



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMCEM
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers



Département de biologie

Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à
l'environnement
« LAMAABE »

**Mémoire du master
Présenté par**

M^{lle} DIDI DJIHANE

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Sciences biologiques

Option : Microbiologie Fondamentale

Intitulé du thème

**Actions anti-biofilm sur des souches
buccodentaires**

Soutenue le 19 juin 2022, devant le jury composé de

Présidente	HASSAINE Hafida	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	KARA TERKI Ibtissem	MCA	Université de Sidi Belabes
Promotrice	BELLIFA Samia	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

A l'instar de mon cursus universitaire des cinq dernières années, mes remerciements les plus sincères vont à tous mes professeurs et à titre exceptionnel, mon encadreur M^{me} S. BELLIFA pour ses précieux conseils, sa disponibilité et son dévouement continu et sans relâche pendant l'élaboration de ce mémoire.

Mes remerciements s'adressent aussi aux jurys, présidente M^{me} H.HASSAINE et membre M^{me} I. KARA TERKI pour leur disponibilité faisant de cette soutenance une fin de station honorifique et un souvenir inoubliable

Dédicaces

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce modeste travail à ceux qui quels que soient les termes utilisés, je n'arriverai jamais à leur exprimer mon amour sincère.

A mes très chers parents, mon précieux offre d'ALLAH qui ont cru en moi, qui m'ont protégé, forgé. A ceux qui n'ont jamais cessé de m'aimer, m'orienter, qui m'ont toujours donné le courage d'affronter les différents obstacles et qui ont parfois abandonnés leurs rêves pour me permettre de vivre les miens. A ces êtres les plus précieux à mes yeux qui me doivent ma vie et tout mon respect et qui m'ont doté d'une éducation digne, qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A mes très chères sœurs Chahera et Leila qui ont été toujours présentes pour moi tout au long de mes études pour me soutenir et m'encourager ainsi que mes beaux frères Boumedienne et Yassine.

A mes adorables petites nièces Ines et Dalel qui procurent la joie et le bonheur pour toute la famille.

A tous mes professeurs des différents cycles scolaires et plus particulièrement M^r Boucherif, ex-professeur de Science De La Nature Et De La Vie au lycée qui grâce à lui j'ai adoré ce domaine.

A ma collègue Bellil Hind, qui était toujours à l'écoute pendant l'élaboration de ce mémoire et qui m'a beaucoup orienté et encouragé.

Et finalement, à tous mes amis (es) cavaliers et cavalières ainsi que mes camarades de classe à l'école E-planet.

Je leur remercie pour tous leurs amours, encouragements et leur bienveillance

Résumé

Le biofilm buccal est l'un des problèmes dentaires les plus répandus qui touche plusieurs personnes dans le monde. Il s'adhère à la surface des dents et aux matériaux de restaurations comme les implants et les appareils dentaires causant ainsi des maladies infectieuses. L'objectif de ce travail est de réaliser une synthèse de deux articles sur de nouvelles approches ayant pour but l'inhibition de la formation du biofilm. La première étude portait sur la synthèse d'un polymère zwitterionique à base de poly-carboxybétaine (pCB) en tant que revêtement non salissant pour fournir des propriétés antibactériennes aux surfaces dentaires. Ce nouveau matériau du revêtement constitue une approche innovante pour résister à la formation du biofilm sur les surfaces dentaires. Tandis que, la deuxième étude portait sur l'hypothèse que *Lactobacillus sp* inhibe la croissance, la formation de biofilm et l'expression génétique de *Streptococcus mutans*. Ainsi les changements de conditions de croissance pour le surnageant de *Lactobacillus sp*. neutralisé au pH traité à la catalase ou traité à la trypsine ont été évalués pour identifier les rôles des acides organiques, des peroxydes et de la bactériocine sur l'inhibition de la formation du biofilm. Les résultats obtenus ont montré une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides, la tolérance aux acides et la détection du quorum. De plus, *Lactobacillus sp* a permis l'inhibition des caries dentaires en limitant la virulence de *Streptococcus mutans*.

Mots clés : Biofilm dentaire, Inhibition, Revêtement Zwitterionique, Probiotiques, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp*.

Summary

Oral biofilm is one of the most common dental problems affecting many people around the world. It adheres to tooth surfaces and restorative materials such as implants and braces causing infectious diseases. The objective of this work is to carry out a review of two papers on new approaches to inhibit biofilm formation. The first study focused on the synthesis of a zwitterionic polymer based on poly-carboxybetaine (pCB) as a non-fouling coating to provide antibacterial properties to dental surfaces. This new coating material is an innovative approach to resist biofilm formation on dental surfaces. Whereas, the second study focused on the hypothesis that *Lactobacillus sp.* inhibits the growth, biofilm formation and gene expression of *Streptococcus mutans*. Thus, changes in growth conditions for catalase-treated or trypsin-treated pH-neutralised *Lacobacillus sp.* supernatant were evaluated to identify the roles of organic acids, peroxides and bacteriocin on the inhibition of biofilm formation. The results obtained showed a reduction in the expression of genes involved in exopolysaccharide production, acid tolerance and quorum sensing. In addition, *Lacobacillus sp.* allows the inhibition of dental caries by limiting the growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*.

Key words: Oral biofilm, inhibition, Zwitterionic coating, Probiotics, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp.*

ملخص

الغشاء الحيوي الرقيق عن طريق الفم هو أحد أكثر مشاكل الأسنان انتشارًا والتي تصيب العديد من الأشخاص حول العالم. يلتصق بأسطح الأسنان والمواد التصالحية مثل الغرسات وأجهزة طب الأسنان المسببة للأمراض المعدية. الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسة توليفية لمقالين حول مناهج جديدة تهدف إلى تثبيط تكون الأغشية الحيوية الرقيقة. تضمنت الدراسة الأولى تخليق بوليمر zwitterionic على أساس البولي كربوكسيبيتين (pCB) كطلاء غير متسخ لتوفير خصائص مضادة للبكتيريا لأسطح الأسنان. هذه المادة الاستثمارية الجديدة هي طريقة مبتكرة لمقاومة تكون الأغشية الحيوية على أسطح الأسنان. بينما اعتمدت الدراسة الثانية على فرضية أن *Lactobacillus sp.* يمنع النمو وتكوين الأغشية الحيوية والتعبير الجيني للمكورات العقدية الطافرة. وبالتالي التغييرات في ظروف النمو للطاف من *Lactobacillus sp.* تم تقييم المعالجة بالكتلاز المعادل الأس الهيدروجيني أو المعالج بالتريبسين لتحديد أدوار الأحماض العضوية، والبيروكسيدات، والبكتريوسين في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاضًا في تعبير الجينات المشاركة في إنتاج عديدات السكاريد الخارجية وتحمل الحمض واستشعار النصاب. بالإضافة إلى ذلك، لاكوباسيلوس س. يسمح بتثبيط تسوس الأسنان عن طريق الحد من خصائص النمو والفوعة للمكورات العقدية الطافرة.

الكلمات المفتاحية: البيوفلم الفموي، تثبيط تشكل البيوفيلم، طلاء *Lactobacillus sp. Zwitterionic*

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	2
Chapitre I: Synthèse bibliographique	5
I.1. Le microbiote buccal.....	5
I.1.1. Historique.....	5
I.2. Le biofilm buccal.....	6
I.2.1. Généralités.....	6
I.2.2. Aspect du biofilm.....	7
I.2.3. Composition.....	8
I.3. Etapes de formation du biofilm buccal.....	9
I.3.1. Formation de la pellicule acquise exogène.....	9
I.3.2. Phase d'adhésion réversible.....	10
I.3.3. Phase d'adhésion irréversible.....	10
I.3.4. Formation de micro-colonies.....	11
I.3.5. Phase de maturation.....	12
I.3.6. Phase de détachement.....	12
I.4. Classification de biofilm buccal.....	13
I.4.1. Selon l'habitat.....	13
I.4.2. Selon le pouvoir pathogène.....	15
I.5. Les bactéries du biofilm buccal.....	15
I.5.1. Les Streptocoques.....	16
I.5.2. Les Lactobacilles.....	18
I.5.3. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	19
I.6. Propriétés du biofilm buccal.....	20
I.6.1. Les interactions au sein du biofilm buccal.....	20
I.6.2. La coopération et la co-adhésion en biofilm.....	21
I.6.3. La compétition au sein du biofilm buccal.....	25
I.7. Les actions anti-biofilm.....	25
I.7.1. Inhibition de <i>Streptococcus mutans</i> en ciblant les exopolysaccharides.....	26
I.7.2. Régulation et ciblage de l'expression des gènes liée à la matrice	

exopolysaccharidique.....	26
I.7.3. Système de détection à deux composants.....	26
I.7.4. Inhibition du biofilm buccal par des produits naturels.....	27
I.7.5. L'effet des prébiotiques et les probiotiques sur le biofilm buccal.....	27
Chapitre II : Matériel et Méthodes	31
II.1 Article 1	31
II.1.1. Test de résonance plasmonique de surface.....	31
II.1.2. Synthèse et modification de surface par le pCB-(DOPA) ₄	32
II.1.3. Mesures d'adsorption de protéines non spécifiques.....	33
II.1.4. Test d'adhérence bactérienne.....	33
II.1.5. Analyse statistique.....	34
II.2. Article 2	35
II.2.1. Préparation des surnageants de culture épuisée.....	35
II.2.2. Test antibactérien du surnageant de culture épuisée traité et non traité.....	35
II.2.3. L'effet de <i>Lactobacillus sp.</i> sur l'adhérence de <i>Streptococcus mutans</i>	36
II.2.4. L'effet de surnageant de culture épuisée de <i>Lactobacillus sp.</i> sur le biofilm préformé de <i>Streptococcus mutans</i>	36
II.2.5. Observation au microscope électronique à balayage du biofilm des co-cultures de <i>Streptococcus mutans</i> - <i>Lactobacillus sp.</i>	37
II.2.6. Extraction de l'ARN bactérien total.....	37
II.2.7. Réaction en chaîne par polymérisation quantitative en temps réel (qRT-PCR) et analyse des données.....	38
II.2.8. Analyse statistique.....	38
Chapitre III : Résultats et discussion	39
III.1. Article 1	39
III.1.1. Résistance de la pellicule salivaire aux pCB.....	39
III.1.2. Revêtement du pCB-(DOPA) ₄ sur la surface HA	41
III.1.3. Adsorption protéique non spécifique sur la surface HA revêtue de pCB-(DOPA) ₄ ...	42
III.1.4 Effet anti-adhésion du pCB-(DOPA) ₄ sur HA et sur surface émaillée.....	44
III.2. Article 2	46
III.2.1. Effet de diffusion de l'agar.....	
III.2.2 Effet du surnageant <i>Lactobacillus sp.</i> sur <i>Streptococcus mutans</i>	49
III.2.3 Effets des surnageants filtrés de <i>Lactobacillus sp.</i> sur l'adhérence à <i>Streptococcus</i>	50

mutans et sur le biofilm préformé

III.2.4 Résultats de la qPCR.....	55
Conclusion	61
Références bibliographiques	63
Webographie	71
Annexes	73

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine tri-phosphate

ADP : Adénosine di-phosphate

ADS : Arginine déiminase

ANOVA : Analyse de la variance

BSA : Sérum albumine bovine

BHI : Gélose cœur- cerveau

CSP : Peptide stimulant la compétence

CRISPR-Cas : Répétitions palindromiques courtes espacées régulièrement en grappes

CB : Carboxy-bétaine

DNase : Désoxyribonucléase

DOPA : L-3,4-dihydroxyphénylalanine.

DO : Densité optique

EC : Catéchines épicatechines

EGC : Epigalocatechines

ECG : Epicatechines gallate

EGCG : Epigalocatechines gallate

FTF : Fructotransférase

FimA : Protéine principale et structurale des pili de type I

F. nucleatum : Fusobacterium nucleatum

GTFs : Glucosyltransférases

GC : Bases azotées Guanine et Cytosine

GCF : Fluide crévulaire gingival

HK : Histidine Kinase

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HA : Hydroxyapatite

IgA : Immunoglobuline A

IgG : Immunoglobuline G

L. casei : *Lactobacillus casei*

L. reuteri : *Lactobacillus reuteri*

L. plantarum : *Lactobacillus plantarum*

L. salivarius : *Lactobacillus salivarius*

MEB/SEM : Microscope électronique à balayage

MRS : Gélose (deMan, Rogosa, Sharpe)

NaOH : Hydroxyde de sodium

OPD : O-phenylenediamine-dihydrochloride

PAE : Pellicule acquise exogène

PRPs : Phosphoprotéine riche en Proline

PACs : Proanthocyanidines

pCB : Poly-carboxy-bétaïne

PBS : Tampon phosphate salin

pH : Potentiel d'hydrogène

pCB-(DOPA)₄ : 4 groupes de L-3,4-dihydroxyphénylalanine et Poly-carboxy-bétaïne

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

P. gingivalis : *Porphyromonas gingivalis*

QS : Quorum sensing

qRT-PCR : Réaction en chaîne par polymérisation quantitative en temps réel

RR : Régulateur de réponse cytoplasmique

RNase : Ribonucléase

SSpB : Protéine de liaison monocaténaire

S. sanguinis : *Streptococcus sanguinis*

S. oralis : *Streptococcus oralis*

S. grodonii : *Streptococcus grodonii*

S. mutans : *Streptococcus mutans*

S. salivarius : *Streptococcus salivarius*

S. pyogenes : *Streptococcus pyogenes*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SPR : Résonance plasmonique de surface

SCS : Surnageant de culture épuisée

TBAF : Fluorure de tétra-n-butylammonium

TFA : Acide tri- fluoroacétique

TSA : Gélose trypticase soja

TSB : Bouillon trypticase soja

TCSTS : Deux systèmes de transduction de signal

UV : Rayonnement ultraviolet

WBC : Culture bactérienne complète

Liste des figures

Figure 1 :	Image d'Antoni Van Leeuwenhoeck et les anciens outils de grattage dentaire...	6
Figure 2 :	Image montrant l'aspect du biofilm dentaire à l'œil nu.....	7
Figure 3 :	Représentation schématique des étapes de formation du biofilm sur la surface de la dent et les rôles potentiels des interactions bactériennes.....	13
Figure 4 :	Représentation schématique des différentes stratégies ciblant les exopolysaccharides de <i>S. mutans</i>	29
Figure 5 :	(a) Illustration schématique de la salive humaine circulant dans le biocapteur SPR modifié avec des brosses en polymère pCB. (b) Sensorgramme SPR typique des surfaces dorées modifiées par le pCB lorsqu'elles sont exposées à la salive humaine.....	42
Figure 6 :	(a) Comparaison de la surface HA avant et après revêtement au pCB-(DOPA)4. (b) spectroscopie Raman du pCB-(DOPA)4 enduit et surfaces dénudées.....	44
Figure 7 :	Données d'analyse quantitative de l'adsorption relative de protéines non spécifiques sur les disques HA et émaux non enrobés, et les disques enrobés pCB- (DOPA)4 correspondants.....	45
Figure 8 :	(a) adhérence de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Streptococcus mutans</i> sur les disques HA pCB-(DOPA)4 enduits et non enduits; adhérence de <i>Streptococcus mutans</i> sur les disques d'émail pCB-(DOPA)4 enduits et non enduits. (b) Analyse quantitative de l'adhérence des bactéries sur chaque surface.....	47
Figure 9 :	Croissance de <i>Streptococcus mutans</i> en présence de surnageant de <i>Lactobacillus sp.</i> non traité.....	51
Figure 10 :	Croissance de <i>Streptococcus mutans</i> en présence du surnageant de <i>Lactobacillus sp.</i> traité et non traité.....	51
Figure 11 :	Histogrammes montrant l'effet du surnageant non traité sur <i>Streptococcus mutans</i>	53
Figure 12 :	Biofilm de <i>S. mutans</i> pris par un Microscope à balayage électronique grossissement x12009.....	55
Figure 13 :	Altérations des profils d'expression génique associées à l'exposition de <i>Streptococcus mutans</i> sous forme planctonique (A) et à l'état de biofilm (B), au surnageant de culture usée (SCS) testé de <i>Lactobacillus sp.</i>	58

Liste des tableaux

Tableau 1 :	Composition des antigènes en polysaccharides.....	16
Tableau 2 :	Effet antimicrobien de la culture bactérienne entière de <i>Lactobacillus sp.</i> et du surnageant filtré sur la croissance de <i>Streptococcus mutans</i>	49
Tableau 3 :	Comparaison de l'effet des <i>Lactobacillus sp.</i> sur l'adhérence à <i>S.</i> <i>mutans</i> et sur le biofilm préformé.....	54
Tableau 4 :	Les amorces de la qPCR utilisée pour l'inhibition de <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> par les probiotiques de <i>Lactobacillus sp.</i>	75

Introduction

Le corps humain est colonisé par des myriades de microorganismes dans diverses parties comme la peau, la bouche et le tube digestif. Même le poumon et d'autres parties jusqu'ici considérées comme stériles comme le placenta sont maintenant considérés comme colonisés (**Xinyi et al., 2018**).

Le biologiste Sydney Brenner, lauréat du prix Nobel de Biologie a déjà remarqué que « Les progrès scientifiques résultent de nouvelles technologies, de nouvelles découvertes et de nouvelles idées, probablement dans cet ordre ». Ce sentiment a sans doute été bien illustré dans le domaine de recherche sur le microbiote. L'étude du microbiote humain remonte à la description faite par Antonie Van Leeuwenhoek à la fin du XVII^e siècle des « **animacules** » dans les raclures de la bouche. Alors que la recherche médicale s'est concentrée sur la phase planctonique des bactéries au cours des 100 dernières années, on sait aujourd'hui que les micro-organismes oraux sont organisés sous forme de biofilms. Dans notre thèse, on s'intéresse au spécifiquement au biofilm buccal et les actions qui peuvent réduire son apparition voir même son inhibition (**Schwartz, 2016**).

Les biofilms buccaux sont des communautés poly-microbiennes complexes, organisées spatialement en trois dimensions qui contiennent des bactéries de la matrice polysaccharidique environnante. Les biofilms oraux adhèrent à la surface solide comme l'émail, la surface de la racine, ainsi que les matériaux de restauration ou les implants dentaires dans la cavité buccale. La formation des biofilms sur ces surfaces de la dent intrabuccale est reconnue comme un facteur de virulence à de nombreuses maladies infectieuses buccales dentaires non transmissibles telles que la carie, la gingivite et la parodontite (**Aqawi et al., 2021**).

Le processus initial de formation du biofilm à la surface de la dent est l'adsorption non spécifique des macromolécules organiques, telles que les protéines salivaires. La pellicule est la mince couche invisible de la protéine encrassée à la surface de la dent ou du matériel dentaire intrabuccal. La pellicule contient des phosphoprotéines, des glycoprotéines, des protéines riches en proline et des mucines salivaires, et certaines d'entre elles servent de ligand pour attirer et recruter des bactéries orales. Les organismes les plus répandus dans la plaque dentaire sont les streptocoques et les lactobacilles qui sont aciduriques et acidogènes. Lorsque les régimes alimentaires sont riches en glucides fermentescibles, ces bactéries métabolisent les sucres et génèrent des acides organiques tels que l'acide lactique, propionique ou acétique qui provoquent la décomposition de l'hydroxyapatite dans l'émail

provoquant la carie dentaire. En outre, la co-agrégation de plusieurs anaérobies gram-négatifs contribue au développement de la gingivite et de la parodontite (**Huang *et al.*, 2011**).

La plaque dentaire peut se former sur toutes les surfaces de la cavité buccale en fonction des conditions environnementales, ceci répond à tous les critères d'un biofilm microbien qui peut causer un déséquilibre du microbiote buccal soit par la surcharge soit par un système immunitaire affaibli. Cela devient un défi pour la santé locale ou systémique de l'individu (**Huang *et al.*, 2011**).

Par conséquent, l'élimination de ces biofilms buccaux des dents, des restaurations ou des prothèses dentaire par une alimentation saine et équilibrée, par le biais de nouveaux matériaux dentaires ou par d'autres stratégies visant à bloquer l'adsorption protéique initiale non spécifique à la surface de la dent ou du matériel dentaire pour éviter l'adhésion bactérienne et la colonisation sont la norme d'or et les stratégies les plus courantes pour la prévention des maladies buccodentaires (**Xinyi *et al.*, 2018**).

Suite aux situations difficiles de cette année 2022 et de la pandémie du Covid-19, notre sujet de master et objectif d'origine restent irréalisables, en raison de la fermeture des laboratoires de recherche. En conséquence, nous avons orienté notre travail sur la réalisation d'une synthèse des articles portant sur notre thème de départ intitulé : les actions anti-biofilm sur des souches buccodentaires.

Synthèse Bibliographique

I. Synthèse Bibliographique

I.1 Le microbiote buccal

La cavité buccale est un système écologique très hétérogène en raison des différentes surfaces dentaires et muqueuses. Ces habitats sont colonisés par diverses communautés microbiennes qu'on appelle Microbiome Buccal. Ce dernier regroupe un environnement chaud et humide, riche en nutriments exogènes et salivaires qui permet la croissance de nombreux micro-organismes, il regroupe aussi les gènes de ces micro-organismes ainsi que le Microbiote Buccal ou anciennement nommé Flore buccale. Le microbiote buccal représente une part importante du microbiote humain, il est connu comme étant le deuxième microbiote le plus diversifié après le microbiote intestinal. Il comprend environ 700 espèces bactériennes, des virus, des champignons et des protozoaires (**Jakubovics et Palmer, 2013**).

Le microbiote buccal participe à la protection des dents et des surfaces dentaires contre la colonisation par des bactéries pathogènes, il contribue au développement du système immunitaire local et maintient la santé systémique. Lorsque l'équilibre du microbiote buccal se perturbe, c'est-à-dire en cas de dysbiose, il participe au développement de pathologies dentaires. Quant à la cavité buccale qui représente la première partie du tube digestif et joue un rôle important dans la phonation. Elle contient l'organe de la gustation et est destinée à la mastication, l'insalivation des aliments, la déglutition et la respiration. Ces fonctions sont liées à la santé de l'être humain, il est donc nécessaire de maintenir la santé buccale afin de préserver l'équilibre et la qualité de vie de chaque individu (**Pauline, 2017**).

