias A, López M, Arias-Bujanda N, Novoa L, Balsa-Castro C, et al.** Quantification by qPCR of Pathobionts in Chronic Periodontitis: Development of Predictive Models of Disease Severity at Site-Specific Level. *Front Microbiol*. 2017;8:1443.
107. **Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ.** Quantitative real-time PCR for Porphyromonas gingivalis and total bacteria. *J Clin Microbiol*. juin 2000;38(6):2362- 5.
108. **Maeda H, Fujimoto C, Haruki Y, Maeda T, Kokeguchi S, Petelin M, et al.** Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, tetQ gene and total bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 24 oct 2003;39(1):81- 6.
109. **Kuboniwa M, Amano A, Kimura KR, Sekine S, Kato S, Yamamoto Y, et al.** Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. *Oral Microbiol Immunol*. juin 2004;19(3):168- 76.
110. **Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Martín C, Silva A.** Quantitative real-time polymerase chain reaction based on single copy gene sequence for detection of periodontal pathogens. *J Clin Periodontol*. déc 2004;31(12):1054- 60.
111. **Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D, Silva A.** Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. oct 2003;38(5):518- 24.
112. **Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A.** Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol*. déc 2004;31(12):1061- 9.
113. **Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K.** Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. oct 2004;59(1):117- 25.
114. **Hyvärinen K, Laitinen S, Paju S, Hakala A, Suominen-Taipale L, Skurnik M, et al.** Detection and quantification of five major periodontal pathogens by single copy gene-based real-time PCR. *Innate Immun*. août 2009;15(4):195- 204.
115. **Salminen A, Kopra KAE, Hyvärinen K, Paju S, Mäntylä P, Buhlin K, et al.** Quantitative PCR analysis of salivary pathogen burden in periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2015 [cité 28 oct 2017];5.
116. **Periodontal Pathogens Using Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR).** *Methods Mol Biol*. 2017;1537:191- 202.
117. **Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA.** Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque: comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. janv 2000;39(2):97- 107.
118. **Chonsui H.** Thèse : Mise en place d'un modèle dynamique de biofilm pluri-espèces. 2017.

ANNEXES

ANNEXE 1 : COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE LIQUIDES ET GELOSES UTILISES

> LES MILIEUX LIQUIDES

○ Milieu FUM

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	3,0 g
Hémine	2,0 mg
Ménadione	1,0 mg
Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Dithiothréitol	0,1 g
NaCl	2,9 g
Na ₂ CO ₃	0,5 g
KNO ₃	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,45 g
KH ₂ PO ₄	0,45 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,9 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,188 g
pH ≈ 7,00	

○ Milieu FUMe

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Milieu FUM	1 L
Glucose	1,5 g
Saccharose	1,5g

○ Bouillon « ANA »

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Agar	0,75 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	3,5 g
<i>Wilkins Chalgren Anaerobe</i>	16,5 g
<i>Brain Heart Infusion</i>	18,5 g
Thioglycolate de sodium	0,75 g
Hémine	0,1 g
Vitamine K1	0,002 g
pH = 7,4 ± 0,2 à 25°C	

○ Bouillon Brain Heart Infusion (Oxoid™) - Cystéine

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Infusion de cervelle de veau	12,5 g
Infusion de cœur de bœuf	5,0 g
Protéose-peptone	10 g
Glucose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Chlorhydrate de cystéine	1,0 g
pH = 7,4 ± 0,2 à 25°C	

○ Bouillon Tryptone-Soja (Oxoid™)

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Hydrolysât pancréatique de caséine	17,0 g
Hydrolysât enzymatique de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate de potassium	2,5 g
Glucose	2,5 g
pH = 7,3 ± 0,2 à 25°C	

○ **Bouillon Wilkins Chalgren Anaerobe (Oxoid™)**

Quantité pour 1 L d'eau distillée :

Tryptone	10,0 g
Peptone de gélatine	10,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
L-arginine	1,0 g
Pyruvate de sodium	1,0 g
Ménadione	0,0005 g
Hémine	0,005 g
pH = 7,1 ± 0,2 à 25°C	

➤ **LES MILIEUX GELOSES**

○ **Gélose Columbia au sang (Oxoid™)**

Quantité pour 1 L :

Peptone spéciale	23,0 g
Amidon	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	10,0 g
Sang défibriné	50,0 mL
pH = 7,3 ± 0,2 à 25°C	

○ **Gélose Fastidious Anaerobe Agar à la vancomycine et au sang**

Quantité pour 1 L :