I.1.1 Historique

Le microbiote buccal se développe simultanément avec le système immunitaire. Pendant que le fœtus se trouve dans l'utérus, sa cavité buccale reste stérile. Sa première contamination a lieu pendant l'accouchement par des bactéries du microbiote vaginal de la mère si le bébé est né par voie basse soit par le microbiote intestinal ou l'environnement de la salle d'accouchement s'il est né par césarienne. Ensuite, la bouche est colonisée par plusieurs bactéries qui sont à l'état libre dans la nourriture ou qui sont transmises à l'enfant par ses proches. On trouve un nombre faible d'organismes sous forme de spores dans la bouche du nouveau-né car cette dernière est considérée dans la période néo-natale comme un site très sélectif, c'est pour cela que peu de micro-organismes peuvent s'établir avec succès (**Magon et Kumar, 2012**).

Durant la période néo-natale le nouveau-né est édenté, les muqueuses sont donc les seules surfaces accessibles. Chez les enfants de moins de six mois, *Streptococcus mutans* est présente dans la bouche de 50% d'enfants tandis que le *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus mitisbiovar* manifestent une grande affinité pour les cellules épithéliales. A l'âge de trois ans, l'éruption des dents fournit de nouvelles surfaces pour la colonisation microbienne et ce n'est qu'à partir de l'âge de neuf ans que l'enfant possède un microbiote buccal complexe et le devient de plus en plus au fur et à mesure de la croissance jusqu'à la denture adulte (Nuriel-Ohayon *et al.*, 2017).

I.2 Le Biofilm Buccal

I.2.1 Généralités

En milieu naturel, les espèces bactériennes peuvent vivre et se développer selon deux modes, radicalement différents, passant de l'un à l'autre soit **l'état planctonique** dont lequel les micro-organismes subsistent dans le milieu buccal soit en communauté complexe adhérents à des surfaces qu'on appelle « **Biofilm** ». Le biofilm est majoritairement observé dans des milieux aqueux, il est exposé à des environnements humides et chauds (Lopez-Nguyen, 2018).

Les premiers biofilms ont été découverts en 1683 **Antoni Van Leeuwenhoek** (Figure 1) qui a observé la présence de microorganismes issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire. Ce n'est qu'en 1976 que la mise en évidence de l'organisation du biofilm dentaire a été faite par Marshall. Le biofilm peut être mono-espèce constitué par un seul type d'espèces ou pluri-espèces, constitué par plusieurs types d'espèces bactériennes (Lopez-Nguyen, 2018).

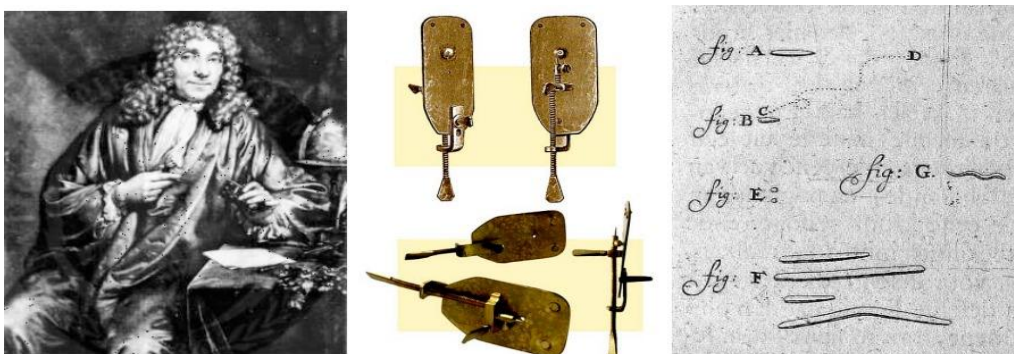


Figure 1 : Image d'Antoni Van Leeuwenhoek et les anciens outils de grattage dentaire (Sansonetti, 2021)

Le biofilm oral est une colonie architecturale constitué par une multitude d'espèces bactériennes cariogènes ou non cariogènes, enveloppées dans une matrice extracellulaire protectrice de polymères exo-cellulaires qui constitue 85% de la biomasse totale du biofilm. Cette matrice contient des enzymes bactériens tel que la Glucosyltransférase (GTF) et la *S.mutans* fructotransférase (FTF), des polysaccharides, des acides nucléiques, des protéines, des composés sécrétés par les bactéries salivaires et leurs enzymes ainsi que les restes de la nourriture et d'autres composants de l'hôte. Les espèces bactériennes du biofilm dentaire se fixent sur une surface naturelle, mono-facturée, minérale ou organique (**Pauline, 2017**).

I.2.2 Aspect de biofilm buccal

Le biofilm dentaire anciennement appelé Plaque dentaire, dans des conditions optimales de croissance peut devenir macroscopique. Il a un aspect mou, adhérent, tenace, de couleur blanche jaunâtre qui en se calcifiant devient tartre (Figure 2). Le biofilm dentaire peut se former sur différentes surfaces dentaires telles que : les dents, la gencive et l'émail dentaire ou même sur des éléments prothétiques comme les prothèses dentaires, les appareils orthodontiques, les implants ou sur certaines obturations (composites, amalgames...). Le biofilm buccal est présent chez tous les sujets, mais il varie quantitativement d'un individu à un autre et varie selon les endroits dans la bouche d'un même individu (**Lopez-Nguyen, 2018**).



Figure 2 : Image montrant l'aspect du biofilm dentaire à l'œil nu
(**Anonyme, 2022**)

I.2.3 Composition du biofilm buccal

Le biofilm dentaire est composé de plusieurs éléments :

- Une composante cellulaire qui représente la fraction principale du biofilm, elle représente 70% de la masse globale du biofilm.
- Des canaux, qui constituent les principales portes d'acheminement de nutriments au sein de la matrice exopolysaccharidique et les voies d'évacuation des produits de dégradation.
- Une fraction acellulaire ou matrice qui représente 30 % de la masse et qui est composée de : 80% d'eau et 20% de phase solide. Elle est constituée aussi de polysaccharides, de protéines, d'oligoéléments et d'éléments minéraux. Les polysaccharides, constituants-clés de la structure du biofilm, peuvent être extracellulaires et intracellulaires. Ils sont constitués de polymères de fructose qui limitent la diffusion de différents éléments tels les bicarbonates salivaires, et de polymères de glucose (**Jakubovics et al., 2021**). Ces derniers sont présents en deux types :
 - ❖ **Les dextrans** : Ils ont des liaisons alpha 1-6, et constituent la réserve énergétique utilisable par les bactéries.
 - ❖ **Les mutanes** : Ils ont des liaisons alpha 1-3, et permettent l'adhésion des bactéries à la pellicule acquise exogène et la cohésion inter-bactérienne (**Guillaume, 2011**).
- Le biofilm buccal est également composé de bactéries qui sont l'élément prédominant. La population microbienne présente dans le biofilm buccal est complexe et changeante, car pendant les phases de maturation de ce dernier la communauté bactérienne évolue quantitativement et qualitativement. Ces bactéries sont des espèces bactériennes aérobies telles que : *Corynebacterium*, *Neisseria*, les staphylocoques et *Pseudomonas aeruginosa*. Le nombre d'espèces cariogènes est restreint, il s'agit principalement de streptocoques, actinomyces et les lactobacilles. En effet, les bactéries doivent d'une part être capables d'être acidogènes; c'est-à-dire elles doivent être capables de synthétiser en anaérobiose des acides organiques à partir du saccharose. D'autre part, elles doivent résister et se développer dans un milieu acide, elles sont dites « bactéries aciduriques ». Au sein du biofilm, la pellicule acquise

exogène peut abriter environ cent millions à un milliard de bactéries par milligramme (**Burton *et al.*, 2000**).

I.3 Formation du biofilm buccal

En colonisant les surfaces dentaires les bactéries entraînent la formation du biofilm selon un processus qui contient six étapes : formation de la pellicule acquise exogène (PAE), l'adhésion des bactéries pionnières, la formation de micro-colonies, la phase de maturation et en dernier la phase de détachement (Figure 3). Cependant le biofilm est en constant remaniement, il s'agit d'un processus dynamique dans lequel les étapes de sa formation se font de manière continue [(**Hojo *et al.*, 2009**) ; (**Bouchard, 2015**)].

I.3.1 Formation de la pellicule acquise exogène PAE

La PAE est un élément important car elle constitue l'interface entre la surface de l'émail et la première couche du biofilm buccal. C'est un film protéique fin, d'une épaisseur qui varie entre **0.1 µm et 1 µm**. Elle se forme de manière naturelle et spontanée sur les surfaces dentaires quelques minutes après leur nettoyage prophylactique par adsorption sélective de protéines d'origine salivaire de peptides et d'autres molécules salivaires. Elle est principalement constituée de glycoprotéines, de phosphoprotéines comme les IgA, des IgG, le lysosyme, l'alpha-amylase, les cystatines, les glycosyltransférases, d'autres phosphoprotéines riches en proline (PRPs), la stathérine et l'acide sialique. La PAE contient également des sucres tels que le galactose, mannose et le glucose et aussi quelques protéines salivaires qui se lient à l'hydroxyapatite de la surface minérale (**Bouchard, 2015**).

La pellicule acquise exogène peut être bénéfique car elle sert de lubrifiant et va donc protéger les surfaces dentaires contre l'usure. De plus, elle joue un rôle dans l'homéostasie minérale de l'émail dentaire en formant une barrière et un tampon contre les agents de déminéralisation. Mais, elle peut aussi avoir un rôle Co-destructeur car elle maintient les acides au contact de l'émail, elle permet la colonisation des bactéries. Sa structure lui confère la possibilité de retenir certaines bactéries buccales ce qui initie la première étape de formation du biofilm. Les bactéries possèdent des adhésines chargées positivement qui vont se fixer aux lectines chargées négativement de la pellicule (**Houvion, 2018**).

I.3.2 Phase d'adhésion réversible

En présence de la PAE l'attachement bactérien est grandement facilité. L'attachement initial entre les micro-organismes la PAE et se fait par différents mécanismes. Parmi ces mécanismes on note :

- **La diffusion passive** : mouvement Brownien des bactéries qui leur permet un déplacement aléatoire vers les surfaces dentaires ou les muqueuses.
- **La convection** : ensemble de forces résultants des mouvements de langue et des courants salivaires
- **Le chimiotactisme** qui est responsable du rapprochement spécifique via des récepteurs exprimés sur la membrane bactérienne
- **Les forces électrostatiques**, et de Van der Waals qui jouent un rôle déterminant dans les mécanismes d'attraction-répulsion
- Certaines espèces comme *Wolinella*, *Selenomonas* ou *Campylobacter spp.* sont présentes en sous-gingival ont des flagelles et peuvent se déplacer et coloniser les surfaces dentaires (**Simain-Sato et al., 2014**).

Les colonisateurs primaires dans cette étape sont pour 60% des streptocoques, avec principalement *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis* qui adhère mieux que ceux du groupe mutans, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis* et *Streptococcus gordonii*. Les autres bactéries retrouvées sont des bactéries du genre Actinomyces. Ces colonisateurs primaires sont facilement détachables par rinçage et peuvent revenir donc à l'état planctonique (**Simain-Sato et al., 2014**).

I.3.3 Phase d'adhésion irréversible

Selon **Hojo et al., 2009**, l'adhésion irréversible implique un attachement solide des microorganismes à leur cible qui est la surface dentaire, elle s'établit par la présence de nombreuses raisons, comme :

- La reconnaissance spécifique entre les adhésines présentes sur les surfaces microbiennes et les récepteurs de la pellicule acquise exogène. Cette reconnaissance se fait par des interactions dites sélectives qui sont solide et fonctionnent sur de courtes distances ce qui permet par conséquent l'attachement des microorganismes sur les surfaces dentaires.

- La formation des liaisons ioniques ou des ponts hydrogènes entre les surfaces microbiennes et les surfaces dentaires.
- La surproduction d'exo-polymères par les bactéries qui renforcent ainsi la cohésion hétérogène inter-bactérienne et conduisent à un attachement irréversible des bactéries.
- Les modifications physiologiques à la surface des organites de surface comme par exemple ; les flagelles qui assurent la mobilité des bactéries sont remplacés par des les curli ou par pilis de type **IV** c'est le mécanisme de **Twitching Motility**.

I.3.4 Formation de micro-colonies

Pour terminer la phase d'adhésion irréversible, les streptocoques vont produire une matrice extracellulaire (ou glycocalyx) composée de glucanes insolubles, de glucanes et fructanes solubles et d'hétéropolymères, qui permettent aux bactéries de finaliser leur adhésion. La formation de micro-colonies se fait par des mécanismes de co-adhésion ce qui va donc conduire à une diversification des communautés du biofilm en développement (**Bouchard, 2015**). Les mécanismes de co-adhésion diffèrent d'une espèce à une autre par exemple :

- Les Streptococci utilisent des protéines de surface pour adhérer aux glycoprotéines présentes dans l'environnement oral (**Nobbs et al., 2009**).
- *Actinomyces naeslundii* (oris) utilisent les fimbriae de type 1 afin d'adhérer aux stathérine et aux PRPs présentes dans la pellicule acquise exogène formée sur les surfaces amélares (**Li et al., 2001**).
- *Fusobacterium nucleatum* peut faire le lien entre les colonisateurs primaires et d'autres colonisateurs secondaires (**Nobbs et al., 2009**).
- Des interactions physiques, une signalisation chimique et des réponses transcriptionnelles permettent la liaison entre les streptocoques et *Porphyromonas gingivalis* (**Bamford et al., 2009**).
- Les fimbriae majeures de *Porphyromonas gingivalis* interagissent avec les glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénases présentes à la surface des streptocoques, tandis que les fimbriae mineures se lient aux adhésines SspB (**Nagata et al., 2009**).

Ces mécanismes de Co-adhésion permettent une diversification des communautés du biofilm en développement (**Lopez-Nguyen, 2018**).

I.3.5 Phase de maturation

Pendant cette phase, la structure du biofilm buccal connaît une augmentation de sa taille et de son volume. Cette augmentation est la conséquence des différentes multiplications cellulaires et l'épaississement du glycocalyx. Ces événements entraînent une diminution progressive du taux d'oxygène dans le milieu permettant ainsi le développement des bactéries anaérobies, ils entraînent aussi une modification de substrats et du pH au sein du biofilm. De plus, les phénomènes de communications intercellulaires se mettent en place. D'autre part, la biodiversité microbienne évolue d'une façon quantitative et qualitative ; le biofilm buccal pendant cette phase peut contenir 10^9 bactéries/mg et recenser plus de 500 taxons différents (**Simain-Sato et al., 2010**).

Enfin, le biofilm acquiert sa structure mature par la formation de pores et des canaux entre les micro-colonies (**Chardin, 2006**). Ces canaux permettent le passage et la diffusion de l'eau, les nutriments, et d'autres substances aux cellules à travers le biofilm (**Socransky et Haffajee, 2002**).

I.3.6 Phase de détachement

C'est la quatrième étape au cours de laquelle, le nombre croissant des bactéries, et la dégradation enzymatique induisent une profonde carence alimentaire au sein de l'entité, avec des phases de croissance, et de détachement cellulaire, c'est le phénomène de «**sloughing**». L'appauvrissement nutritionnel après une phase de croissance importante au sein de la structure, favorise le détachement des bactéries, voire des fragments de biofilms. Par exemple, *Streptococcus mutans* synthétise des enzymes qui hydrolysent sa liaison avec les protéines de surfaces dentaires. Par ailleurs, sous l'effet de forces de cisaillements utilisés lors de la mastication des aliments et la phonation, un grand nombre de bactéries quittent la structure tridimensionnelle et se dispersent grâce et vont, par conséquent, contaminer d'autres sites, constituant de véritables réservoirs de bactéries pathogènes (**Bouchard, 2015**).

Une cinquième étape est parfois décrite comme un véritable retour des bactéries à l'état planctonique et, dans certaines conditions, elles vont former dans un espace plus ou moins éloigné de nouveaux biofilms (**Simain-Sato et al., 2010**).

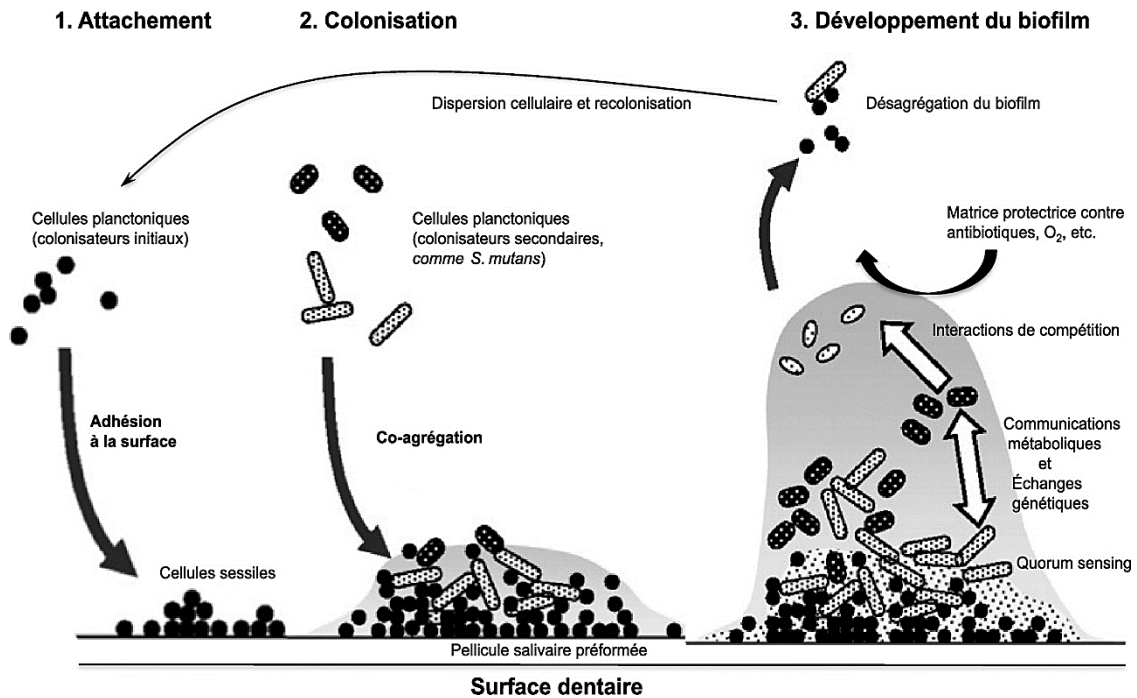


Figure 3 : Représentation schématique des étapes de formation du biofilm sur la surface de la dent et les rôles potentiels des interactions bactériennes (Hojo *et al.*, 2009).

I.4 Classification du biofilm buccal

D'après Zijngge *et al.*, 2010 le biofilm est classé selon l'habitat des bactéries et selon leur pouvoir pathogène :

I.4.1 Selon l'habitat

La cavité buccale est hétérogène et est considérée comme le site le plus densément peuplé du corps humain. La diversité environnementale de la cavité buccale favorise l'introduction de communautés microbiennes distinctes, telles que le biofilm supra-gingivale, le biofilm sous-gingivale et l'enduit lingual. Chaque environnement est caractérisé par des propriétés physico-chimiques qui déterminent les micro-organismes qui peuvent coloniser un site de la cavité buccale, tandis que les activités métaboliques de ces micro-organismes modifient les propriétés de l'environnement initiant un passage de conditions saines à pathogène au sein de ce dernier.

- a. Le biofilm supra-gingival** : Ce biofilm est le premier à se former quelques minutes après le brossage des dents. Il se développe sur les surfaces en contact

avec la gencive. Il se compose principalement de bactéries aérobies et anaérobies facultatives à Gram positif (Trisha, 2011).

Comme mentionné précédemment, l'activité métabolique des micro-organismes modifient les propriétés de l'environnement qui dans ce cas est le site supra-gingival ; les bactéries saccharolytiques présentes dans le site supra-gingival fermentent les hydrates de carbone principalement en acide lactique ce qui crée un environnement temporairement acide. Cette acidification du milieu incite d'une part le développement de réponses adaptatives chez les micro-organismes individuels à de nouvelles conditions environnementales et d'autre part l'introduction de bactéries pathogènes dans la communauté microbienne. Par exemple, les streptocoques non-mutans et les *Actinomyces* sont prédominants dans l'environnement supra-gingival et provoque une acidification du milieu, entraînant à la fois une déminéralisation de la surface de la dent et l'introduction de micro-organismes plus cariogènes, tel que *Streptococcus mutans* (Loesche *et al.*, 1983).

b. Le biofilm sous-gingival : Le biofilm sous-gingival colonise le sillon gingivo-dentaire et les poches parodontales qui sont dépourvues de l'oxygène. Le métabolisme des bactéries dans ce site est donc du type anaérobie. Dans ce site, les micro-organismes saccharolytiques métabolisent les composés azotés dérivés du fluide crévulaire gingival (GCF) et créent un pH neutre et un environnement anaérobie riche en acide gras à chaîne courte en ammoniac. Exemple de ces micro-organismes qui neutralisent le pH dans le site sous-gingival, *Fusobacterum* et *Prevotella*. Le pH neutre et l'environnement azoté augmentent l'activité protéolytique de *Prevotella* et facilitent l'établissement d'une bactérie plus intolérante aux acides, mais parodontopathogène, *Porphyromonas gingivalis* (Takahashi, 2005).

c. L'enduit lingual : Dans l'enduit lingual, l'activité saccharolytique vis-à-vis de la cystéine et de la méthionine produit des composés soufrés, les principaux composants de la mauvaise haleine (Pauline, 2017).

I.4.2 Selon le pouvoir pathogène

Selon son pouvoir pathogène, le biofilm a été classé en trois catégories qui sont :

- a. Plaque saine non pathogène :** Comme son nom l'indique, c'est une plaque qui n'a pas un effet pathogénique. Elle correspond à état de santé bien entretenu et est essentiellement composée de bactéries à Gram positif qui appartiennent aux genres *Streptococcus* et *Actinomyces* (**Loesche et al., 1983**).
- b. Plaque cariogène :** La consommation considérable de sucrose favorisant la formation des glucans insolubles dans l'eau par *Streptocoques mutans* est la majeure cause de l'apparition des caries dentaires. D'abord, la formation de ces glucanes assure la colonisation et le maintien des bactéries sur les dents par la formation du biofilm. Ensuite, l'acide produit par la métabolisation des sucres déminéralisent l'émail des dents. Par conséquent, les principaux facteurs de virulence de *Streptocoques mutans* sont dus à l'acidogénicité et l'acido-résistance qui sont associées à la production des glucans (**Guillaume et al., 2010**).
- c. Plaque parodontopathique :** Ce type de plaque se développe dans l'espace gingivo-dentaire. Elle est à l'origine de nombreuses maladies parodontales telles que les gingivites. Elle est constituée par une flore aéro-anaérobie facultative composée essentiellement de cocci à Gram positif qui par le temps évolue progressivement en flore anaérobie stricte à Gram négatif (**Guillaume et al., 2010**).

I.5 Les bactéries du biofilm dentaire

La cavité buccale humaine renferme en elle un grand nombre d'espèces bactériennes. Leur distribution au sein de la cavité buccale varie à la fois qualitativement et quantitativement en fonction de leur site spécifique de colonisation. Selon **Guillaume et ses collaborateurs** dans leur synthèse intitulée *S. mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire, 20% des bactéries de la cavité buccale sont des streptocoques. Ce groupe englobe à la fois des bactéries inoffensives et dangereuses.

Chaque espèce présente, dans la cavité buccale que ce soit des Streptocoques ou autres bactéries développe des propriétés spécifiques pour coloniser les différents sites buccaux soumis à de constants changements de conditions pour d'une part combattre les compétiteurs et d'autre part, pour résister aux agressions externes (**Arweiler et Netuschil, 2016**).

I.5.1 Les Streptocoques

a. Le groupe mutans

Le nom de ce groupe provient de la forme des cellules bactériennes qui sont sous forme de coques mais qui ont une capacité de la perdre. Elles apparaissent ensuite sous forme de courts bâtonnets ou cocco-bacilles. Selon la spécificité sérologique des antigènes présents sur la paroi cellulaire huit sérotypes ont été définis (a-h). Ces sérotypes ont ensuite été divisés en sept espèces distinctes qui colonisent différents sites de la cavité buccale (**Guillaume et al., 2010**).

La composition en sucre des polysaccharides spécifiques à chaque sérotypes de chaque espèce est montrée dans le tableau suivant (**tableau 1**) :

Tableau 1 : Composition des antigènes en polysaccharides

Les sérotypes	a,d et g	C e et f	B	H
Composition des antigènes en polysaccharides	Glucose Galactose Rhamnose	Glucose Rhamnose	Galactose Rhamnose	Galactose Glucose

Il est vrai qu'un grand nombre d'espèces ont des sérotypes bien définis mais plusieurs études ont aussi montré l'existence de souches non sérotypables comme par exemple des souches de *S.mutans* pour lesquelles aucune description précise de la composition en sucre des polysaccharides spécifiques du sérotype n'était disponible (**Guillaume et al., 2010**).

Un neuvième sérotype a été par la suite identifié chez *S. mutans*, c'est le (sérotype k) le plus retrouvé dans la cavité buccale humaine. Il est présent à environ 70% à 80%, suivi par le (sérotype e) qui est présent approximativement à 20% dans la cavité buccale (**Nakano et Ooshima, 2009**).

Le groupe *S. mutans* inclus les bactéries qui causent les caries dentaires ainsi que des endocardites et autres infections du cœur. Bien que l'espèce *Streptococcus mutans* soit présente naturellement dans la bouche, elle est considérée comme responsable de l'initiation des lésions carieuses coronaires. *Streptococcus sobrinus* s'associe à *Streptococcus mutans* et

joue également un rôle dans la formation des caries dentaires mais elle est plutôt associée aux caries des surfaces lisses [(Mitchell, 2003) ; (Banas, 2004) ; (Kuramitsu, 2006)].

D'autres espèces comme celles du groupe mitis telles que *S. sanguinis* et *S. oralis* sont responsables des endocardites (Banas, 2004).

Cependant, la formation des caries dentaires est fortement optimisée en présence d'une forte proportion de *S. mutans* par un régime alimentaire riche en sucrose. La consommation de ce dernier favorise la formation de glucans insolubles dans l'eau par *Streptococcus mutans*. De ce fait, il en résulte la colonisation des surfaces des dents et la formation du biofilm. Inversement, l'absence de carie pourrait s'expliquer par une absence d'une forte proportion de *S. mutans*. Elle peut aussi s'expliquer par une résistance de l'émail aux attaques acides ou par un régime alimentaire non cariogène. Néanmoins, il existe des cas de caries dentaires en l'absence de fortes proportions de *S. mutans* d'autres cas absents en présence de faibles proportions de *S. mutans*. Ces anomalies constituent la base des recherches en cours sur l'étiologie précise des caries dentaires (Qizhao et al., 2021).

b. La virulence de *Streptococcus mutans*

Les microorganismes doivent être capables d'adhérer aux dents ou aux surfaces des muqueuses pour pouvoir s'établir au sein de la cavité buccale. Cette adhérence est assurée par des molécules d'adhésion (polysaccharides, acides lipotéchoïques, glucosyltransférase et des lectines) qui sont retrouvées à la surface des cellules et associées à des structures cellulaires (fimbriae, capsules) et par des récepteurs présents sur les surfaces buccales tels que les glycoprotéines, les mucines, les protéines riche en proline et les IgA et IgG (Guillaume et al., 2010). Dans le cas de *Streptococcus mutans*, ils synthétisent des polysaccharides extracellulaires, glucanes et fructanes à partir des aliments sucrés. Ces derniers leur confèrent la capacité d'adhérer aux surfaces dentaires, les *S. mutans* peuvent également produire de l'acide, essentiellement l'acide lactique qui résulte du métabolisme des hydrates de carbone alimentaires. Il s'en suit une baisse de pH qui provoque la perte des minéraux présents à la surface de l'émail dentaire. Par ailleurs, dans un milieu extrêmement acide la majorité des bactéries deviennent inactives contrairement à *S. mutans* qui peut survivre et même se développer au sein de ce milieu (Krzyściak et al., 2013).

Cette bactérie est très virulente car elle utilise le saccharose d'une manière optimale. Elle est dotée d'un facteur de virulence supplémentaire établi lorsque les glucides exogènes sont

abondants et qui lui donne l'habilité de polymériser le glucose à l'intérieur de la cellule et le stocker. Quand les hydrates de carbone exogènes ne sont plus disponibles, les polysaccharides intracellulaires sont dépolymérisés. Cette particularité entraîne une production d'acide en continu (**Guillaume *et al.*, 2010**).

I.5.2 Les Lactobacilles

Le groupe Lactobacille regroupe une diversité de bacilles à Gram positif, avec des génomes dont la taille varie de 1.23 à 4.91 Mb et une teneur en GC qui varie de 31.93% à 57.02%. Les Lactobacilles sont aéro-tolérants ou anaérobies couramment trouvés dans l'eau, les aliments et également dans le tractus gastro intestinal et la cavité buccale. Ces habitats disposent de glucides et autres nutriments, où les stricts lactobacilles fermentatifs peuvent épuiser leurs besoins cataboliques. De cette manière, ces bactéries génèrent un environnement ayant un pH faible qu'elles peuvent tolérer mais que d'autres bactéries concurrentes ne peuvent pas tolérer. La spécificité la plus remarquable des Lactobacilles est leur capacité à s'adapter à une grande variété de niches écologiques grâce à la plasticité de leurs génomes. Cette adaptation s'accompagne souvent par une réduction du génome c'est-à-dire une perte de segments de génomes couplés à l'acquisition de gènes supplémentaires clés par duplication de gènes et aussi par transfert horizontal de gènes (**Caufield *et al.*, 2015**).

L'association intime des Lactobacilles avec la nourriture, la cavité buccale et les caries dentaires a bien été établie. Toutefois, des études ont été faites pour savoir si la cavité buccale constitue un environnement favorable pour les Lactobacilles même en l'absence de caries et pour savoir aussi lequel des sites buccaux colonisent elles. D'après ces études et en suivant le cycle de vie de l'être humain :

- a.** Les nouveau-nés par voie vaginale hébergent les Lactobacilles dans la cavité buccale au moment de la naissance. Dans ce cas, l'origine des Lactobacilles peut être attribuée au vagin de la mère. Donc, les lactobacilles à cette étape sont transitoires et non maintenus dans la bouche du bébé après 1 mois.
- b.** Les lactobacilles se trouvent également en grand nombre chez les nourrissons allaités que chez les bébés nourris au biberon. Après le sevrage, ce groupe de bactéries est rarement trouvé dans la cavité buccale des nourrissons. Une fois les dents sorties, les fissures occlusales représentent une niche pour les lactobacilles. Cependant, le développement des lactobacilles au sein de la cavité buccale et leur colonisation

durable à l'intérieur de celle-ci est expliqué par la présence de caries dentaires (Caufield *et al.*, 2015).

I.5.3 *Porphyromonas gingivalis*

Porphyromonas gingivalis est une bactérie à Gram négatif, anaérobie impliquée dans la pathogenèse de la parodontite, qui est une maladie dentaire inflammatoire qui conduit à la destruction des tissus soutenant les dents et qui peut causer même la perte de dents (Hong Min *et al.*, 2019).

Parmi toutes les espèces bactériennes qui vivent dans la cavité buccale, le complexe bactérien nommé « **complexe rouge** » est composé de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia* a été fortement associé à des lésions parodontales avancées (Mysak *et al.*, 2019).

❖ *Porphyromonas gingivalis* dans le biofilm

Il a été démontré que *P. gingivalis* est un colonisateur tardif des biofilms. Selon le modèle du biofilm parodontique, les premiers colonisateurs sont les Streptocoques et les Actinomyces. Ces bactéries utilisent les fimbriae et les polysaccharides pour adhérer aux pellicules salivaires (Sakanaka *et al.*, 2015). *Fusobacterium nucleatum*, est une bactérie anaérobique invasive, adhérente et inflammatoire qui possède de multiples adhésines. Elle est considérée comme étant un colonisateur intermédiaire et sert de bactérie montante par un mécanisme de co-agrégation sélective avec une grande variété de microbes. Elle attire ainsi les colonisateurs tardifs dont *Porphyromonas gingivalis*. Cette dernière peut augmenter la virulence du biofilm parodontal même en faible concentration en inversant les réponses de l'hôte car *P. gingivalis* a la capacité d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte en utilisant des facteurs de virulence qui dérèglent les réponses immunitaires et inflammatoires innées. Elle peut augmenter la virulence du biofilm en modifiant les structures communautaires facilitant ainsi l'augmentation de la charge bactérienne globale. En perturbant les cellules épithéliales par les bactéries, *P. gingivalis* initie le processus inflammatoire qui aboutit à la destruction des tissus environnants qui soutiennent les dents. Ce processus aboutit à la fin à la perte des dents (Sakanaka *et al.*, 2015).

I.6 Propriétés du biofilm

I.6.1 Interactions au sein du biofilm

Les bactéries qui se développent dans les communautés de biofilms fonctionnent comme une société bien organisée (**Huanga *et al.*, 2011**). Une co-agrégation homotypique ou hétérotypique peut apparaître lorsque le biofilm est développé, les bactéries vont pouvoir interagir entre elles par des mécanismes aussi bien synergiques qu'antagonistes notamment lorsqu'il s'agit de la gestion des nutriments et des métabolites mais aussi dans le cas de l'adhérence aux surface. Les bactéries peuvent aussi communiquer par des signaux chimiques selon un mécanisme appelé Quorum sensing, et la biodiversité du biofilm améliore leur résistance à certaines variations de l'environnement comme celle du pH. Cette biodiversité, facilite aussi l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence par un transfert de gènes. (**Houvion, 2018**).

I.6.2 Coopération et la co-adhésion en Biofilm

La co-agrégation est une réaction spécifique d'une cellule bactérienne à une autre différente, elle permet la reconnaissance spécifique de polysaccharides bactériens (**Hojo *et al.*, 2009**). Ce mécanisme se produit lors de la formation du biofilm lorsque les colonisateurs secondaires (tardifs) ne peuvent pas coloniser directement la surface de la dent. Néanmoins, ils peuvent coloniser la surface qu'en se liant à un colonisateur intermédiaire qui va leur permettre de se lier à un colonisateur primaire (**Nguyen, 2018**). En particulier *F. nucleatum* et sa co-agrégation avec d'autres bactéries nécessite une interaction entre les molécules de surface des cellules.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif, la co-agrégation avec *F. nucleatum* se fait par des interactions lectines-glucides. Par exemple, la surface de *P. gingivalis* est dotée d'une fraction de galactosides tandis que *F. nucléatum* possède une fraction de lectine. La co-agrégation dans ce cas est médiée par ces deux fractions (galactosides et lectines) et est inhibée par le lactose [(**Kolenbrander *et al.*, 1989**) ; (**Nagaoka *et al.*, 2008**) ; (**Kang *et al.*, 2011**)].

Les récepteurs médiateurs de la co-agrégation entre *Porphyromonas gingivalis* et les autres bactéries buccales sont les polysaccharides capsulaires et les lipopolysaccharides du sérotype K5 que *P. gingivalis* possède. Mais, selon des études il semble que la co-agrégation n'est pas inhibée par les sucres (**Rosen et Sela, 2006**).

Il a été mentionné précédemment que le mécanisme de co-agrégation se réalise lorsque les colonisateurs secondaires se lient à un colonisateur intermédiaire pour qu'ils puissent enfin se lier à un colonisateur primaire. Selon un modèle spatio-temporel proposé de bactéries orales les colonisateurs primaires se lient aux récepteurs pelliculaires complémentaires via des adhésines. Quant aux colonisateurs secondaires, ils se lient aux bactéries qui étaient déjà liées aux dents. Cette liaison se traduit par l'apparition d'une surface naissante qui forme un pont avec les cellules partenaires de co-agrégation adjacentes. Par exemple, un agent pathogène parodontal typique. A noter que, *P. gingivalis* possède de longs fimbriae et peut se lier aux colonisateurs primaires. Ses fimbriae sont composés d'une protéine appelée la FimA, qui se lie à la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase présente à la surface de *S. oralis* (Maeda *et al.*, 2004).

Fusobacterium nucleatum peut co-agrégger avec de nombreuses bactéries buccales même avec les anaérobies strictes et les streptocoques. De ce fait elle est considérée comme un composant majeur des biofilms buccaux et sert d'intermédiaire et de coordinateur qui relie les colonisateurs secondaires aux primaires (Hojo *et al.*, 2009).

En 2008, Chalmer *et al.* ont démontré que la co-agrégation inter-génique aide la dépendance métabolique. Ils ont montré que *Streptococcus oralis* et *S. gordonii* peuvent co-agrégés avec *Veillonella sp.* Ces dernières lorsqu'elles étaient cultivées sous forme de biofilm avec la salive comme source nutritionnelle. Elles formaient des grappes inter-digitées de trois espèces. Il s'est avéré que *Veillonella sp.* ne s'est pas développée qu'en présence des streptocoques, il a également été suggéré que la co-agrégation bactérienne est liée à la survie des bactéries anaérobies strictes en aérobies. Il est donc admissible que la co-agrégation inter-génique soit un facteur considérable dans les communications coopératives entre bactéries buccales.

1.6.3 La compétition au sein du biofilm

Comme la structure du biofilm est complexe et très diversifié, il est donc répandu que les bactéries soient en compétition avec les antagonistes. Chaque espèce bactérienne lutte pour les nutriments, l'adhésion et l'espace au sein du biofilm. Pour cela elles adoptent plusieurs stratégies parmi lesquelles on note : la production de bactériocines (Huang *et al.*, 2011).

a. Synthèse de bactériocines

Les bactériocines sont des substances bactéricides protéiques sécrétées par une bactérie dans le but d'inhiber la croissance d'autres espèces ou souches bactériennes apparentées. Elles sont différentes des antibiotiques traditionnels car les bactériocines n'agissent généralement que sur leur propre souche ou sur d'autres mais qui sont similaires à l'espèce productrice (**Kuramitsu et al., 2007**).

Des études ont démontré que *Streptococcus mutans* possède la plus grande aptitude à produire des bactériocines parmi toutes les bactéries buccales (**Huanga et al., 2011**). Les mutacines sont les bactériocines produites par cette bactérie. On distingue quatre groupes de mutacines qui ont été caractérisées jusqu'à présent, les lantibiotiques mono-peptidiques et di-peptidiques, les non-lantibiotiques [(**Qi et al., 1999**) ; (**Mota-Meira et al., 2000**)].

- ❖ **Les mutacines lantibiotiques** : Le terme Lantibiotique a été évoqué la première fois en **1975** par **Hamada et Ooshima**. Ce sont une classe de peptide d'antibiotiques composés d'un thioéther polycyclique, des acides aminés insaturés tels que la déhydroalanine et acide-2-isobutyrique ainsi que les acides aminés lanthionine ou méthyl-lanthionine qui sont des résidus créés par des liaisons thioéther intramoléculaires au sein de la molécule de bactériocine. Les mutacines lantibiotiques sont issus des modifications post-traductionnelles du pré-peptide et ont un large spectre d'inhibition, elles agissent principalement sur les streptocoques ainsi que les bactéries à Gram positif.

Elles jouent un rôle essentiel dans l'activité inhibitrice de la bactériocine et dans des conditions environnementales extrêmes, elles confèrent au peptide une très grande résistance en lui rendant plus stable (**Huang et al., 2015**).

- ❖ **Classification des mutacines lantibiotiques** : Les lantibiotiques sont synthétisés par plusieurs bactéries Gram positives, leur classification est basée sur le nombre de peptides qu'ils comprennent et selon leur structure. Selon le nombre de peptide, les lantibiotiques ou encore appelés bactériocines de classe I sont divisés en deux groupes :

- * **Mutacine mono-peptide (bactériocines de classe Ia, Ib)** : Ce groupe inclut les mutacines I, mutacines II et mutacines III/ mutacines 1140 qui ont des séquences similaires ainsi que la mutacine K8, et la mutacine B-Ny266 (17).

- * **Mutacine di-peptidique (bactériocines de classe Ie) :** Ce groupe inclus les mutacines GS5 (SmbA, SmbB) et les mutacines BHT-A (BHT-Aa, BHT-AP) (Merritt et Qi, 2011).
- ❖ Selon la structure tertiaire, les mutacines sont également divisées en deux groupes ; les mutacines linéaires de type A et les mutacines globulaires de type B (Merritt et Qi, 2011). Généralement, les mutacines qui existent sont de type A. Selon des études, les mutacines type A sont capables de former des pores membranaires à la surface des cellules sensibles ce qui entraîne par la suite la mort cellulaire. A titre d'illustration, la mutacine 1140 forme des pores en utilisant le lipide II comme une molécule d'ancrage. De ce fait, l'activité bactéricide s'aggrave et il en résulte une inhibition de synthèse de la paroi cellulaire. En se basant sur ce mode d'action, le spectre large des mutacines lantibiotiques contre les bactéries Gram positives peut être expliqué [(Kreth *et al.*, 2005); (Nes *et al.*, 2007)].
- ❖ **Les mutacines non-lantibiotiques :** Contrairement aux Lantibiotiques, les non-lantibiotiques ont un spectre d'inhibition étroit sur les bactéries à Gram positif et elles ne sont pas modifiées post-traductionnellement. Les mutacines non-lantibiotiques sont présentes dans chaque souche de *Streptococcus mutans* et sont classés comme les lantibiotiques selon le nombre de peptides.
- ❖ **Classification des non-lantibiotiques**
 - * **Les mutacines non-lantibiotiques mono-peptidiques (bactériocines de classe Iia, Iib) :** Ce groupe inclut les mutacines V, la mutacine F-59.1, la mutacine 1-T9 et la mutacine N.
 - * **Les mutacines non-lantibiotique di-peptidique (bactériocines de classe Iie) :** Ce groupe inclut la mutacine IV (NImA, NImB). Elle agit spécifiquement sur *Streptococcus mitis* et est inactive contre *Streptococcus mutans*, les staphylocoques et les entérocoques (Merritt et Qi, 2011).

b. Régulation de la production des mutacines

La production de mutacines peut être contrôlée par de nombreux facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la concentration en azote et en glucides et la présence d'éléments nutritifs comme les vitamines, et est aussi contrôlée par des facteurs génétiques.

Dans le cas de régulation génétique, le Quorum sensing et le système à trois composants comCDE contrôlent la mutacine IV. Tandis que, la mutacine I est difficilement contrôlée et sa régulation est moins comprise. Selon **Nguyen *et al.*, 2009** 17 gènes de fonctions cellulaires différentes telles que le de transport des sucres, l'hydrolyse des protéines/peptides, la synthèse des acides aminés et les nucléotides, le métabolisme de la paroi cellulaire sont impliqués dans la régulation de la mutacine I.

c. Rôles des bactériocines dans les interactions inter-espèces au sein du biofilm

Les bactériocines sécrétées par *S. mutans* jouent un rôle primordial dans la compétitivité au sein du biofilm. Les mutacines permettent à *Streptococcus mutans* d'envahir et coloniser les biofilms dentaires (**Merritt et Qi, 2011**).

En agissant comme des molécules messagères, les bactériocines affectent les interactions inter-espèces. Par exemple, *Streptococcus pyogenes* et *Streptococcus salivarius* produisent des Lantibiotiques structurellement similaires qui interagissent avec le système de régulation à deux composants propre à chacune. Néanmoins, la salivaricine qui est la bactériocine produite par *S. salivarius* inhibe la formation du biofilm par *S. pyogenes*. Donc, les bactériocines sécrétées par une souche bactérienne peuvent affecter d'autres souches présentes dans le biofilm (**Burton, 2011**).

Les substances apparentées aux bactériocines peuvent également être utilisées par des espèces bactériennes afin qu'elles puissent concurrencer d'autres espèces de la cavité buccale comme *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *F. nucleatum*, *Treponema denticola* (**Burton, 2011**)

Selon le chercheur Perry, l'autolyse de *S. mutans* médiée par la bactériocine auto-active intracellulaire ou encore appelée l'effecteur de mort sécrétée par la mutacine V pourrait avoir un lien avec la transformation génétique de la bactérie mais, cela se produit que lorsque la concentration du peptide stimulant la compétence (CSP) est élevée. On appelle ce mécanisme « Action intracellulaire contre soi » (**Qi et Kreth, 2010**).