Peptone	23,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Amidon	1,0 g
Bicarbonate de sodium	0,4 g
Glucose	1,0 g
Pyruvate de sodium	1,0 g
Chlorhydrate de cystéine	0,5 g
Pyrophosphate de sodium	0,25 g
L-arginine	1,0 g
Succinate sodique	0,5 g
Hémine	0,01 g
Vitamine K1	0,001 g
Vancomycine	0,004 g
Agar	12,0 g
Sang défibriné	50,0 mL
pH = 7,2 +/- 0,2 à 25°C	

○ **Gélose Schaedler au sang**

Quantité pour 1 L :

Peptone tryptone-soja	10,0 g
Peptone spéciale	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorhydrate de cystéine	0,4 g
Hémine	0,01 g
Glucose	5,0 g
Tampon TRIS	0,75 g
Agar	13,5 g
Sang défibriné	50,0 mL
pH = 7,6	

ANNEXE 2 : PROTOCOLE DE LA COLORATION DE GRAM

- 1) Nettoyer une lame de verre à l'alcool et y déposer une goutte d'H₂O stérile.
- 2) Prélever une colonie à l'aide d'une pipette Pasteur préalablement passée dans la flamme d'un bec Bunsen et les mettre en suspension dans la goutte d'eau stérile.
- 3) Sécher la lame sur une plaque chauffante.
- 4) Fixer l'échantillon en passant la lame 3 fois dans la flamme d'un bec Bunsen.
- 5) Déposer quelques gouttes de solution de cristal violet et laisser agir 1 min.
- 6) Eliminer l'excès de colorant, puis rincer à l'eau.
- 7) Déposer quelques gouttes de lugol et laisser agir 1 min.
- 8) Eliminer l'excès de colorant, puis rincer à l'eau.
- 9) Décolorer rapidement à l'alcool, puis rincer à l'eau.
- 10) Déposer quelques gouttes de safranine et laisser agir 1 min.
- 11) Eliminer l'excès de colorant, puis rincer à l'eau.
- 12) Sécher la lame sur une plaque chauffante.
- 13) Déposer une goutte d'huile à immersion et observer au microscope au grossissement x1000

ANNEXE 3 : PROTOCOLES D'EXTRACTION DE L'ADN

GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich, France)

1) PREPARATION DES REACTIFS DU KIT D'EXTRACTION

1. Mélange des réactifs

- Examiner les réactifs. Si certains forment un précipité, les réchauffer entre 55 et 65°C jusqu'à dissolution et les ramener à la température de la pièce avant de les utiliser.

2. Dilution du concentré de solution de lavage

- Diluer le concentré dans 80mL (pack de 70 préparations) d'éthanol à 95-100%.
- Après chaque utilisation, bien refermer la solution diluée pour éviter l'évaporation de l'éthanol.

3. Reconstitution de la protéinase K

- Dissoudre la poudre dans 0,5mL d'eau (pack 70 préparations) pour obtenir une solution à 20 mg/mL.
- La solution peut être conservée quelques jours entre 2 et 8°C. Pour une conservation plus longue, elle doit être stockée à -20°C.

4. Préparation de la solution de lysozyme (à réaliser le jour de la préparation)

- Pour chaque échantillon, 200µL de solution de lysozyme sont nécessaires. Prévoir une marge pour les erreurs de pipetage.
- Préparer $2,115 \times 10^6$ unité/mL de la solution de stockage de lysozyme (L7651) en utilisant la solution de lyse gram positif (L7539) comme diluant.
- Dissoudre le lysozyme en pipetant ou en vortexant le mélange.

2) PREMIERES ETAPES DE L'EXTRACTION D'ADN DES BACTERIES A GRAM POSITIF

1. Préchauffer un bain-marie ou une étuve à 37°C et à 55°C.

2. Préparation de la solution de lysozyme

3. Recueil des cellules :

- Centrifuger 1,5mL de culot d'une culture overnight de bactéries à 12000-16000g (16400 rpm) pendant 2 min.
- Eliminer le surnageant.

4. Dissolution du culot

- Dissoudre complètement le culot dans 200µL de solution de lysozyme.
- Incuber à 37°C pendant 30 minutes.

5. Traitement optionnel par RNase A

- Ajouter 20µL de la solution de RNase A (R6148).
- Mélanger et incuber à température ambiante pendant 2 min.

6. 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 sec (un mélange homogène est essentiel pour une bonne lyse).
- Incuber à 55°C pendant 10 min.

Passer à la suite du protocole

3) PREMIERES ETAPES DE L'EXTRACTION D'ADN DES BACTERIES A GRAM NEGATIF

1. Préchauffer un bain-marie ou une étuve à 55°C.

2. Recueil des cellules

- Centrifuger 1,5 mL de culot d'une culture overnight de bactéries à 12000-16000g (16400 rpm) pendant 2 min.
- Eliminer le surnageant.