En prenant en considération les propriétés antibactériennes des bactériocines à spectre étroit, des médicaments peuvent être développés ayant une efficacité meilleure et spécifique à la cible avec des effets secondaires mineurs. En utilisant les bactériocines dans le domaine de

la médecine, l'effet clinique souhaité peut être obtenu et la flore microbienne ainsi que la résistance bactérienne peuvent être évitées (**Merritt et Qi, 2011**).

I.7 Les actions anti-biofilm (Figure 4)

I.7.1 Inhibition de *S. mutans* en ciblant les exopolysaccharides

Le biofilm est une structure tridimensionnelle poly-microbienne, principalement composé de matrice exopolysaccharidique. Pour favoriser son détachement, certains produits chimiques comme les chélateurs de métaux, les réactifs chaotropiques et des enzymes spécifiques se sont avérés déstabiliser la matrice exopolysaccharidique (**Xavier et al., 2005**).

La matrice exopolysaccharidique sert de fraction clé du cadre de biofilm et sert de point de liaison pour l'adhérence bactérienne. De plus, l'EPS joue un rôle de protection pour les bactéries contre de nombreux facteurs tels que le pH, la température, la pression, l'attaque de l'hôte et les antibiotiques (**Yongwang et al., 2021**).

S. mutans forme des biofilms dentaires et elle est connue comme étant la cause majeure d'apparition des caries dentaires. Sa matrice exopolysaccharidique est composée de Glucanes insolubles avec une liaison Alpha-1,3 et Glucanes solubles avec une liaison Alpha-1,6. Une expérience a été réalisée in Vitro pour expliquer l'action de dégradation de l'EPS en utilisant des enzymes spécifiques. Ces enzymes sont la mutanase et la dextranase qui agissent respectivement sur les liaisons alpha-1,3 et alpha-1,6 de l'EPS pour la dégrader et disperser le biofilm dentaire tout en stabilisant le pH et en gardant l'homéostasie (**Pleszczyńska et al., 2015**).

Il en résulte la libération des bactéries du biofilm qui deviennent plus sensibles aux agents antimicrobiens exogènes sans l'abri et la protection fournis par le biofilm. Ainsi, la dégradation de l'EPS peut être un moyen crédible pour prévenir les caries dentaires. Ceci a poussé l'industrie pharmaceutique à incorporer les mutanases et dextranases dans les produits d'hygiène bucco-dentaire comme les bains de bouches et les dentifrices (**Yongwang et al., 2021**).

Plusieurs autres stratégies sont adoptées dans l'intention d'inhiber la formation des EPS et le biofilm ainsi que pour prévenir sa mise en place sur les surfaces des dents. Pour inhiber la formation du biofilm cariogène, le ciblage des glycosyltransférases (GTFs) est l'une des mesures adoptées (**Qiong et al., 2021**).

Les GTFs jouent un rôle essentiel dans la pathogénèse des caries dentaires médiée par *S. mutans*. Les GTFs améliorent la formation du biofilm et permettent l'adhérence des bactéries par un mécanisme dépendant de saccharose. Lorsque la concentration du saccharose augmente dans le milieu, *S. mutans* utilise les GTFs pour produire les glucanes. Ces derniers fournissent des sites de liaison pour les bactéries, les glucanes assurent également l'adhérence avec les protéines de la salive dans la pellicule acquise exogène favorisant ainsi la formation du biofilm ainsi que les exopolysaccharides [(Moataz *et al.*, 2021) ; (Qiong *et al.*, 2021)].

I.7.2 Régulation et ciblage de l'expression des gènes liés à l'EPS

La formation de biofilm implique plusieurs gènes et voies. Il est donc possible d'affecter sa formation par des mesures qui agissent sur le plan génétique, comme la détection du système QS, l'interférence avec le système de détection à deux composants (TCS), la modulation du métabolisme des EPS par des signaux du second messager. De plus, l'ARN anti-sens est également ciblé car il est impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle alors que le système CRISPR-Cas sert d'outil pour l'édition des gènes (Yongwang *et al.*, 2021).

I.7.3 Système de détection à deux composants TCS

Le TCS constitue un mécanisme de transduction et intégration du signal. Il est nommé ainsi car il est composé par une protéine capteur qui est l'Histidine Kinase (HK) située sur la membrane, et un régulateur de réponse cytoplasmique (RR). Ces deux composants communiquent par un transfert de phosphate [(Biswas *et al.*, 2008) ; (Groisman, 2016) ; (Rosales-Hurtado *et al.*, 2020)].

Après la détection d'un signal, la protéine HK le capte et hydrolyse l'ATP en ADP. Elle permet l'autophosphorylation de son résidu histidine conservé dans son domaine transmetteur. Puis, le groupement phosphate est transféré sur le résidu Aspartate conservé dans son domaine receveur propre au RR.

Ce système permet à la de percevoir les changements environnementaux et il lui permet de s'adapter au mieux avec les conditions nouvelles du milieu. Pour cela, des approches visent à cibler chimiquement la protéine HK du TCS bactérien soit dans le domaine sensoriel ou catalytique pour inhiber et perturber la formation du biofilm (Cong *et al.*, 2019).

I.7.4 Inhibition du biofilm par des produits naturels

La maturation du biofilm peut générer des maladies dentaires telles que les gingivites, parodontites, les caries dentaires... Pour surmonter la virulence du biofilm, les chercheurs se sont penchés vers l'utilisation des plantes naturelles pour leurs effets en tant qu'agent anti-biofilm. Ces produits naturels, sont fréquemment utilisés car ils sont moins coûteux que d'autres procédés et ils ont moins d'effets secondaires sur la santé de l'être humain.

Parmi les produits naturels utilisés comme agent anti-biofilm, le thé (vert, noir...) a été reconnu pour son effet anti-cariogène. Il contient quatre flavonoïdes essentiels qui sont : les catéchines épicatechines (EC), l'épigalocatechines (EGC), l'épigalocatechine gallate (ECG) et l'épigallocatechine gallate (EGCG) (**Mi-Ah et al., 2020**). Parmi ces flavonoïdes les EGCG sont les plus importants car ils inhibent l'adhésion initiale de *S. mutans*, ils inhibent la production d'acides et ciblent également les gènes *gtfs* et les enzymes GTFs responsables de la production de glucane, élément majeur de la matrice exopolysaccharidique de *S. mutans* (**Moataz et al., 2021**).

Les mêmes effets du thé sont présents dans les raisins et encore plus dans les canneberges. La canneberge empêche les bactéries de s'accrocher aux dents et gencives grâce aux proanthocyanidines (PACs) qu'elle contient. Ces PACs inhibent le fonctionnement des bactéries pathogènes en régulant l'expression de leurs gènes. Ils participent aussi à l'atténuation des douleurs gingivales et diminuent les inflammations dentaires. C'est pour ces raisons que les extraits de canneberges sont incorporés dans les produits d'hygiène buccodentaire (**Anonyme, 2022**).

Les algues marines peuvent aussi contribuer à la prévention et l'inhibition du biofilm dentaires. Elles contiennent des polysaccharides sulfatés appelés fucoïdanes qui selon des expériences scientifiques, présentent une activité anti-adhésion aux surfaces dentaires ce qui contribue sans doute à l'inhibition du biofilm (**Pourhajibagher et al., 2021**).

I.7.5 Les probiotiques et les prébiotiques

Les probiotiques sont des microorganismes qui regroupent notamment les bactéries lactiques, des moisissures et quelques levures. Ils peuvent avoir un effet bénéfique sur la santé systémique de l'individu s'ils sont incorporés dans des denrées alimentaires en quantité adéquate [(**Sanders, 2008**) ; (**Barzegari et al., 2020**)]. Les probiotiques peuvent être utilisés

pour aider à prévenir ou à réduire les caries dentaires. Pour que cela arrive, le probiotique doit tout d'abord adhérer aux surfaces dentaires. Ensuite, il doit s'intégrer aux communautés bactériennes qui forment le biofilm buccal. Enfin, après intégration le probiotique occupe une place dans le biofilm qui serait autrement colonisé par un agent pathogène et donc le probiotique entre en compétition pour empêcher la prolifération bactérienne [(**Twetman et Stecksens-Blicks., 2008**) ; (**Zaura et Twetman., 2019**)].

Des recherches ont montré que lorsque les probiotiques sont ajoutés aux produits alimentaires comme *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui sont les plus couramment additionnés aux yaourts et aux fromages, ils peuvent avoir des effets de prévention des caries chez les adultes et les enfants [(**Cagetti et al., 2013**) ; (**Rodriguez et al., 2016**) ; (**Taipale et al., 2016**)]. Mais, pour que ces probiotiques soient efficaces, ils doivent présenter certaines caractéristiques :

- Ils doivent être présents en quantité suffisante et adéquate dans la denrée alimentaire.
- Ils doivent être stables et viables durant la période de conservation.
- Ils doivent être de qualité alimentaire et bénéfique pour l'hôte.

Quant aux prébiotiques, ce sont des substrats utilisés de façon sélective par les microorganismes hôtes pour apporter un avantage pour la santé. Ils peuvent être soit des enzymes salivaires ou des alcools (**Gibson et al., 2017**).

La L-arginine est un exemple d'enzyme salivaire humaine utilisée comme prébiotique oral. Elle rend l'environnement du biofilm inadapté au microbiome cariogène car elle augmente le pH in situ via l'arginine désiminase (ADS), elle améliore également la production alcaline via des bactéries arginolytiques, telles que *S. sanguinis* et *S. gordonii* [(**Nascimento et al., 2014**) ; (**Zheng et al., 2017**)]. Des expériences ont révélées que L-arginine est considéré comme un perturbateur potentiel du biofilm qui a l'habilité d'affecter l'adhésion de *S.mutans*. En outre, les alcools de sucres tels que le xylitol, le sorbitol, le maltitol et l'érythritol sont considérés comme des inhibiteurs du biofilm cariogène notamment le xylitol qui est utilisé dans les dentifrices, les gommes à mâcher. Selon des recherches scientifiques, le xylitol possède plusieurs effets bénéfiques sur la prévention des caries dentaires [(**Soderling et Hietala-Lenkkeri., 2010**) ; (**Thabuis et al., 2013**) ; (**Falony et al., 2016**)]. Les chercheurs scientifiques ont affirmé que l'efficacité des probiotiques et

prébiotiques sur les biofilms devient supérieure lorsqu'ils fonctionnent en synergie (Yongwang *et al.*, 2021).

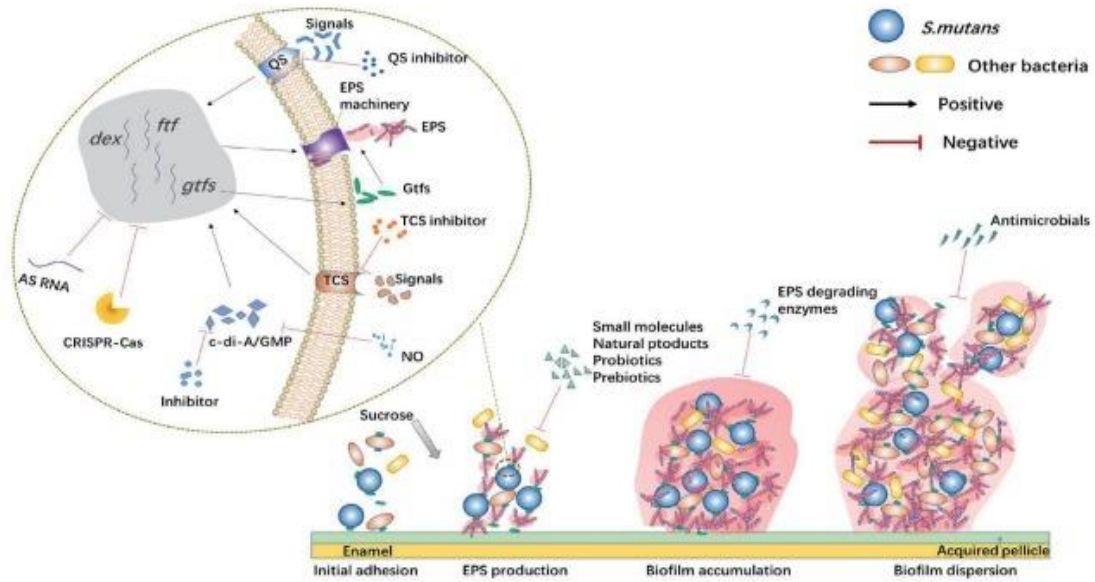


Figure 4 : Représentation schématique des différentes stratégies ciblant les exopolysaccharides de *S. mutans* (Yongwang *et al.*, 2021).

Matériel et méthodes

II. Matériel et méthodes

Le biofilm buccal est considéré comme étant l'un des problèmes dentaires qui touchent plusieurs personnes et qui influent sur l'hygiène buccodentaire ainsi que sur la santé systémique des individus. L'inhibition du biofilm dentaire est donc essentielle afin de prévenir et traiter les maladies parodontales notamment les caries qui sont les plus répandues.

Dans cette partie, nous allons traiter deux articles scientifiques qui ont pour but l'inhibition du biofilm buccal.

Article 1 : Inhibition of oral biofilm formation by zwitterionic nonfouling coating (Inhibition du biofilm oral par un revêtement zwitterionique non-encrassant). Ce travail a été réalisé par **Fang et al., 2021**.

Article 2: Probiotic *Lactobacillus sp.* inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans* (Probiotique *Lactobacillus sp.* inhibent la croissance, la formation de biofilms et l'expression génique de *Streptococcus mutans* inducteur de caries). Ce travail a été réalisé par **Wasfi et al., 2017**.

II.1 Article 1 : Inhibition du biofilm oral par un revêtement zwitterionique non-encrassant

II.1.1 Test de résonance plasmonique de surface

Le test de résonance plasmonique de surface est une technique qui permet de détecter un ligand qui peut être une molécule biologique, molécule organique ou un microorganisme qui se fixe à un récepteur qui lui-même est immobilisé sur une surface.

Dans cette étude, l'adsorption de la pellicule salivaire sur les surfaces des puces SPR en or modifiées avec des brosses en polymère pCB a été réalisée par un capteur SPR à quatre canaux construit sur mesure (**Fang et al., 2021**).

Les brosses en polymère pCB ont été formées sur des puces SPR en or nettoyées à l'ozone UV par une polymérisation radicalaire par transfert d'atomes amorcée en surface selon la même méthode susmentionnée (**Sun et al., 2016**). Ensuite, ces puces modifiées en pCB ont été rincées avec l'éthanol, de l'eau distillée et séchées à l'azote. Puis, elles ont été montées sur le dispositif SPR. Le dispositif du SPR est doté d'un régulateur de température,

ce dernier a été réglé à $25^{\circ} \pm 0.01^{\circ}\text{C}$. Ensuite, l'adsorption de la pellicule salivaire a été mesurée en faisant couler séquentiellement du PBS à un débit de $40 \mu\text{L}/\text{min}$ et par une pompe péristaltique une solution de salive et du PBS ont été coulés chaque 10 min (**Fang et al., 2021**).

Afin de quantifier la qualité totale de la pellicule salivaire adsorbée, le décalage de longueur d'onde entre les lignes de base avant l'injection de salive et après le rinçage avec du PBS a été utilisé. De plus, un canal de référence a été utilisé pour chaque puce qui contenait un flux PBS pour corriger la dérive de la ligne de base. Un décalage de longueur d'onde d'1 nm par rapport au SPR à 750 nm représente une couverture de surface de $17 \text{ ng}/\text{cm}^2$ de protéines adsorbées et, la limite de détection du capteur SPR est de $0.3 \text{ ng}/\text{cm}^2$ (**Fang et al., 2021**).

II.1.2 Synthèse et modification de surface par pCB (DOPA)4

La synthèse du pCB(DOPA)4 a été rapporté dans l'article de **Sun et al., 2016 (Annexe 1)**. La synthèse du pCB (DOPA)4 a été lancée avec un initiateur contenant de la DOPA, et les groupes catéchols dans l'initiateur ont été protégés par du tert-butyl-di-méthyl-silyle. La polymérisation du CB avec l'initiateur a été réalisée dans du méthanol à température ambiante pendant 24 heures. Lorsque la réaction a atteint la conversion souhaitée, les groupes protecteurs sur le catéchol de l'initiateur ont été déprotégés par le TBAF¹ et TFA² (**Fang et al., 2021**).

Pour revêtir le polymère sur les échantillons de l'émail, 6 mg de polymère déprotégé ont été dissous dans 3 mL de Tampon Tris à $\text{pH} = 8.5$ dans un tube à centrifuger de 5mL. Un faisceau de l'émail a été placé dans le tube et immergé pendant 4 heures. Les disques d'émail recouverts de pCB-(DOPA)4 par cette méthode ont été lavés 2 fois avec l'eau distillée et séchés avec un flux d'air avant le test (**Fang et al., 2021**).

¹TBAF :Fluorure de tétra-n-butylammonium, ²TFA :Acide trifluoroacétique

A l'aide d'un microscope Raman Thermo Scientific DxR3 un objectif 50x a été utilisé pour pouvoir focaliser un laser de 512 nm sur des échantillons de test et pour collecter la lumière diffusée à 180° de la surface de l'échantillon. A 10mW, la puissance du laser a été fixée et le temps d'expositions était de 10 secondes avec 5 cycles. Une résolution spectrale de 1.1 cm^{-1} peut être atteinte et des spectres allant de 400 à 1800 cm^{-1} ont été collectés (**Fang et al., 2021**).

II.1.3 Mesures d'adsorption de protéines non spécifiques

❖ Adsorption des protéines évaluée par des méthodes ELISA

Des échantillons de l'émail modifiés et non modifiés par pCB(DOPA)4 ont été placés dans une plaque à 24 puits sur lesquels 0,5 mL de fibrinogène de plasma humain à 1mg/mL a été ajouté à 37°C pendant 90 min. Les substrats ont ensuite été rincés 5 fois avec 0,5 mL de PBS et incubés dans une solution de BSA (1mg/mL dans du PBS à pH= 7,4) pendant 90 min à 37°C.

Les substrats ont été rincés avec du PBS, transférés dans de nouveaux puits et incubés dans une solution de 0,5 mL de PBS à pH= 7,4 contenant 1 $\mu\text{g/mL}$ d'anti-fibrinogène conjugué à la peroxydase de raifort à 37°C pendant 30 min. Les 6 échantillons ont été rincés avec 0,5 mL de PBS et transférés dans des puits propres, suivis de l'ajout de 0,5 mL de Tampon Citrate- Phosphate 0,1 M à pH 5.0 contenant 1 $\mu\text{g/mL}$ d'OPD et 0,03% de peroxyde d'hydrogène.

Après un temps d'incubation de 20 minutes à 37°C, la réaction colorée induite par l'enzyme a été arrêtée en additionnant 500 μL de H_2SO_4 1M à la solution dans chaque puits. Enfin, par un lecteur de microplaques l'absorbance de l'intensité lumineuse à 492 nm a été déterminée. L'absorbance des échantillons d'émail non modifiés était équivalente à 100% pour le calcul des valeurs d'encrassement relatives (**Fang et al., 2021**).

II.1.4 Test d'adhérence microbienne

Dans le but d'étudier la résistance du pCB(DOPA)4 sur les surfaces d'émail à l'adhésion bactérienne, les chercheurs ont utilisés trois bactéries qui sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans* (**Fang et al., 2021**). Le test d'adhérence microbienne a été effectué comme suit :

- D'abord, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* ont été cultivés séparément sur des plaques de gélose trypticase soja agar (TSA) alors que *Streptococcus mutans* a été cultivé sur une plaque de gélose au sang. Ensuite, toutes ces bactéries ont été cultivées individuellement dans le bouillon TSB.
- Ensuite, Les cultures ont été incubées à 37°C, agitées à 200 tr/min pendant une nuit. Après 14 heures d'incubation *P.aeruginosa* et *S.aureus* ont atteint une concentration finale de 8×10^8 cellules/mL tandis que *S.mutans* a atteint une concentration de 6×10^8 cellules/mL après 36 heures d'incubation (**Fang et al., 2021**).

Les échantillons d'émail ont été lavés trois 3 fois avec de l'eau distillée dans une plaque de 24 puits et dans chaque puits, 1ml de suspension bactérienne a été ajouté. Ensuite, les bactéries ont été incubées avec les échantillons à 37°C pendant 24 heures. Pendant ce temps d'incubation, la solution bactérienne a été changée toutes les 6 heures pour s'assurer que les bactéries en contact avec les échantillons étaient dans un état sain. Puis, la solution bactérienne a été retirée et les faisceaux d'émail ont été lavés 3 fois avec du PBS. Par la suite, les bactéries adhérentes aux surfaces des échantillons ont été colorées avec 400 µL de SYTO9 pendant 5 minutes. C'est une coloration contre-nucléaire et fluorescente verte. Elle a une haute affinité pour l'ADN et elle colore à la fois les bactéries Gram-positives et Gram-négatives vivantes et mortes (**Fang et al., 2021**).

- Après 3 lavages avec du PBS, les échantillons avec des bactéries colorées ont été observés à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser monté sur un scanner à résonance avec grossissement x200.
- Enfin, lors de l'observation par les chercheurs, des images ont été prises à $\lambda_{ex}=488$ nm/ $\lambda_{em}=520$ nm. Par le biais d'un logiciel nommé imageJ, 5 images au microscope ont été analysées pour mesurer l'intensité intégrée totale de la fluorescence sur chaque échantillon afin de calculer l'adhésion bactérienne relative (**Fang et al., 2021**).

II.1.5 Analyse statistique

A l'aide d'Excel, l'analyse statistique a été réalisée. Les valeurs moyennes avec SD sont rapportées et toutes les expériences ont été réalisées en 5 répétitions (Pour voir l'erreur). Les barres d'erreur correspondent à l'écart type. Un test t a été utilisé pour examiner les

différences entre les deux groupes. Les valeurs $p < 0,001$ sur un test bilatéral ont été considérés comme statistiquement significatives (**Fang *et al.*, 2021**)

II.2 Article 2 : Probiotic *Lactobacillus sp.* inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans* (Probiotique *Lactobacillus sp.* inhibent la croissance, la formation de biofilms et l'expression génique de *Streptococcus mutans* inducteur de caries). Ce travail a été réalisé par **Wasfi et al., 2017**.

Dans cette étude, les chercheurs ont utilisés 4 souches de *Lactobacillus sp.* qui sont *Lactobacillus casei* (ATCC393) *Lactobacillus reuteri* (ATCC 14917) et *Lactobacillus salivarius* (ATCC 11741) et *Lactobacillus plantarum*. Ces dernières ont été sélectionnées afin d'étudier leur effet sur *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) isolée de dentine cariée.

Lactobacillus sp. et *Streptococcus mutans* ont été cultivés en utilisant la gélose MRS et un milieu de l'infusion cerveau-cœur (BHI), respectivement à 37°C dans des conditions d'anaérobiose en utilisant des sachets Oxoid Anaerogen (**Wasfi et al., 2017**).

II.2.1 Préparation du surnageant de culture épuisé (SCS)

Pour chaque souche de *Lactobacillus sp.* le surnageant de culture a été préparé selon **Lin et al., 2015 (Annexe 2)**. Ensuite, le surnageant a été filtré à l'aide de filtres de 0,45 µm. Puis, le surnageant a été divisé en 4 portions. Parmi ces portions, une seule n'a pas été traitée et les 3 restantes ont été traitées pour éliminer l'effet des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et de la bactériocine.

En outre, en ajustant le pH du SCS à 6,5 avec du NaOH 1N, l'effet du bio-acide a été neutralisé. Les deux autres portions ont été traitées avec 1mg/mL de trypsine (Sigma-Aldrich, USA) et 0,5 mg/mL de catalase (Sigma-Aldrich, C1345, USA) afin d'éliminer respectivement l'effet de la bactériocine et du peroxyde d'hydrogène. Les surnageants traités et non traités ont été stockés à 20°C (**Wasfi et al., 2017**).

II.2.2 Test antibactérien du SCS traité et non traité

➤ SCS Non traité

Pour déterminer l'activité antibactérienne du SCS, *Streptococcus mutans* a été cultivé à 37°C pendant une nuit dans le bouillon BHI. La culture de *S.mutans* a été diluée avec un bouillon BHI jusqu'à une turbidité équivalente à 0,5 McFarland. Ensuite, 100 µL de la suspension bactérienne de *S.mutans* a été ajouté aux puits de la plaque de microtitration à 96 puits en huit répétitions pour chaque SCS de *Lactobacillus*. Les plaques ont ensuite été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures (**Wasfi et al., 2017**).

➤ SCS traité

Dans les puits témoins, le SCS a été remplacé par le bouillon MRS stérile. La DO 600 nm a été enregistrée après incubation à l'aide d'un lecteur de microplaques [(Chew *et al.*, 2015) ; (Wasfi *et al.*, 2017)] après l'élimination de l'effet du :

- pH,
- acide,
- peroxyde d'hydrogène
- la bactériocine.

Les mêmes étapes précédentes ont été répétées avec les surnageants traités pour déterminer le changement d'activité antimicrobienne.

II.2.3 L'effet de *Lactobacillus sp.* sur l'adhésion de *S.mutans*

Ce test a été effectué d'une manière similaire au test antimicrobien en utilisant le milieu BHI additionné de 0,2% de saccharose. Après incubation, les surnageants ont été retirés, les plaques ont été colorées et la réduction de la formation du biofilm a été évaluée par un dosage au cristal violet comme précédemment décrit par [(Wasf *et al.*, 2012) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

II.2.4 L'effet du surnageant de culture épuisé de *Lactobacillus sp.* sur un biofilm préformé de *S.mutans*

Une culture d'une nuit de *Streptococcus mutans* a été diluée à 0,5 McFarland dans du BHI additionné de 0,2% de saccharose. Un volume de 100µL a été distribué dans les puits de la microplaque à 96 et incubée à 37°C pendant 24 heures. La suspension a été enlevée et les puits ont été lavés avec une solution saline stérile. Aussi, un volume de 100 µL de surnageant non traité a été ajouté dans chaque puits et incubé à 37°C pendant 24 heures. La réduction de la formation de biofilm a été déterminée comme décrit précédemment par [(Wasf *et al.*, 2012) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

II.2.5 Observation au microscope électronique à balayage (MEB) du biofilm des co-cultures de *S.mutans-Lactobacillus sp.*

Streptococcus mutans et *Lactobacillus sp* ont été co-cultivés pendant une nuit à 37°C dans des bouillons BHI et MRS respectivement suivis d'une dilution à une concentration équivalente à 0,5 McFarland. Une lame de couverture stérile propre a été ajoutée aux puits de la plaque à 6 puits. Dans chaque puits, 250 µL de la suspension de *S. mutans* et 250 µL de l'un des *Lactobacillus sp.* en suspension ont été ajoutés à 1,5 mL de bouillon BHI, supplémenté avec 0,2% de saccharose et incubé en anaérobiose à 37°C pendant 24 heures (Wasfi *et al.*, 2017).

Une culture mono-spécifique de biofilm de *S.mutans* a été préparée de manière similaire sauf que *Lactobacillus sp.* a été remplacé par des incultes du milieu MRS. Les lames de couverture ont été doucement lavées une fois avec une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), fixées et préparées pour l'observation SEM selon un protocole précédemment publié [(Wu *et al.*, 2015) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

II.2.6 Extraction de l'ARN bactérien total

L'effet du surnageant filtré de *Lactobacillus sp.* sur *Streptococcus mutans* a été étudié sous forme planctonique et sous forme de biofilm. *Streptococcus mutans* a été cultivé pendant une nuit à 37°C dans du bouillon BHI et a été diluée à McFarland 0,5. Un volume de 250 µL de suspension de *S.mutans* et 250 µL de SCS ont été ajouté à 1,5 mL de bouillon BHI et ont été incubés en anaérobiose à 37°C pendant 24H (Wasfi *et al.*, 2017).

Dans les puits témoins, le surnageant de *Lactobacillus sp.* a été remplacé par du bouillon MRS (Lin *et al.*, 2015). Après incubation, la suspension de culture a été retirée des puits pour l'extraction de l'ARN des bactéries planctoniques. Les cellules adhérentes aux puits de la plaque ont été lavées deux fois avec une solution saline stérile, puis délogées et mises en suspension dans une solution saline par grattage dans un tube à centrifuger. L'ARN total a été isolé des cellules planctoniques et adhérentes de *S.mutans* à l'aide du Kit Direct-Zol RNA MiniPrep conformément aux instructions du fabricant. L'ADN restant dans les échantillons d'ARN a été traité par la DNase I sans RNase pour éliminer la contamination par l'ADN (Wasfi *et al.*, 2017).

L'électrophorèse sur gel d'agarose des échantillons d'ARN a vérifié son intégrité. La concentration et la pureté de l'ARN ont été déterminées par le spectrophotomètre ND-1000. Enfin, le kit de synthèse d'ADNc a été utilisé pour inverser la transcription de 1 microgramme d'échantillon d'ARN total en ADNc (Wasfi *et al.*, 2017).

II.2.7 Réaction en chaîne par polymérisation quantitative en temps réel (qRT-PCR) et analyse des données :

A l'aide de la qRT-PCR, les chercheurs ont examiné l'effet de *Lactobacillus sp.* surnageant déposé sur les niveaux d'expression de 10 gènes cibles (gtfb, gtfc, gtfD, sacB, comC, comD, vick, vickR, aguD et atpD) impliqués dans la production de glucanes, defructanes, la détection du Quorum sensing et la tolérance aux acides chez *Streptococcus mutans*. Les amorces utilisés pour l'amplification des gènes comC, comD et sacB ont été conçues à l'aide de la séquence complète du génome de *S.mutans* ATCC 25175 obtenue à partir de la base de données NCBI (N° d'accèsion GenBank PRJNA 179256) et utilisée comme base pour la conception des amorces.

Les amorces pour la qPCR utilisées (**Tableau 4, Annexe 3**) ont été synthétisées par Invitrogen. La réaction en chaîne par polymérase de transcription inverse quantitative en temps réel (qRT-PCR) a été réalisée par l'instrument Applied-Biosystems-Stepone™ en utilisant SensiFast™ SYBQ Hi-Rax Master. Toutes les réactions (20 microlitres) ont été réalisées en utilisant 3 répétitions techniques. Chaque mélange réactionnel contenait 100 ng d'ADNc et 400 nM d'amorces par réaction. Les conditions de cycles RT-PCR étaient les suivantes :

- 1 cycle à 95°C pendant 2 minutes.
- 40 cycles de dénaturation à 95°C pendant 5 secondes.
- Annelage à 52-62°C (selon les amorces utilisées) pendant 10 secondes.
- Extension et la collecte de données fluorescentes à 72°C pendant 20 secondes.

Une courbe de dissociation a été générée à la fin de chaque réaction. Dans toutes les analyses de qPCR, des contrôles négatifs sans matrice ont été exécutés en parallèle. Le gène ARN-16s (gène de ménage) a été sélectionné comme contrôle interne sur la base des résultats du logiciel BestKeeper [(Plaff *et al.*, 2004) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

Les niveaux relatifs d'ARNm des gènes d'intérêt ont été déterminés et normalisés à l'expression du gène domestique en utilisant l'analyse de la valeur $\Delta\Delta$ CT [(Plaff *et al.*, 2004) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

Les données de la qPCR ont été exprimées sous la forme de facteur de variations des niveaux d'expression des gènes dans les cellules de *S.mutans* ATCC 25175 exposées au SCS des 4 *Lactobacillus sp.* testés par rapport à leurs niveaux dans les cellules non-traités (étalons). Les changements dans l'expression des gènes ont été testés dans les cellules de *Streptococcus mutans* sous forme planctonique et à l'état de formation de biofilm (Wasfi *et al.*, 2017).

II.2.9 Analyse statistiques

Les résultats expérimentaux ont été analysés pour leur signification statistique à l'aide de GraphPadPrism. Une analyse de variance à un facteur (ANOVA) a été réalisée. Les comparaisons de données ont été effectuées à l'aide du test de comparaison multiple de Dummett ou du test de comparaison de Tukey (Wasfi *et al.*, 2017).

Résultats et Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1 Article 1 : Inhibition du biofilm oral par un revêtement zwitterionique non-salissant

III.1.1 Résultats de résistance de la pellicule salivaire aux polymères pCB

Dans ce travail, afin d'étudier l'adsorption pelliculaire non spécifique sur les polymères à base de pCB, ils ont fait passer des échantillons de salive humaine (**Jiang et al., 2010**) non diluée à travers une puce en or modifiée par le pCB sur un capteur SPR ultrasensible. Ce dernier est couramment utilisé pour étudier les interactions biomoléculaires, comme illustré sur la figure 5 (a). Après avoir fait couler du PBS, de la salive et du PBS consécutivement, toute adsorption non spécifique laissée sur la surface du capteur induira le décalage de longueur d'onde SPR et la sensibilité atteint ng/cm^2 . L'adsorption en temps réel peut être surveillée et enregistrée dans le sensogramme SPR. Dans la figure 5 (b), le sensogramme SPR démontre une adsorption de protéine ou de pellicule non spécifique extrêmement faible ($0.4 \text{ ng}/\text{cm}^2$) sur une surface de capteur modifiée par pCB. Ce nombre est proche de la limite de détection du capteur SPR (**Fang et al., 2021**).

D'après les résultats illustrés dans la figure 5, on remarque que la modification du pCB peut repousser l'adsorption non spécifique de ce milieu complexe. Cependant, sur la puce de contrôle non modifiée, l'adsorption non spécifique est d'environ $113,2 \text{ ng}/\text{cm}^2$, soit environ 282 fois plus élevée que celle recouverte de pCB. Ce résultat a tout d'abord révélé les propriétés anti-salissantes des matériaux à base de pCB contre la salive humaine et il a également jeté des bases solides pour d'autres essais afin de résister à l'adhésion orale et bactérienne subséquente (**Fang et al., 2021**).

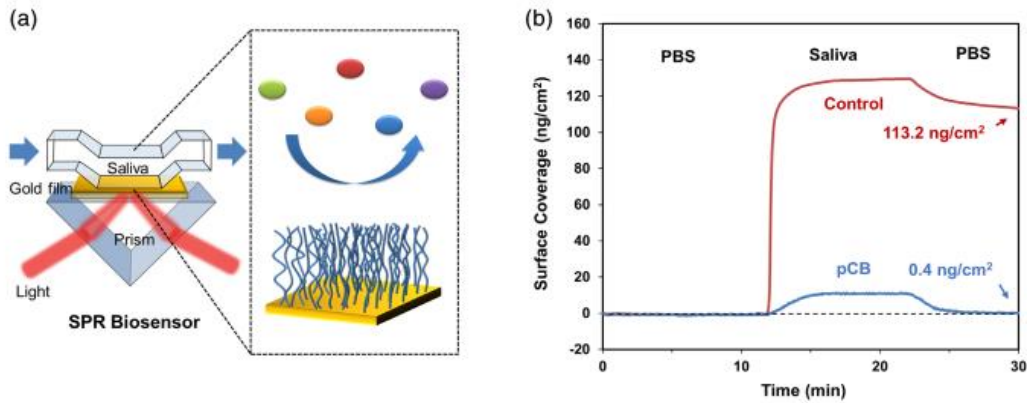


Figure 5 :(a) Illustration schématique de la salive humaine circulant dans le biocapteur SPR modifié avec des brosses en polymère pCB.(b) Sensorgramme SPR typique des surfaces dorées modifiées par le pCB lorsqu’elles sont exposées à la salive humaine (**Fang *et al.*, 2021**)

Après avoir émis l’hypothèse que l’adhésion et la colonisation subséquente des bactéries buccales pourrait être réduite par inhibition de la pellicule salivaire ou de l’adsorption protéique, les chercheurs ont d’abord étudié l’interaction entre les pellicules salivaires et le pCB en utilisant un système SPR ultra-sensible. Ce dernier a montré une adsorption ultra-faible en protéines sur les polymères pCB à partir de la salive non diluée. Ce test n’a jamais été fait auparavant, il est fondamental et révèle les propriétés anti-salissures du pCB contre la solution salivaire complexe. Lorsque les polymères pCB sont enduits à la surface, la force de pelage de l’eau les rend instables, en particulier dans des conditions humides, comme les environnements intrabuccaux (**Fang *et al.*, 2021**).

III.1.2 Revêtement du pCB-(DOPA)4 sur la surface HA

Le polymère zwitterionique à base de pCB a démontré une résistance efficace à l’adsorption de la pellicule à partir de la salive humaine, bien qu’il soit encore essentiel de développer une méthode pour les enduire à la surface de la dent en obtenant un revêtement à haute densité et une stabilité à long terme. Des groupes de catéchol comme le DOPA ont été étudiés pour l’agent de revêtement de surface universel, et il a été signalé qu’ils avaient des affinités de liaison plus fortes avec les surfaces biologiques des dents comme l’HA. Dans cette étude, **Fang et ses collaborateurs** ont utilisé le DOPA comme groupe d’ancrage pour le revêtement pCB sur les surfaces d’hydroxyapatite (HA) ou émail. La solubilité dans l’eau des polymères pCB les rend moins stables lors de leur fixation sur les surfaces, en particulier dans l’environnement intrabuccal (**Fang *et al.*, 2021**).

Par conséquent, ils ont introduit quatre groupes de catéchols pour augmenter la force de liaison du pCB. La réticulation est une autre stratégie pour stabiliser la liaison. Pour réaliser la réticulation entre les groupes de catéchol, un groupe d'amine libre est incorporé près de chaque groupe de catéchol. Sous pH = 8,5 conditions aqueuses, l'addition de Michael entre l'amine et l'hydroquinone adjacente formera une réticulation covalente intermoléculaire pour augmenter davantage la force de liaison. Le procédé de revêtement du pCB-(DOPA)₄ sur la surface HA était simple et pratique. En immergeant les disques HA dans la solution pCB- (DOPA)₄ Tris pendant 4h, le polymère a pu être modifié avec succès sur la surface HA. Contrairement au revêtement universel traditionnel à base de dopamine ou de DOPA qui apparaît comme une couleur brun foncé²⁰, le pCB-(DOPA)₄ a démontré un revêtement transparent et presque incolore sur les disques HA (Figure 6 a) (**Fang et al., 2021**).

La spectroscopie Raman a été utilisée pour s'assurer que le revêtement pCB-(DOPA)₄ était réalisé efficacement sur la surface HA. Au milieu de la figure 6 (b), les chercheurs ont montré le spectre Raman typique de l'HA avec des pics HA caractéristiques, y compris la courbure symétrique PO₄ ν₂, la courbure antisymétrique PO₄ ν₄ et la courbure symétrique PO₄ ν₁ [(**Kazanci et al., 2006**) ; (**Fang et al., 2021**)]. En soustrayant le spectre Raman de l'HA non couché du pCB-(DOPA)₄ HA enrobés, le spectre a illustré plusieurs pics à 969, 990 et 1599 cm⁻¹. Ces pics sont dérivés de la courbe du benzène et du mode de vibration du groupe catéchol sur le pCB-(DOPA)₄ [(**McGlashen et al., 1990**) ; (**Fang et al., 2021**)].

Ce résultat indique que le pCB- (DOPA)₄ a été stabilisé sur les surfaces HA à travers les groupes DOPA (**Fang et al., 2021**).

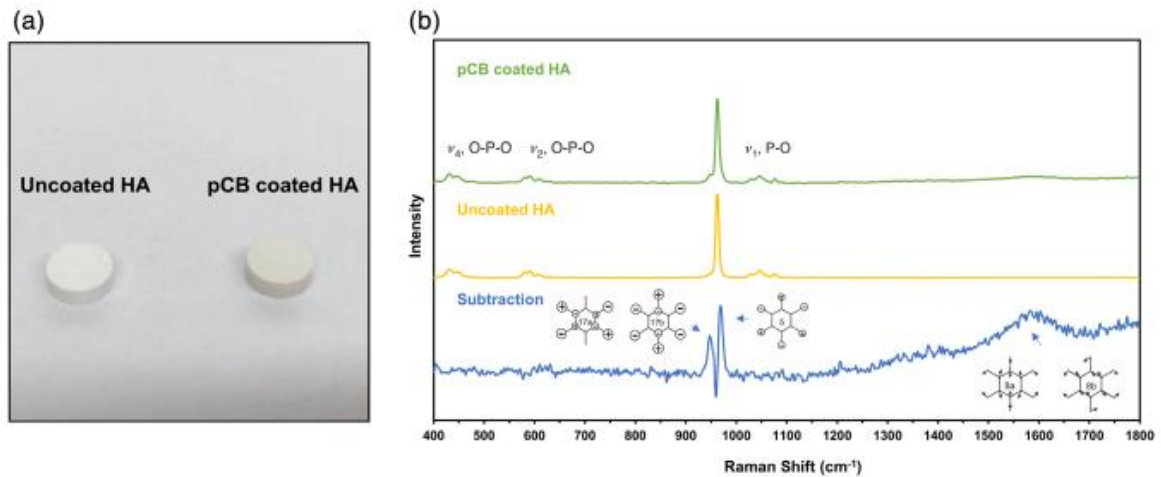


Figure 6 :(a) Comparaison de la surface HA avant et après revêtement au pCB-(DOPA)4. (b) spectroscopie Raman du pCB-(DOPA)4 enduit et surfaces dénudées

Après avoir réalisé le test de résistance de la pellicule salivaire aux polymères pCB les chercheurs ont spécialement conçu quatre groupes DOPA. Ces groupes ont été utilisés pour les associer au polymère pCB afin de fournir une modification de surface stable et pratique sur les surfaces HA et émail dentaire. Par des méthodes d’immersion simples, le polymère pCB-(DOPA)4 peut être facilement enduit sur les surfaces HA et émail dentaire. Les quatre DOPA peuvent se relier les uns aux autres pour plus de stabilité (Fang *et al.*, 2021).

III.1.3 Adsorption protéique non spécifique sur la surface HA revêtue de pCB-(DOPA)4

Les bactéries buccales peuvent adhérer à la surface de la dent par des mécanismes non spécifiques ou spécifiques. L’adhérence non spécifique des bactéries est principalement induite par des interactions physiques telles que les interactions hydroponiques ou électrostatiques. L’adhésion spécifique des bactéries repose sur les pellicules pré-absorbées sur la surface de la dent comme ligands pour attirer l’adhésion bactérienne. L’introduction du revêtement zwitterionic CB-(DOPA)4 sur la surface de la dent peut fournir une surface ultra hydrophile, neutrement chargée qui peut résister à l’adsorption non spécifique de protéines ou de pellicules. Ainsi, le pCB-(DOPA)4 peut potentiellement inhiber une adhérence bactérienne spécifique et non spécifique (Fang *et al.*, 2021).

L’un des principaux objectifs de ces travaux est de réduire l’adsorption de protéines non spécifiques sur les surfaces de l’HA et de l’émail par modification au pCB-(DOPA)4. Le test ELISA a été utilisé pour quantifier l’adsorption des protéines (fibrinogène) pour les

surfaces enduites et non enduites d'HA et d'émail. L'adsorption sur les disques HA nus et les échantillons d'émail a été établie comme référence. Comme le montre la figure 7, les disques HA modifiés pCB-(DOPA)₄ ont montré 8,2 1,4 % d'adsorption protéique et les faisceaux d'émail modifiés pCB-(DOPA)₄ ont montré 6,9 2,5 % d'adsorption protéique, comparativement aux témoins non modifiés. Ces résultats ont prouvé que le pCB-(DOPA)₄ pouvait réduire considérablement l'adsorption protéique non spécifique sur les surfaces d'HA et d'émail réel pour plus de 90 % (Fang *et al.*, 2021).