3. Suspension des cellules

- Mettre les cellules en suspension dans 180 µL de solution de lyse T.

4. Traitement optionnel par RNase A

- Ajouter 20µL de la solution de RNase A (R6148).
- Mélanger et incuber à température ambiante pendant 2 min.

5. Préparation de la lyse des cellules

- Ajouter 20µL de la solution de protéinase K dans l'échantillon.
- Mélanger et incuber à 55°C pendant 30 min.

6. Lyse des cellules

- Ajouter 200µL de la solution de lyse C (B8803).
- Vortexer complètement environ 15 sec (un mélange homogène est essentiel pour une lyse efficace).
- Incuber à 55°C pendant 10 min.

Passer à la suite du protocole

SUITE DU PROTOCOLE D'EXTRACTION DE L'ADN DES BACTERIES A GRAM POSITIF ET NEGATIF

1. Préparation de la colonne

- Ajouter 500µL de la solution de préparation de la colonne dans chaque colonne pré-assemblée (bague rouge), positionnée dans un tube à récolte de 2mL.
- Centrifuger à 12000g (13500 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer le surnageant mais conserver le tube à récolte.

2. Préparation du liant

- Ajouter 200µL d'éthanol à 95-100% au lysat.
- Vortexer 5 à 10 sec (une bonne homogénéité est importante).

3. Chargement du lysat

- Transférer la totalité du tube dans la colonne (utiliser une pipette à large embout pour éviter que l'ADN ne se déchire).
- Centrifuger à plus de 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer l'ancien tube de récolte qui contient le surnageant et placer la colonne dans un nouveau tube à récolte.

4. Premier lavage

- Ajouter 500µL de la solution de lavage 1 (W0263) dans la colonne.
- Centrifuger à plus de 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- Eliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer à nouveau la colonne dans un nouveau tube à récolte.

5. Second lavage

- Ajouter 500µL de solution de lavage dans la colonne.
- Centrifuger à vitesse maximale (16400 rpm) pendant 3 min pour sécher la colonne.
- Vérifier que la colonne ne contienne pas d'éthanol avec de faire l'élution de l'ADN (Si de l'éthanol est encore visible, centrifuger à vitesse maximale pendant 1 min supplémentaire en vidant et ré-utilisant le tube à récolte).
- Eliminer l'ancien tube à récolte qui contient le surnageant et placer la colonne dans un nouveau tube à récolte.

6. Elution de l'ADN

- Pipeter 200µL de la solution d'élution (B6803) directement sur le centre la colonne (pour augmenter l'efficacité, incubé 5 min à température ambiante).
- Centrifuger à au moins 6500 g (7345 rpm) pendant 1 min.
- L'éluat contient l'ADN génomique pur. Pour une conservation à court terme, stocker à 2-8°C. Pour une conservation plus longue, il est recommandé de stocker à -20°C.

ANNEXE 4 : BIOFILMS MIS EN PLACE

N°	Bactéries incluses +/- Variations environnementales	Milieux	Disque	Géloses	
1	SS SO AV PG FN	A1 1	B1		
		A1 2			
		A1 3			
2	SM AV PG FN avec apport de glucose uniquement	A2 2	B2		
		A2 3			
		A2 3			
3	SS SO AV PG FN avec apport de glucose + saccharose	A3 1	B3		
		A3 2			
		A3 3			
4	SM AV PG FN avec apport de glucose uniquement	A4 1	B4		
		A4 2			
		A4 3			
5	SM AV PG FN avec apport de glucose uniquement	A5 1	B5		
		A5 2			
		A5 3			
6	SM AV PG FN avec apport de glucose uniquement	A6 1	B6		
		A6 2			
		A6 3			
7	SS SO AV PG FN avec apport de glucose + saccharose	A7 1	B7		
		A7 2			
		A7 3			
8	SM SO AV PG FN AA	A8 1	B8		
		A8 2			
		A8 3			
9	SM SO AV PG FN AA avec apport de glucose + saccharose	A9 1	B9	G9 M	G9 D
		A9 2			
		A9 3			
10	SM SO AV PG FN TF avec apport de glucose + saccharose	A10 1	B10	G10 M	G10 D
		A10 2			
		A10 3			
11	SM SO AV PG FN AA TF avec apport de glucose + saccharose	A11 1	B11	G11 M	G11 D
		A11 2			
		A11 3			
12	SM SO AV PG FN AA TF + Probiotique (ajouté à J+2) avec apport de glucose + saccharose	A12 1	B12	G12 M	G12 D
		A12 2			
		A12 3			
13	SM SO AV PG FN AA TF + Probiotique (ajouté dès le début) avec apport de glucose + saccharose	A13 1	B13	G13 M	G13 D
		A13 2			
		A13 3			
14	SM SO AV PG FN AA TF à pH=4 dans l'erenmeyer et la bouteille avec apport de glucose + saccharose	A14 1			
		A14 2			
		A14 3			
15	SM SO AV PG FN AA TF avec FUMe (en glucose et saccharose) dans l'erenmeyer et la bouteille	A15 1			
		A15 2			
		A15 3			
16	SM SO AV PG FN AA TF avec FUM dans l'erenmeyer et la bouteille	A16 1	B16		
		A16 2			
		A16 3			
17	SM SO AV PG FN AA TF à pH = 4 dans l'erenmeyer et la bouteille avec apport de glucose + saccharose	A17 1	B17		
		A17 2			
		A17 3			
18	SM SO AV PG FN AA TF avec FUMe (en glucose et saccharose) dans l'erenmeyer et le flacon	A18 1	B18		
		A18 2			
		A18 3			