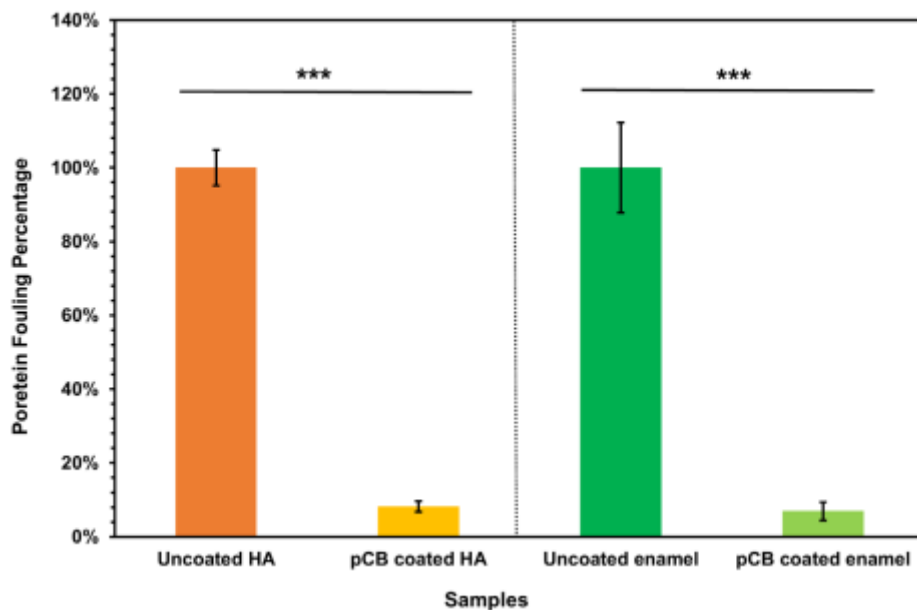


Figure 7 : Données d'analyse quantitative de l'adsorption relative de protéines non spécifiques sur les disques HA et émaux non enrobés, et les disques enrobés pCB- (DOPA)₄ correspondants (Fang *et al.*, 2021).

Avant de procéder au test d'adhérence bactérienne, ils ont testé l'adsorption non spécifique des protéines sur les surfaces de pCB-(DOPA)₄ modifiées de l'HA et de l'émail dentaire. Les résultats ont révélés qu'il y a plus de 90% d'adsorption non spécifique. De ce test, les scientifiques ont déduit que la performance du non encrassement dépend fortement de la densité et de la stabilité du revêtement de surface et que les quatres groupes d'ancrage DOPA jouent un rôle essentiel dans ce revêtement (Fang *et al.*, 2021).

III.1.4 Effet anti-adhésion du pCB-(DOPA)4 HA et surface émaillée

Enfin, la propriété anti-adhésion des surfaces enrobées de pCB-(DOPA)4 a été évaluée à l'aide du test d'adhésion de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans*, qui représentent respectivement un facteur gram négatif, gram positif et majeur de carie dentaire. La coloration SYTO9 a montré une fluorescence verte sur les bactéries. L'adhérence bactérienne a été observée par une microscopie confocale à balayage laser.

La figure 8 (a) montre les taux d'adhérence des trois espèces bactériennes sur les surfaces HA non enrobées formant des biofilms. Lorsque les surfaces HA étaient recouvertes de pCB-(DOPA)4, le nombre de bactéries adhérentes était considérablement réduit. L'inhibition de l'adhésion des bactéries est compatible avec l'inhibition de l'adsorption des protéines.

Une analyse quantitative a été réalisée en utilisant ImageJ pour calculer l'intensité fluorescente relative comme le montre la figure 8 (b). L'essai d'adhérence de *Streptococcus mutans* a également été effectué sur des échantillons d'émail réel enrobé de pCB-(DOPA)4. L'adhérence bactérienne moyenne a été réduite à 24,4 2,9 % par rapport à l'adhérence observée sur les échantillons non enrobés. Ces données ont démontré que l'adhérence bactérienne induite par les protéines peut être efficacement inhibée par le revêtement pCB-(DOPA)4 (Fang *et al.*, 2021).

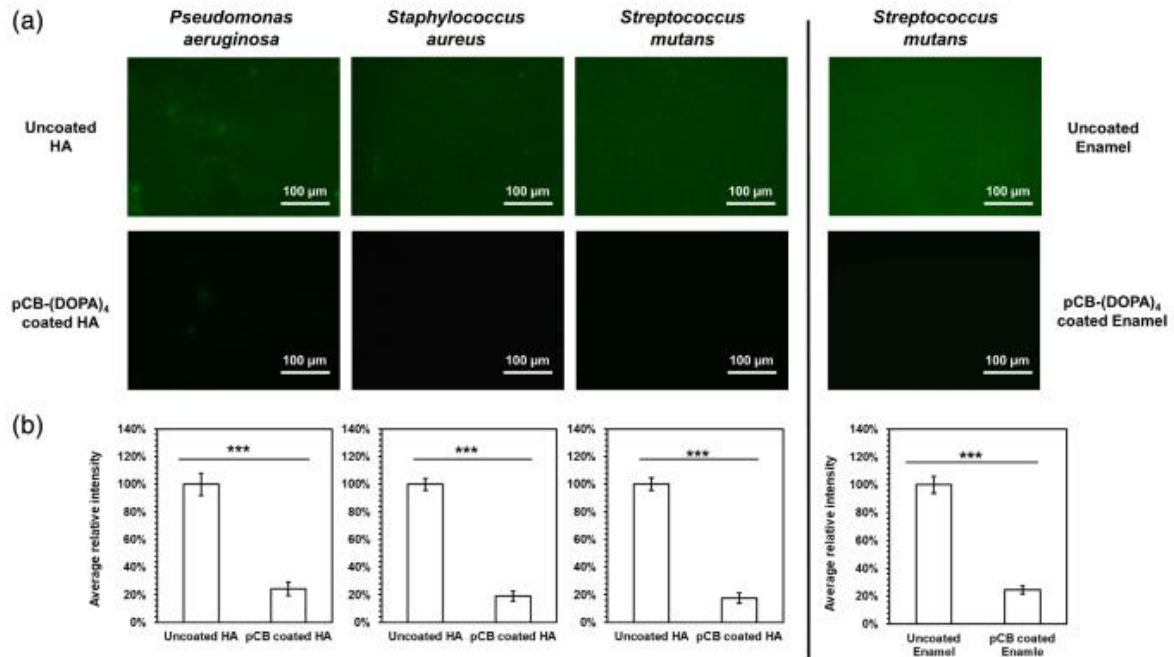


Figure 8 :(a) adhérence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus mutans* sur les disques HA pCB-(DOPA)₄ enduits et non enduits; adhérence de *Streptococcus mutans* sur les disques d'émail pCB-(DOPA)₄ enduits et non enduits.(b) Analyse quantitative de l'adhérence des bactéries sur chaque surface (Fang *et al.*, 2021).

Pour la réalisation des tests d'adhérence bactérienne, les chercheurs ont tout d'abord étudié *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*. Il a été constaté qu'environ 80% de l'adhérence bactérienne a été réduite sur les surfaces HA modifiées du pCB-(DOPA)₄. Les résultats obtenus indiquent la fonction d'adhésion anti-bactérienne universelle du pCB-(DOPA)₄. Enfin, ils ont enduit le pCB-(DOPA)₄ sur des échantillons d'émail dentaire. L'adhésion bactérienne commence à partir des émaux car ce sont les surfaces les plus extérieures de la dent et donc c'est de là que commence la formation de plaques et les premières caries dentaires. Suite à ces travaux, les réalisateurs de cette étude ont remarqué que l'émail des dents pCB-(DOPA)₄ a réduit avec succès plus de 75% de l'adhésion de *Streptococcus mutans* cariogène (Fang *et al.*, 2021).

Malgré que le revêtement zwitterionique a réduit plus de 75% de l'adhésion de *Streptococcus mutans* cariogène, mais l'une de ses limites est un léger changement de couleur. Les disques HA utilisés dans cette expérience étaient blancs opaques. Par conséquent, il était facile de détecter le changement de couleur. Alors que sur les surfaces de l'émail dentaire réel qui n'est pas blanc opaque pur mais légèrement translucide, le

changement de couleur était beaucoup moins détectable à l'œil nu. Si le revêtement est appliqué sur les surfaces occlusales (mastication) des dents postérieures, en particulier dans les rainures ou les fosses, cet effet de changement de couleur très doux rendra la dent ou la restauration plus naturelle. Bien sûr, sur les dents antérieures (en particulier les surfaces faciales) cela pourrait être un problème et mérite plus de recherche et d'améliorations avant les applications cliniques (**Fang *et al.*, 2021**).

III.2 Article 2 : Probiotique *Lactobacillus sp.* inhibent la croissance, la formation de biofilms et l'expression génique de *Streptococcus mutans* inducteur de caries

Dans cette étude, les chercheurs ont utilisé *Lactobacillus sp.* qui sont *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* et *L. salivarius*. Ces souches ont été choisies parce qu'elles ont entraîné une réduction de caries dentaires ainsi que de biofilm buccaux dans des études antérieures. L'objectif de cette étude était d'évaluer les mécanismes par lesquels *Lactobacillus sp.* peut contrôler certaines maladies buccodentaires. Pour effectuer ceci, l'effet des quatre *Lactobacillus sp.* sur la croissance, l'adhérence, la formation de biofilms et l'expression génétique de *Streptococcus mutans* a été testé (Wasfi et al., 2015).

III.2.1 Effet de la diffusion de l'agar

La zone d'inhibition produite par culture bactérienne entière (WBC) avec une concentration de $1,5 \times 10^8$ cellules/mL était plus grande que celle produite par le surnageant de culture usée (SCS) produit par concentration équivalente de cellule. Ces résultats indiquent que l'effet antimicrobien du WBC est plus élevé par rapport au surnageant filtré de cellules. Selon la zone de diamètre d'inhibition, les activités antimicrobiennes les plus élevées de *Lactobacillus sp.* ont été observés chez *L. casei* et *L. reuteri*, tandis que les activités antimicrobiennes les plus faibles ont été observées chez *L. plantarum* et *L. salivarius* (Tableau 2) (Wasfi et al., 2015).

Tableau 2 : Effet antimicrobien de la culture bactérienne entière de *Lactobacillus sp.* et du surnageant filtré sur la croissance de *Streptococcus mutans*

Souches	Zone d'inhibition* (mm)	
	Culture bactérienne complète (WBC)†	Surnageant de culture usée†
<i>Lactobacillus casei</i>	23 ± 1	18 ± 1
<i>Lactobacillus reuteri</i>	23 ± 3	18 ± 2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	19 ± 1	14 ± 1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	19 ± 2	14 ± 1

*Les valeurs sont des moyennes arithmétiques S.D. des zones d'inhibition (mm) (Wasfi et al., 2015).

†Tous les résultats étaient très différents de ceux du groupe témoin ($P < 0,01$) (Wasfi et al., 2015).

Le dépistage antimicrobien des quatre souches de *Lactobacillus* testées à l'aide de la méthode de diffusion de la gélose a révélé des différences d'activité antimicrobiennes entre les différentes souches, déterminées par la taille de la zone d'inhibition. En prenant en considération les résultats affichés dans le Tableau 2, on remarque que l'effet le plus marqué a été détecté par *L. casei* et *L. reuteri* suivis par *L. salivarius* et *L. plantarum*. La culture bactérienne complète (WBC) de *Lactobacillus* a causé un effet antimicrobien plus élevé sur *Streptococcus mutans* que leur SCS correspondant de la même espèce *Lactobacillus* (Wasfi et al., 2015).

La différence des tailles des zones d'inhibition causée par le WBC par rapport au SCS est due à la présence de cellules vivantes de *Lactobacillus sp.* métaboliquement actives dans le WBC ce qui pourrait entraîner la production des agents antimicrobiens actifs [(Oldak et al., 2017) ; (Wasfi et al., 2017)].

III.2.2 Effet antimicrobien du surnageant non traité de *Lactobacillus sp.* sur *Streptococcus mutans*

➤ SCS non traité

Les surnageants non traités des quatre *Lactobacillus sp.* ont montré un effet inhibiteur important (Figure 9) sur la croissance de *Streptococcus mutans* ($P < 0,01$). Il n'y avait pas de différence significative dans la puissance de l'effet inhibiteur entre les quatre échantillons ($P > 0,05$) (Wasfi et al., 2017).

➤ SCS traité

Après avoir neutralisé l'acidité du surnageant : l'effet antimicrobien a été significativement réduit ($P < 0,01$) par rapport au surnageant non traité et la croissance de *Streptococcus mutans* a été significativement réduite (Figure 10A, B, C, D) (Wasfi et al., 2017).

Après l'ajout de catalase : Sur les quatre *Lactobacillus sp.* Il a été constaté que *Lactobacillus salivarius* était la seule souche testée et qui a montré une réduction significative ($P < 0,05$) de son effet antimicrobien sur *Streptococcus mutans* (Figure 10D).

Cela indique que les peroxydes de *Lactobacillus salivarius* contribuent à son effet antimicrobien contre *Streptococcus mutans* (Wasfi et al., 2017).

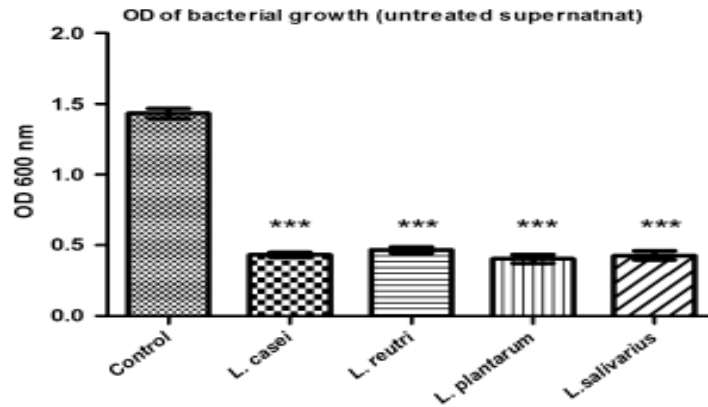


Figure 9 : Croissance de streptococcus mutans en présence de surnageant de *Lactobacillus sp.* non traité. **Densité optique** (DO) de la croissance de Streptococcus mutans en présence des surnageants de *Lactobacillus sp.* (*L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* et *L. salivarius*).

Témoin : Croissance de *Streptococcus mutans* dans le bouillon de BHI. **Non traité :** surnageant de culture usée (SCS) (Wasfi et al., 2017).

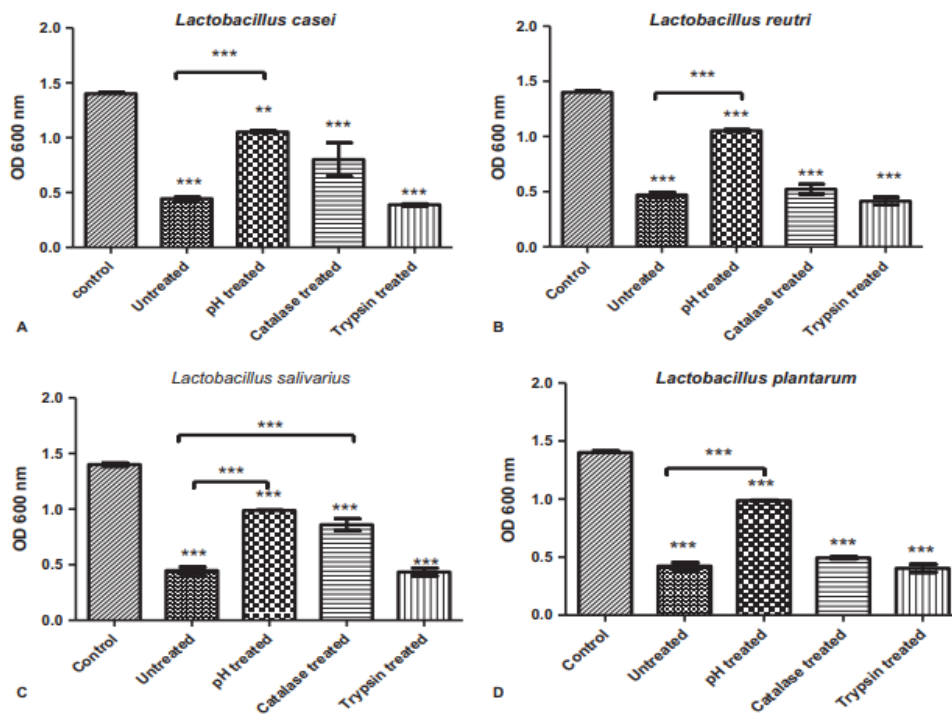


Figure 10 : Croissance de *Streptococcus mutans* en présence du surnageant de *Lactobacillus sp.* traité et non traité. Densité optique (OD) de *Streptococcus mutans* croissance en présence de surnageants de *Lactobacillus sp.* traités et non traités (*L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* et *L. salivarius*).

Lutte : *Streptococcus mutans* cultivés dans un bouillon BHI. **Non traité :** Surgélateur de culture (SCS) de chaque surgélation, **pH traité :** surgélateur à pH ajusté 6,5, **catalase traité :** surgélant après addition de 0,5 mg/ml d'enzyme catalase et **trypsine traité :** surgélant après addition de 1 mg/ml d'enzyme trypsine (Wasfi et al., 2017)

A partir des résultats montrés du test de l'effet antimicrobien du surnageant *Lactobacillus sp.* traité et non traité, les chercheurs ont remarqué que les souches ont entraîné une réduction significative de la croissance microbienne de *Streptococcus mutans* dans le bouillon BHI, déterminée par le changement de la DO 600. En même temps, il n'y avait pas de différence significative entre les différentes espèces de *Lactobacillus* indépendamment de leur profil métabolique (Wasfi *et al.*, 2017).

Afin de déterminer l'effet des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène et de la bactériocine produits par *Lactobacillus sp.*, leur effet a été démolé par :

- **La neutralisation du SCS :** En neutralisant le SCS à un pH = 6,5 l'effet du SCS testé a été considérablement réduit (Wasfi *et al.*, 2017).

De ces résultats on suggère l'influence d'autres agents antimicrobiens tels que le peroxyde d'hydrogène, la bactériocine et le bio-surfactant (Dasari *et al.*, 2014). Ces trois paramètres contribuent avec l'acide à l'inhibition de la croissance microbienne de *Streptococcus mutans* (Wasfi *et al.*, 2017).

- **L'ajout de catalase :** En ajoutant du catalase aux différentes sous espèces, il a été constaté que ces dernières ont réduit l'effet antimicrobien contre *S. mutans* (vu qu'elle ne possède pas des enzymes de récupération du peroxyde d'hydrogène (Hasslof *et al.*, 2013) mais cette réduction a été significative qu'avec *Lactobacillus salivarius*(ATCC 11741) (Wasfi *et al.*, 2017).

Cela indique que le peroxyde d'hydrogène qui contribue à l'activité antimicrobienne de *Lactobacillus sp.* est faible à l'exception du surnageant *L. salivarius* (Wasfi *et al.*, 2017).

- **L'ajout de trypsine :** L'action de la trypsine sur la croissance de *S. mutans* a été non significative (Wasfi *et al.*, 2017).

La réduction non significative de la croissance de *S. mutans* est due à la faible production de bactériocines par *Lactobacillus sp.* parce-que *Lactobacillus sp.* ont la capacité de produire des bactériocines et des bactériocines-like (Wasfi *et al.*, 2017).

III.2.3 Effet des surnageants filtrés de *Lactobacillus sp.* sur l'adhérence à *Streptococcus mutans* et sur le biofilm préformé

Les résultats du test de l'effet des surnageants filtrés de *Lactobacillus sp.* sur l'adhérence à *Streptococcus mutans* et sur le biofilm préformé sont illustrés sur la Figure 11 et mentionnés dans le Tableau 3.

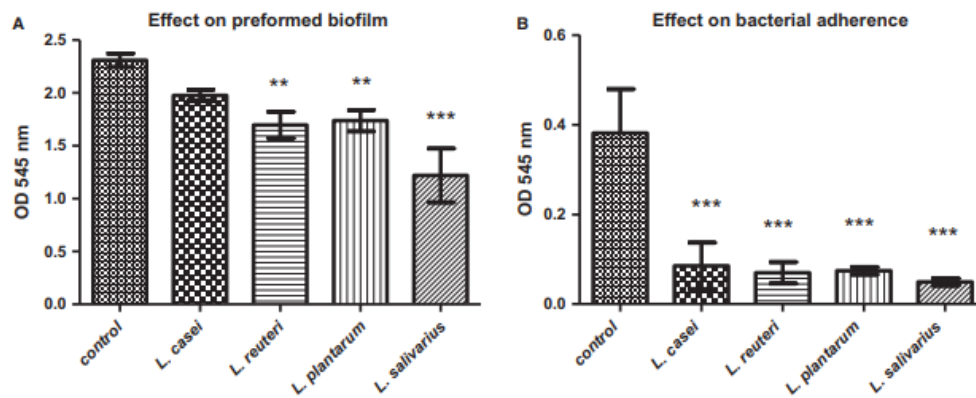
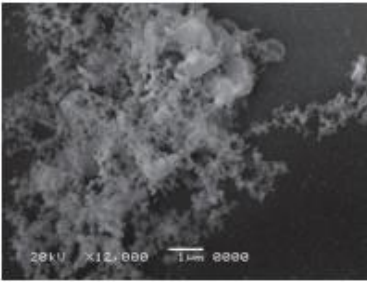
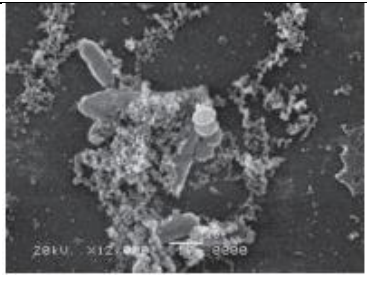
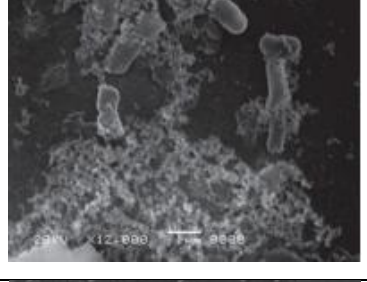
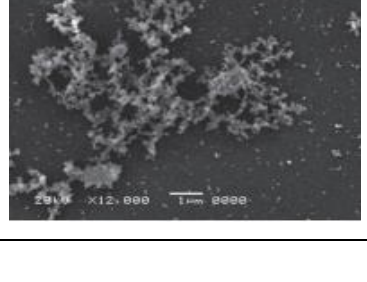


Figure 11 : Histogrammes montrant l'effet du surnageant non traité sur *Streptococcus mutans*. **(A)** Effet du surnageant non traité sur l'adhérence à *Streptococcus mutans*. **(B)** Effet du surnageant non traité sur le biofilm préformé de *Streptococcus mutans* Densité optique (OD 545 nm) du biofilm de *Streptococcus mutans* en présence de *Lactobacillus sp.* surnageants (*L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum* et *L. salivarius*). Témoins : *Streptococcus mutans* cultivé dans un bouillon BHI (Wasfi *et al.*, 2017).

Tableau 3 : Comparaison de l'effet des *Lactobacillus sp.* sur l'adhérence à *S. mutans* et sur le biofilm préformé

Souches	Adhérence à <i>S. mutans</i>	Biofilm préformé	Photos des co-cultures de <i>S. mutans</i> et <i>Lactobacillus sp.</i> prises par le MEB
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	80,52%	24,7%	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	81,7%	26,5%	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	87%	47%	

(-) signifie l'effet le plus faible.

Il a été remarqué que le surnageant *Lactobacillus salivarius* a entraîné une réduction significative la plus élevée de l'adhésion à *Streptococcus mutans* et du biofilm préformé. Aussi, l'effet du surnageant *L. casei* était le plus faible parmi les surnageants testés sur l'adhésion car il n'a montré aucun effet significatif sur le biofilm préformé. Quant aux surnageants de *L. plantarum* et *L. reuteri*, ces derniers ont entraîné une réduction de

l'adhésion de *S. mutans* et du biofilm préformé avec des pourcentages relativement proches (Figure 11) (Wasfi *et al.*, 2017).

Ces résultats ont été confirmés à travers les photos prises par un Microscope électronique à balayage (MEB) illustrés dans le tableau 3. *Streptococcus mutans* semblait former un biofilm compact recouvert par de grandes quantités de structures en réseau (Figure 12). Des changements dans la structure de la quantité de la matrice des exopolysaccharides (EPS) ont été observés dans le biofilm formé par la co-culture de *Streptococcus mutans* et les différentes souches *Lactobacillus sp.* montrées dans les prises de photos par le MEB illustrés dans le tableau 3. De plus, on a observé qu'il y avait moins de bactéries et micro-colonies attachées à la surface (Wasfi *al.*, 2017).

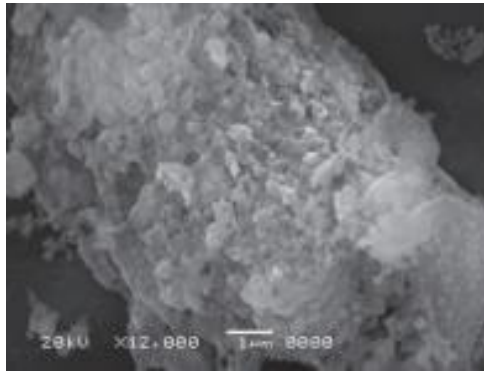


Figure 12: Biofilm de *S. mutans* pris par MEB grossissement x12009 (Wasfi *et al.*, 2017).

III.2.4 Résultats de la qPCR

Dans le but d'évaluer et comparer l'impact de l'exposition des quatre *Lactobacillus sp.* sur les cellules de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), la qPCR a été utilisé. Le SCS (dilué dans le BHI) pendant une nuit. Les niveaux d'expression de dix gènes impliqués dans la virulence de *S. mutans* dans les cellules planctoniques et les cellules du biofilm, ont été comparés aux cellules de contrôle non traitées et préparées dans les mêmes conditions sans SCS testé (Wasfi *et al.*, 2017). Les gènes sélectionnés comprenaient :

- Quatre gènes impliqués dans les systèmes de transduction de signal à deux composants (TCSTS) : [comC, comD, vicK, vicR].
- Quatre gènes impliqués dans la formation d'EPS :
 - Trois sont impliqués dans la formation de glucane (gtfB, gtfC, gtfD).

- Un seul gène est impliqué dans la formation de fructane (sacB (ftf)].
- Deux autres gènes sont associés à la survie au stress environnemental (aguD et atpD).
- ❖ **Le test ANOVA unidirectionnelle :** Ce test a révélé qu'il y a eu une réduction significative globale ($P < 0,01$) de l'expression de la plupart des gènes testés parmi les différents groupes, tant dans les formes planctoniques que dans les cellules du biofilm (**Wasfi et al., 2017**).
- ❖ **Le test de comparaison multiple de Dunnett :** Ce test a été utilisé pour évaluer l'importance de la différence entre les niveaux d'expression des gènes cibles des groupes exposés et des groupes témoins. Comme le montre la figure 13 (**Wasfi et al., 2017**).
- Les gènes comC et gtfD dans les cellules planctoniques exposées à *L. salivarius* SCS, et comC présent dans les cellules de biofilm exposées à *L. reuteri* SCS n'ont montré aucune différence significative ($P > 0,01$) d'expression par rapport au groupe témoin dans certaines conditions (**Wasfi et al., 2017**).

Les chercheurs ont constaté que l'effet du SCS des différents *Lactobacillus sp.* était variable sur tous les gènes du système TCSTS testés :

- *L. salivarius* a causé une régulation ascendante du gène vicK de 3x jusqu'à 21x sous forme de cellules planctoniques et adhérentes. Cela a permis l'expression du gène comC.
- Mis à part *L. reuteri*, les *Lactobacillus sp.* ont causés la régulation ascendante du biofilm ce qui a permis l'expression du gène comC.
- Mis à part *L. casei*, les *Lactobacillus sp.* ont exprimés le gène comD dans les cellules planctoniques. Par contre dans les cellules du biofilm, *L. reuteri*, *L. casei* et *L. plantarum* ont permis l'expression du gène comD (**Wasfi et al., 2017**).

En présence de tous les SCS testés, ils ont observés une réduction significative de l'expression des gènes de formation du glucane (gtfB, gtfC, gtfD) et du fructane (sacB). Les effets des mêmes surnageants étaient variables sur les cellules planctoniques, car ils montraient une régulation ascendante significative ($P < 0,01$) dans les gènes gtfB et gtfC dans les cas suivant :

- Régulation ascendante dans les niveaux d'expression des gènes en présence des surnageants de *L. casei* (changement de 30 fois dans l'expression des gènes gtfB) et

L.plantarum (changement de 20 fois et 17 fois dans l'expression des gènes gtfB et gtfC, respectivement).

- Régulation ascendante modérée dans l'expression des gènes gtfB et gtfC en présence d'un surnageant *L. reuteri* (2,5 fois).
- Une régulation ascendante significative ($P < 0,01$) du gène gtfD a été observée en présence de *L. salivarius* surnageant (15 fois).
- Régulation ascendante significative du gène sacB (ftf) (2,5 fois) a été observée en présence du surnageant *L. reuteri*.

Le SCS des quatre *Lactobacillus sp.* testés a entraîné une réduction du biofilm de *Streptococcus mutans* à des degrés variables. La réduction la plus élevée a été observée avec les surnageants de *L. salivarius* (87 %) pour l'adhérence à *Streptococcus mutans*, et 47 % pour le biofilm préformé à *Streptococcus mutans*. Le gène vicR était sous-régulé sous forme planctonique et *Streptococcus mutans* biofilmogène exposés à tous les SCS testés. D'autre part, le gène vicK était sous-régulé lors de l'exposition de *Streptococcus mutans* aux surnageants *L. casei* et *L. reuteri*. Cette baisse de la régularisation pourrait expliquer la réduction de l'adhérence à *S. mutans* et du biofilm préformé, comme le démontrent les résultats du MEB (**Tableau 3**) (**Wasfi et al., 2017**).

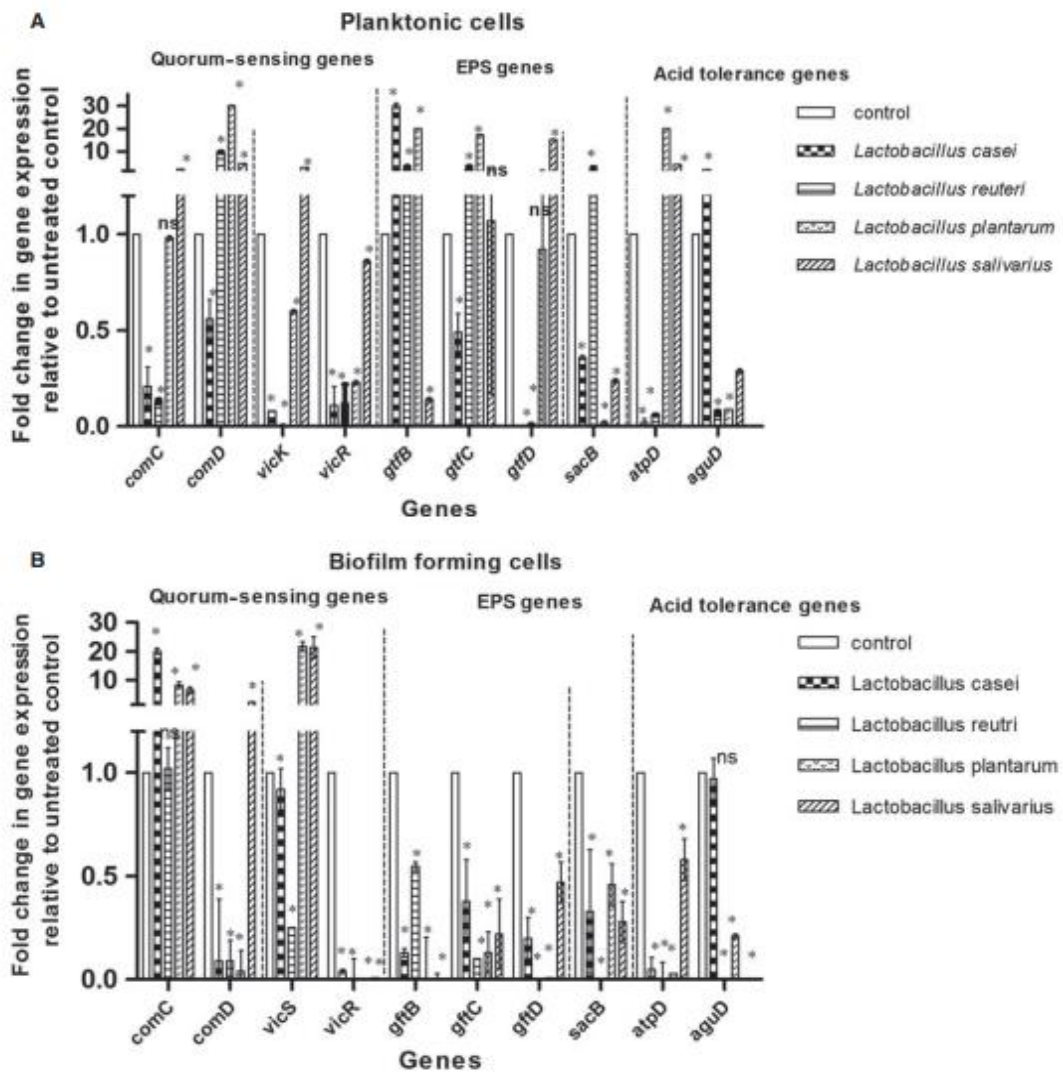


Figure 13 : Altérations des profils d’expression génique associées à l’exposition de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), sous forme planctonique (A) et à l’état de biofilm (B), au surnageant de culture usée (SCS) testé de *Lactobacillus casei* (ATCC 393), *Lactobacillus reuteri* (ATCC 23272), *Lactobacillus plantarum* (ATCC 14917) et *Lactobacillus salivarius* (ATCC 11741) déterminés par qPCR (Wasfi et al., 2017).

Les deux études ont été réalisées dans le but d'inhiber et contrôler les biofilms buccaux. Dans la première étude, le revêtement zwitterionique a été suggéré comme une nouvelle approche pratique et simple, supplémentaire ou alternative qui peut réduire le biofilm buccal. Il est bien connu que le maintien d'une bonne hygiène buccal permet d'éviter l'apparition des biofilms buccaux et les maladies parodontales. Pour cela, le revêtement zwitterionique peut potentiellement aider les patients avec une dextérité réduite et une capacité d'hygiène buccodentaire réduite, comme les personnes âgées ainsi que les patients avec des problèmes musculosquelettiques à garder une bonne hygiène buccodentaire et à éviter l'apparition et le maintien du biofilm oral. Le polymère pCB-(DOPA)₄ peut être appliqué comme revêtement antibactérien universel en dentisterie. Il peut être appliqué sur les surfaces coronales, buccales, linguales et inter-proximales de la dent. Il peut être appliqué dans la zone occlusale avec des fosses et des fissures, où se développe le portage. Aussi, il peut être enduit sur la surface de la dentine en fonction de la similitude chimique entre l'émail et la dentine et même sur la surface de l'implant dentaire. La deuxième étude a montré le même but que la première mais avec un outil naturel qui est le Probiotique de *Lactobacillus sp.* que l'on trouve surtout dans les aliments comme les yaourts. L'étude a montré que *Lactobacillus sp.* peut inhiber la carie dentaire et contrôler l'apparition du biofilm. L'effet anti-carie et anti-biofilm pourrait être attribué à plusieurs facteurs comme l'effet inhibiteur sur la croissance de *Streptococcus mutans*, qui était principalement attribuable à la production d'acide organique et de peroxyde d'hydrogène, il pourrait être attribué aussi à la réduction de l'adhérence cellulaire et au biofilm préformé ainsi que la baisse de la régulation de plusieurs gènes de virulence de *Streptococcus mutans*, y compris les gènes de tolérance à l'acide (atpD et aguD), les gènes producteurs d'EPS (gtfBCD et sacB) et les gènes sensibles au quorum (vicKR et comCDE) [(Fang *et al.*, 2021) ; (Wasfi *et al.*, 2017)].

Conclusion

Le microbiote oral représente une partie importante du microbiote humain. Il est une partie normale de la cavité buccale et a une fonction essentielle qui est la protection contre la colonisation des bactéries extrinsèques qui pourraient affecter la santé systémique de l'individu. Les bactéries colonisatrices s'organisent en biofilms oraux responsables de l'apparition de plusieurs maladies parodontales telles que les caries dentaires, les gingivites...

Par conséquent, il est primordial de développer des stratégies thérapeutiques efficaces afin d'inhiber ou réduire la formation des biofilms oraux. En raison de la résistance des bactéries colonisatrices aux facteurs environnementaux et aux médicaments. Les nouveaux revêtements zwitterionique, les nouveaux nanomatériaux qui ont la capacité de charger des médicaments antimicrobiens ou d'agir comme les médicaments sont utilisés. De même, les produits naturels comme les probiotiques de *Lactobacillus sp.* sont également utilisés pour inhiber la formation du biofilm buccal parce qu'elle a la capacité de produire l'acide organique et le peroxyde d'hydrogène et elle peut aussi réduire l'adhérence bactérienne ainsi que la régulation de plusieurs gènes de virulence de *Streptococcus mutans*. Toutes ces approches peuvent cibler l'agent pathogène, réduire l'adhérence bactérienne et inhiber la formation de biofilm.

Cependant, la majorité de ces stratégies n'ont été testées qu'*in vitro* ou sur des modèles animaux. Il convient de noter également que l'environnement complexe de la cavité buccale, en particulier la clairance rapide par la salive favorise la biodisponibilité et par la suite l'efficacité des nouveaux agents *in vivo*. Des futures études devraient être réalisées pour évaluer d'une part les activités antimicrobiennes chez les humains afin d'équilibrer la bio-activité et la biocompatibilité des nouveaux agents et d'autre part pour faire la lumière sur l'obtention d'une efficacité maximale d'effets thérapeutiques à long terme avec une éventuelle toxicité minimale en collaboration avec les industries médicales et pharmaceutiques pour développer des formulations pratiques et peu coûteuses qui inhibent le biofilm dentaire.

Références bibliographiques

1. **Aqawi M., Sionov, R V., Gallily R., Friedman M., et Steinberg D. (2021).** Anti-Biofilm Activity of Cannabigerol against *Streptococcus mutans*. *Microorganisms*, 9(10), 2031.
2. **Bouchard P (2015).** Odontologie Parodontologie Dentisterie implantaire. Vol.1 medecine parodontale, Lavoisier paris.
3. **Banas J. A. (2004).** Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*, 9(10), 1267-77.
4. **Burton J., Wescombe P., Cadieux P., et Tagg J. (2011).** Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral streptococci. *Beneficial microbes*, 2(2), 93-101.
5. **Biswas I., Drake L., Erkina D., et Biswas S. (2008).** Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology*, 190(1), 68-77.
6. **Barzegari A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S. M. H., Sharifi S., Memar M. Y., et Vahed S. Z. (2020).** The battle of probiotics and their derivatives against biofilms. *Infection and Drug Resistance*, 13, 659.
7. **Chardin H., Barsotti O., et Bonnaure-Mallet M. (2006).** *Microbiologie en odontostomatologie*. Maloine.
8. **Caufield P. W., Schön C. N., Saraithong P., Li, Y., et Argimón S. (2015).** Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *Journal of dental research*, 94(9_suppl), 110S-118S.
9. **Chalmers N. I., Palmer Jr R. J., Cisar J. O., et Kolenbrander P. E. (2008).** Characterization of a *Streptococcus sp.-Veillonella sp.* community micromanipulated from dental plaque. *Journal of bacteriology*, 190(24), 8145-8154.
10. **Cagetti M. G., Mastroberardino S., Milia E., Cocco F., Lingström P., et Campus G. (2013).** The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutrients*, 5(7), 2530-2550
11. **Chew S. Y., Cheah Y. K., Seow H. F., Sandai D., et Than L. T. L. (2015).** Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR- 1 and *Lactobacillus reuteri* RC- 14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis- causing *Candida glabrata* isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1180-1190.
12. **Dasari S., Shouri R. N. D., Wudayagiri R., et Valluru L. (2014).** Antimicrobial activity of *Lactobacillus* against microbial flora of cervicovaginal infections. *Asian Pacific journal of tropical disease*, 4(1), 18-24.

13. **Falony G., Honkala S., Runnel R., Olak J., Nõmmela R., Russak S., et Honkala E. (2016).** Long-term effect of erythritol on dental caries development during childhood: a posttreatment survival analysis. *Caries Research*, 50(6), 579-588.
14. **Guillaume N. (2011).** Etude des mutacines (Doctoral dissertation, Faculté des études supérieures de l'Université Laval) p, 11.
15. **Groisman E. A. (2016).** Feedback control of two-component regulatory systems. *Annual Review of Microbiology*, 70, 103.
16. **Gong T., Tang B., Zhou X., Zeng J., Lu M., Guo X., et Li Y. (2018).** Genome editing in *Streptococcus mutans* through self-targeting CRISPR arrays. *Molecular oral microbiology*, 33(6), 440-449.
17. **Gibson G. R., Hutkins R., Sanders M. E., Prescott S. L., Reimer R. A., Salminen S. J., et Reid G. (2017).** Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502.
18. **Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., et Maeda N. (2009).** Bacterial interactions in dental biofilm development. *Journal of dental research*, 88(11), 982-990.
19. **Houvion E. (2014).** Le biofilm dentaire: composition, formation et propriétés (Doctoral dissertation, Université de Lorraine).
20. **Huang R., Li M., et Gregory R. L. (2011).** Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), 435-444.
21. **Hamada S., et Ooshima T. (1975).** Inhibitory spectrum of a bacteriocinlike substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *Journal of dental research*, 54(1), 140-145.
22. **Hasslöf P. (2013).** Probiotic *Lactobacilli* in the context of dental caries as a biofilm-mediated disease (Doctoral dissertation, Umeå universitet).
23. **Jakubovics N. S., Goodman S. D., Mashburn- Warren L., Stafford G. P., et Cieplik F. (2021).** The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology 2000*, 86(1), 32-56.
24. **Jakubovics N. S., et Palmer R. J. (Eds.). (2013).** Oral microbial ecology: Current research and new perspectives.

25. **Jiang S., et Cao Z. (2010).** Ultralow- fouling, functionalizable, and hydrolyzable zwitterionic materials and their derivatives for biological applications. *Advanced materials*, 22(9), 920-932.
26. **Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B., et Skalniak A. (2014).** The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33(4), 499-515.
27. **Kolenbrander P. E. (1993).** Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque. *Journal of Applied Bacteriology*, 74, 79S-86S.
28. **Kang M. S., Oh J. S., Lee H. C., Lim H. S., Lee S. W., Yang K. H., et Kim S. M. (2011).** Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *The Journal of Microbiology*, 49(2), 193-199.
29. **Kuramitsu H. K., He X., Lux R., Anderson M. H., et Shi W. (2007).** Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiology and molecular biology reviews*, 71(4), 653-670.
30. **Kreth J., Merritt J., Shi W., et Qi F. (2005).** Coordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Molecular microbiology*, 57(2), 392-404.
31. **Kazanci M. U. R. A. T., Fratzl P., Klaushofer K., et Paschalis E. P. (2006).** Complementary information on in vitro conversion of amorphous (precursor) calcium phosphate to hydroxyapatite from Raman microspectroscopy and wide-angle X-ray scattering. *Calcified tissue international*, 79(5), 354-359
32. **Kim M. A., Kim J. H., et Nam O. H. (2020).** Tea extracts differentially inhibit *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm colonization depending on the steeping temperature. *Biofouling*, 36(3), 256-265.
33. **Kuang X., Chen V., et Xu X. (2018).** Novel approaches to the control of oral microbial biofilms. *BioMedicine Research International*, 2018.
34. **Liu C., Sun D., Zhu J., et Liu W. (2019).** Two-component signal transduction systems: a major strategy for connecting input stimuli to biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 3279.
35. **Li Y. H., Hanna M. N., Svensäter G., Ellen R. P., et Cvitkovitch D. G. (2001).** Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *Journal of bacteriology*, 183(23), 6875-6884.