**ANNEXE 5 : COMPOSITION DES MELANGES REACTIONNELS PREPARES POUR
LA QPCR**

Mélange réactionnel préparé à partir du mix iQTM SYBR® Green Supermix pour <i>S. oralis</i>, <i>S. mutans</i>, <i>P. gingivalis</i>, <i>F. nucleatum</i>, <i>T. forsythia</i> et <i>A. actinomycetemcomitans</i>	
Quantité pour 20 µL :	
iQ TM SYBR® Green Supermix (2x)	10 µL
Amorces sens et anti-sens	0,6 µL/amorce
Échantillon d'ADN	1 µL
H ₂ O	7,8 µL
Mélange réactionnel préparé à partir du mix iQTM Supermix pour <i>A. viscosus</i>	
Quantité pour 20 µL :	
iQ TM Supermix (2x)	10 µL
Amorces sens et anti-sens	0,6 µL/amorce
Sonde fluorescente (FAM-TAMRA)	0,6 µL
Échantillon d'ADN	1 µL
H ₂ O	7,2 µL

ANNEXE 7 : RESULTATS OBTENUS PAR IDENTIFICATION BACTERIENNE PAR COLORATION DE GRAM

Les biofilms		Les espèces inoculées	SM SO SS	AV	PG	FN	AA	TF
Biofilm 2 : - SM AV PG FN - Enrichissement au glucose - pH = 4,4	Milieu	+	+	+	+	+		
	Disque	+		+	+	+		
Biofilm 3 : - SS SO AV PG FN - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 5,4	Milieu		+	+	-			
	Disque	+	+	+				
Biofilm 4 : - SM AV PG FN - Enrichissement au glucose - pH = 4,23	Milieu	+		+	-			
	Disque			+	-			
Biofilm 5 : - SM AV PG FN - Enrichissement au glucose - pH = 4,36	Milieu	+	+	+	+			
	Disque	+	+	+	+			
Biofilm 6 : - SM AV PG FN - Enrichissement au glucose - pH = 4,7	Milieu	+	+	+	+			
	Disque	+	+	+	+			
Biofilm 7 : - SS SO AV PG FN - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 5	Milieu	+		+	-			
	Disque	+	+					
Biofilm 9 : - SO SM AV PG FN AA - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 4,55	Milieu	+	+	+	-	+		
	Disque	+	+	+	-			
Biofilm 10 : - SO SM AV PG FN TF - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 4,5	Milieu	+	+	+	-			+
	Disque	+	+	+	-			+
Biofilm 11 : - SO SM AV PG FN AA TF - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 5,3	Milieu	+	+	+	-	+	+	+
	Disque	+	+	+	-	+	+	+
Biofilm 12 : - SO SM AV PG FN AA TF + Probiotiques (ajout à J+2) - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 4,75	Milieu	+	+	+	+	+	+	+
	Disque	+	+	+		+	+	+
Biofilm 13 : - SO SM AV PG FN AA TF + Probiotiques (dès le début) - Enrichissement au glucose et au saccharose - pH = 4,5	Milieu	+	+	+	-	+	+	+
	Disque	+	+	+		+	+	+
Biofilm 16 : - SO SM AV PG FN AA TF - Pas d'enrichissement (FUM) - pH = 4,6	Milieu	+	+	+	-	+	+	+
	Disque	+	+	+		+		
Biofilm 17 : - SO SM AV PG FN AA TF - Enrichissement au glucose et au saccharose + Enrichissement du milieu de croissance - pH = 4,68	Milieu	+	+	+	-	+		
	Disque	+	+	+	-	+		
Biofilm 18 : - SO SM AV PG FN AA TF - pH 4 des milieux de renouvellement et de croissance - pH = 4,2	Milieu	+		+	-	+		
	Disque	+	+	+	-	+	+	+

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 :