36. **Loesche W. J., Gusberti F., Mettraux G., Higgins T., et Syed S. (1983).** Relationship between oxygen tension and subgingival bacterial flora in untreated human periodontal pockets. *Infection and immunity*, 42(2), 659-667.
37. **Lin X., Chen X., Chen Y., Jiang W., et Chen H. (2015).** The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral diseases*, 21(1), e128-e134.
38. **Langella P. (2017).** Le biofilm dentaire et l'équilibre du microbiote oral: des concepts majeurs pour le maintien de la santé buccale.
39. **Lin Y., Chen J., Zhou X., et Li, Y. (2021).** Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. *Critical reviews in microbiology*, 47(5), 667-677.
40. **Magon N., Kumar P. (2012).** Hormones in pregnancy, Niger. Medicine. J vol.53, no. 4, p.179.
41. **Mitchell T. J. (2003).** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nature Reviews Microbiology*, 1(3), 219-230.
42. **Maeda K., Nagata H., Yamamoto Y., Tanaka M., Tanaka J., Minamino N., et Shizukuishi S. (2004).** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infection and immunity*, 72(3), 1341-1348.
43. **Mota-Meira M., Lapointe G., Lacroix C., et Lavoie M. C. (2000).** MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(1), 24-29.
44. **Merritt J., et Qi F. (2012).** The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Molecular oral microbiology*, 27(2), 57-69.
45. **McGlashen M. L., Davis K. L., et Morris M. D. (1990).** Surface-enhanced Raman scattering of dopamine at polymer-coated silver electrodes. *Analytical chemistry*, 62(8), 846-849.
46. **Ma Q., Pan Y., Chen Y., Yu S., Huang J., Liu Y., et Li Y. (2021).** Acetylation of glucosyltransferases regulates *Streptococcus mutans* biofilm formation and virulence. *PLoS pathogens*, 17(12), e1010134.
47. **Ng H. M., Slakeski N., Butler C. A., Veith P. D., Chen Y. Y., Liu S. W., et Reynolds E. C. (2019).** The role of *Treponema denticola* motility in synergistic

- biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 432.
48. **Nicolas G. G., et Lavoie M. C. (2011).** *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Canadian journal of microbiology*, 57(1), 1-20.
49. **Nguyen D. (2018).** Influence de variations de conditions environnementales sur l'évolution des biofilms oraux (Doctoral dissertation, Bordeaux).
50. **Nuriel-Ohayon M., Neuman H., et Koren O. (2016).** Microbial changes during pregnancy, birth, and infancy. *Frontiers in microbiology*, 1031.
51. **Nobbs A. H., Zhang Y., Khammanivong A., et Herzberg M. C. (2007).** *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. *Journal of bacteriology*, 189(8), 3106-3114.
52. **Nagata H., Iwasaki M., Maeda K., Kuboniwa M., Hashino E., Toe, M., et Shizukuishi S. (2009).** Identification of the binding domain of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infection and immunity*, 77(11), 5130-5138.
53. **Nakano K., et Ooshima T. (2009).** Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future microbiology*, 4(7), 891-902.
54. **Nagaoka S., Hojo K., Murata S., Mori T., Ohshima T., et Maeda N. (2008).** Interactions between salivary *Bifidobacterium adolescentis* and other oral bacteria: in vitro coaggregation and coadhesion assays. *FEMS microbiology letters*, 281(2), 183-189.
55. **Nes I. F., Diep D. B., et Holo H. (2007).** Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of bacteriology*, 189(4), 1189-1198.
56. **Nguyen T., Zhang Z., Huang I. H., Wu C., Merritt J., Shi W., et Qi F. (2009).** Genes involved in the repression of mutacin I production in *Streptococcus mutans*. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 2), 551.
57. **Nguyen D. (2018).** Influence de variations de conditions environnementales sur l'évolution des biofilms oraux (Doctoral dissertation, Bordeaux).
58. **Nascimento M. M., Browngardt C., Xiaohui X., Klepac- Ceraj V., Paster B. J., et Burne R. A. (2014).** The effect of arginine on oral biofilm communities. *Molecular oral microbiology*, 29(1), 45-54.

59. **Oldak A., Ziełńska D., Rzepkowska A., et Kołożyn-Krajewska D. (2017).** Comparison of antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from two different kinds of regional cheeses from Poland: Oscypek and Koryciński cheese. *BioMedicine research international*, 2017.
60. **Pleszczyńska M., Wiater A., Janczarek M., et Szczodrak J. (2015).** (1→3)- α -D-Glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: a review. *International journal of biological macromolecules*, 79, 761-778.
61. **Pourhajibagher M., Salehi-Vaziri A., Noroozian M., Akbar H., Bazarjani F., Ghaffari H., et Bahador A. (2021).** An orthodontic acrylic resin containing seaweed *Ulva lactuca* as a photoactive phytochemical in antimicrobial photodynamic therapy: Assessment of anti-biofilm activities and mechanical properties. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 35, 102295.
62. **Pfaffl M. W. (2004).** Relative quantification In: Dorak T, editor. Real-Time PCR. International University Line.
63. **Qi F., Chen P., et Caufield P. W. (1999).** Purification of mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9), 3880-3887.
64. **Rosan B., et Lamont, R. J. (2000).** Dental plaque formation. *Microbes and infection*, 2(13), 1599-1607.
65. **Rosen G., et Sela M. N. (2006).** Coaggregation of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* PK 1594 is mediated by capsular polysaccharide and lipopolysaccharide. *FEMS microbiology letters*, 256(2), 304-310.
66. **Rosales-Hurtado M., Meffre P., Szurmant H., et Benfodda Z. (2020).** Synthesis of histidine kinase inhibitors and their biological properties. *Medicinal research reviews*, 40(4), 1440-1495.
67. **Rodríguez G., Ruiz B., Faleiros S., Vistoso A., Marró M. L., Sánchez J., et Cabello R. (2016).** Probiotic compared with standard milk for high-caries children: a cluster randomized trial. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402-407.
68. **Sansonetti P. (2020).** Microbiologie et maladies infectieuses. L'annuaire du Collège de France. *Cours et travaux*, (118), 151-156.
69. **Sun F., Hung H. C., Yan W., Wu K., Shimchuk A. A., Gray S. D., et Zhang H. (2021).** Inhibition of oral biofilm formation by zwitterionic nonfouling

- coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 109(10), 1418-1425.
70. **Simain F., Rompen E., et Heinen E. (2010).** Biofilms bactériens et médecine dentaire. *RMLG. Revue médicale de Liège*, 65(10), 569-573.
71. **Simain-Sato F., Rompen E., et Heinen E. (2010).** Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Revue Médicale de Liège*, 65, 569-573.
72. **Socransky S. S., Haffajee A. D., Cugini M. A., Smith C. K. J. R., et Kent Jr R. L. (1998).** Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of clinical periodontology*, 25(2), 134-144.
73. **Sakanaka A., Takeuchi H., Kuboniwa M., et Amano A. (2016).** Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microbial pathogenesis*, 94, 42-47.
74. **Sanders M. E. (2008).** Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical infectious diseases*, 46(Supplement_2), S58-S61.
75. **Söderling E. M., et Hietala-Lenkkeri A. M. (2010).** Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Current Microbiology*, 60(1), 25-29.
76. **Schwartz A. (2016).** Microbiota of the human body. *Adv Exp Med Biol*, 902.
77. **Sun F., Wu K., Hung H. C., Zhang P., Che X., Smith J., et Jiang, S. (2017).** Paper sensor coated with a poly (carboxybetaine)-multiple DOPA conjugate via dip-coating for biosensing in complex media. *Analytical chemistry*, 89(20), 10999-11004.
78. **Trisha E. (2011).** How Subgingival Plaque Biofilm Gets Started, O'Hehir, RDH, MS, Hygiene town Editorial Director.
79. **Takahashi N. (2005).** Microbial ecosystem in the oral cavity: metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *In International Congress Series* (Vol. 1284, pp. 103-112). Elsevier.
80. **Twetman S., et Stecksén- Blicks C. (2008).** Probiotics and oral health effects in children. *International journal of paediatric dentistry*, 18(1), 3-10.
81. **Taipale T. J., Pienihäkkinen K., Isolauri E., Jokela J. T., et Söderling E. M. (2016).** Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 in reducing the risk of infections in early childhood. *Pediatric Research*, 79(1), 65-69.
82. **Thabuis C., Cheng C. Y., Wang X., Pochat M., Han A., Miller L., et Guerin-Deremaux L. (2013).** Effects of maltitol and xylitol chewing-gums on parameters

- involved in dental caries development. *European Journal of Paediatric Dentistry*, 14(4), 303-308.
83. **Wu C. C., Lin C. T., Wu C. Y., Peng W. S., Lee M. J., et Tsai Y. C. (2015).** Inhibitory effect of *Lactobacillus salivarius* on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Molecular oral microbiology*, 30(1), 16-26.
84. **Xavier J. B., Piciooreanu C., Rani S. A., Van Loosdrecht M., et Stewart P. S. (2005).** Biofilm control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix-a modeling study. *Microbiology*, 151(12), 3817-3832.
85. **Zhang Q., Ma Q., Wang Y., Wu H., et Zou J. (2021).** Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *International Journal of Oral Science*, 13(1), 1-8.
86. **Zijngel V., van Leeuwen M. B. M., Degener J. E., Abbas F., Thurnheer T., Gmür R., et M. Harmsen, H. J. (2010).** Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one*, 5(2), e9321.
87. **Zaura E., & Twetman S. (2019).** Critical appraisal of oral pre-and probiotics for caries prevention and care. *Caries Research*, 53(5), 514-526.
88. **Zheng X., He J., Wang L., Zhou S., Peng X., Huang S., et Zhou, X. (2017).** Ecological effect of arginine on oral microbiota. *Scientific Reports*, 7(1), 1-10.
89. **Zayed S. M., Aboulwafa M. M., Hashem A. M., et Saleh S. E. (2021).** Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. *AMB Express*, 11(1), 1-10.

Webographie

1. <https://www.lecourrierdudentiste.com/lepatient/vos-questions/quest-ce-que-la-plaque-dentaire-et-comment-leliminer.html>
2. [https://www.vidal.fr/parapharmacie/phytotherapie-plantes/canneberge-cranberry.html#:~:text=La%20canneberge%20\(Vaccinium%20macrocarpon\)%2C,fruits%20et%](https://www.vidal.fr/parapharmacie/phytotherapie-plantes/canneberge-cranberry.html#:~:text=La%20canneberge%20(Vaccinium%20macrocarpon)%2C,fruits%20et%)

Annexes

Annexe 1

Synthèse de pCB-(DOPA)4

La polymérisation des conjugués polymère pCB-DOPA : L'initiateur contenant de la DOPA a été synthétisé. L'initiateur (51,5 mg, 0,02mmol), CBAA2 (1400 mg, 6.14 mmol), CuBr (5.74 mg, 0.04 mmol) et Méthanol (10 mL) ont été ajoutés à un ballon de Schlenk de 100 mL équipé d'une barre d'agitation. Le mélange a été dégazé par trois cycles de congélation-pompage-décongélation avant l'addition de HMTETA (13,87 mg, 0,08 mmol). Le mélange réactionnel a été agité à température ambiante pendant 24 heures. Après que la réaction ait atteint la conversion souhaitée, la solution a été directement transférée sur un sac de dialyse de 3,5k et dialysée contre de l'eau DI pendant 48 heures pour éliminer le monomère et le complexe de cuivre n'ayant pas réagi. Le produit a été obtenu sous forme de solide blanc (pCB- (DOPA)4-BOC-TBDMS) après lyophilisation pendant 24 heures. La structure chimique a été confirmée par 1H NMR (CD3OD, 500 MHz, ppm) : δ 6.75-6.31 (m, 12H), 4.19-3.99 (m, 16H), 3.62- 3.31 (m, 148H), .3.31-3.05 (m, 250H), 3.05-2.85(m, 486H), 2.52-2,35 (m, 158H), 1,25 (m, 36H, protons sur les groupes tertbutoxycarbonyle), 2,21-0,82 (m,462H), 0,86 (s, 72H, protons sur les groupes TBDMS), 0,18 (d, 48H, protons sur les groupes TBDMS). Mn,RMN = 27000 kg/mol. SEC : Mn,SEC = 29600 kg/mol, PDI = 1.08 (Sun *et al.*, 2017).

Élimination par le tert-butyldiméthylsilyl (TBDMS) du pCB-(DOPA)4 : Dans une fiole à fond rond de 50 mL équipée d'un barre d'agitation, on a ajouté du pCB-(DOPA)4-BOC-TBDMS (550 mg, 0.02 mmol), TBAF (261.4mg, 1 mmol), DCM (5 mL). Le mélange de suspension mélange de suspension a été agité à température ambiante pendant 12 heures. Le mélange a été centrifugé à 4200 rpm pendant 2 minutes. Pour recueillir le précipité et lavé avec DCM trois fois. Le produit a été obtenu sous forme de solide blanc insoluble (pCB-(DOPA)4-BOC) (Sun *et al.*, 2017).

Élimination du BOC du pCB-(DOPA)4 : Dans un ballon à fond rond de 50 mL équipé d'une barre d'agitation, on a ajouté du pCB-(DOPA)4-BOC (530 mg, 0,02 mmol), du TFA (228,4 mg, 2mmol), et du DCM (5 mL). Le mélange en suspension a été agité à température ambiante pendant 12 heures. Le mélange a été centrifugé à 4200 rpm pendant 2 minutes pour recueillir le précipité et lavé avec DCM pendant 3 fois. Le produit a été obtenu sous forme de solide blanc insoluble pCB-(DOPA)4. 1H NMR (CD3OD, 500 MHz, ppm) : δ 6.75-6.31 (m,

12H), 4.19-3.99 (m, 16H), 3.62-3.31 (m, 152H), 3.31-3.05 (m, 262H), 3.05-2.85 (m, 494H), 2.52-2.35 (m, 158H), 2.21-0.82 (m, 382H) (**Sun *et al.*, 2017**).

Annexe 2

Synthèse de surnageant de culture usée

Un millilitre (3×10^8 CFU /ml) de LB a été incubé en microaérophilie pendant 48h dans 4.0 ml de bouillon MRS à 37°C. La culture épuisée a été centrifugée (2100 rpm/min, 10 min) pour éliminer toutes les cellules, puis le surnageant a été filtré à travers un filtre de 0,22 µm (Millipore, USA) et conservé comme le surnageant non traité à 4°C. Pour éliminer les effets de l'acide lactique et d'autres petites molécules, le pH du surnageant non traité a été ajusté à 6,5 avec du NaOH (**Talarico *et al.*, 1988**), et 4ml du surnageant ont été ajoutés à un dispositif de filtre centrifuge Amicon Ultra-4 (Millipore, USA) avec un seuil de poids moléculaire (MW) de 3 kDa jusqu'à un volume final de 0,5 ml à 4°C (Osborne & Edwards, 2007). Le surnageant final traité a été extrait et conservé à 4°C (**Lin *et al.*, 2015**).

Annexe 3

Tableau 4 : Les amorces de la qPCR utilisée pour l'inhibition de *Streptococcus mutans* par les probiotiques de *Lactobacillus sp.*

Table 1 List of oligonucleotide sequences, their annealing temperature and amplicon size				
Target gene*	Oligonucleotide sequence 5'-3'	Ta (°C)	Amplicon size (bp)	References
<i>gtfb</i>	For. ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA Rev. AGCAATGCAGCCAATCTACAA	52	96	[74]
<i>gtfc</i>	For. CTCAACCAACCGCCACTGTT Rev. GGTTTAACGTCAAATTAGCTGTATTAG	52	136	[74]
<i>gtfd</i>	For. TGTCTTGGTGGCCAGATAAAC Rev. GAACGGTTTGTGCAGCAAGG	62	132	[74]
<i>sacB (ftf)</i>	For. CCTGCGACTTCATTACGATTGGTC Rev. ATTGGCGAACGGCGACTTACTC	62	103	This study
<i>comC</i>	For. TATCATTGGCGGAAGCGGAA Rev. TCCCCAAAGCTTGTGTAACCT	56	74	This study
<i>comD</i>	For. CGCGATTGGAGCCTTTAG Rev. CCTGAAATTCAGTTAGCCTTT	52	133	This study
<i>vicK</i>	For. CACTTTACGCATTCGTTTTGCC Rev. CGTCTTCTTTTCTGTTCCGGTC	56	102	[65]
<i>vicR</i>	For. CGCAGTGGCTGAGGAAAATG Rev. ACCTGTGTGTGCTAAGTGATG	56	157	[65]
<i>aguD</i>	For. ATCCCGTGAGTGATGATTTTG Rev. CAAGCCACCAACAAGTAAGG	56	80	[63]
<i>atpD</i>	For. CGTGCTCTCTCGCCTGAAATAG Rev. ACTCACGATAACGCTGCAAGAC	62	85	[63]
16s rRNA†	For. CCTACGGGAGGCAGCAGTAG Rev. CAACAGAGCTTTACGATCCGAAA	52	101	[75]

Ta : température de recuit.

**gtfb*, codant pour la glucosyltransférase I ; *gtfC*, glucosyltransférase SI ; *gtfD*, glucosyltransférase S ; *sacB(ftf)*, codant pour l'enzyme levansucrase (fructosyltransférase) ; *comC*, peptide stimulant la compétence ; *comD*, histidine kinase putative du régulateur de compétence ; *vicK*, histidine kinase putative de la protéine CovS VicK-like ; *vicR*, régulateur de réponse putatif de la protéine CovR VicR-like ; *aguD*, Agmatine : putrescine antiporter ; *atpD*, sous-unité bêta de la F-ATPase ; 16s rRNA, séquence du gène de l'ARN ribosomal 16s.

† Le gène 16s a été utilisé comme contrôle interne.

Résumé

Le biofilm buccal est l'un des problèmes dentaires les plus répandus qui touche plusieurs personnes dans le monde. Il s'adhère à la surface des dents et aux matériaux de restaurations comme les implants et les appareils dentaires causant ainsi des maladies infectieuses. L'objectif de ce travail est de réaliser une synthèse de deux articles sur de nouvelles approches ayant pour but l'inhibition de la formation du biofilm. La première étude portait sur la synthèse d'un polymère zwitterionique à base de poly-carboxybétaine (pCB) en tant que revêtement non salissant pour fournir des propriétés antibactériennes aux surfaces dentaires. Ce nouveau matériau de revêtement constitue une approche innovante pour résister à la formation du biofilm sur les surfaces dentaires. Tandis que, la deuxième étude portait sur l'hypothèse que *Lactobacillus sp* inhibe la croissance, la formation de biofilm et l'expression génétique de *Streptococcus mutans*. Ainsi les changements de conditions de croissance pour le surnageant de *Lacobacillus sp*. neutralisé au pH traité à la catalase ou traité à la trypsine ont été évalués pour identifier les rôles des acides organiques, des peroxydes et de la bactériocine sur l'inhibition de la formation du biofilm. Les résultats obtenus ont montré une réduction de l'expression des gènes impliqués dans la production d'exopolysaccharides, la tolérance aux acides et la détection du quorum. De plus, *Lacobacillus sp* a permis l'inhibition des caries dentaires en limitant la virulence de *Streptococcus mutans*.

Mots clés : Biofilm dentaire, Inhibition, Revêtement Zwitterionic, Probiotiques, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp*.

Summary

Oral biofilm is one of the most common dental problems affecting many people around the world. It adheres to tooth surfaces and restorative materials such as implants and braces causing infectious diseases. The objective of this work is to carry out a review of two papers on new approaches to inhibit biofilm formation. The first study focused on the synthesis of a zwitterionic polymer based on poly-carboxybetaine (pCB) as a non-fouling coating to provide antibacterial properties to dental surfaces. This new coating material is an innovative approach to resist biofilm formation on dental surfaces. Whereas, the second study focused on the hypothesis that *Lactobacillus sp*. inhibits the growth, biofilm formation and gene expression of *Streptococcus mutans*. Thus, changes in growth conditions for catalase-treated or trypsin-treated pH-neutralised *Lacobacillus sp*. supernatant were evaluated to identify the roles of organic acids, peroxides and bacteriocin on the inhibition of biofilm formation. The results obtained showed a reduction in the expression of genes involved in exopolysaccharide production, acid tolerance and quorum sensing. In addition, *Lacobacillus sp*. allows the inhibition of dental caries by limiting the growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*.

Key words: Oral biofilm, inhibition, Zwitterionic coating, Probiotics, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus sp*.

ملخص

العشاء الحيوي الرقيق عن طريق الفم هو أحد أكثر مشاكل الأسنان انتشارًا والتي تصيب العديد من الأشخاص حول العالم. يلتصق بأسطح الأسنان والمواد التصالحية مثل الغرسات وأجهزة طب الأسنان المسببة للأمراض المعدية. الهدف من هذا العمل هو إجراء دراسة تليفية لمقالين حول مناهج جديدة تهدف إلى تثبيط تكون الأغشية الحيوية الرقيقة. تضمنت الدراسة الأولى تخليق بوليمر zwitterionic على أساس البولي كربوكسيببتين (pCB) كطلاء غير متسخ لتوفير خصائص مضادة للبكتيريا لأسطح الأسنان. هذه المادة الاستثمارية الجديدة هي طريقة مبتكرة لمقاومة تكون الأغشية الحيوية على أسطح الأسنان. بينما اعتمدت الدراسة الثانية على فرضية أن *Lactobacillus sp*. يمنع النمو وتكوين الأغشية الحيوية والتعبير الجيني للمكورات العقدية الطافرة. وبالتالي التغييرات في ظروف النمو للطاف من *Lacobacillus sp*. تم تقييم المعالجة بالكاتالاز المعادل الهيدروجيني أو المعالج بالتريبسين لتحديد أدوار الأحماض العضوية، والبيروكسيدات، والبكتريوسين في تثبيط تكوين الأغشية الحيوية الرقيقة. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها انخفاضًا في تعبير الجينات المشاركة في إنتاج عديدات السكاريد الخارجية وتحمل الحمض واستشعار النصاب. بالإضافة إلى ذلك، لاكوباسيلوس س. يسمح بتثبيط تسوس الأسنان عن طريق الحد من خصائص النمو والفوعة للمكورات العقدية الطافرة.

الكلمات المفتاحية: البيوفلم الفموي، تثبيط تشكل البيوفيلم، طلاء *Lactobacillus sp*. Zwitterionic