

LE BIOFILM

I- DEFINITION

On peut définir le biofilm comme une accumulation hétérogène, adhérente à la surface des dents ou située dans l'espace gingivo-dentaire. Elle peut se retrouver également sur les différents matériaux de restauration dentaire ainsi que sur les prothèses. Elle est composée d'une communauté microbienne riche en bactéries aérobies et anaérobies, enrobées dans une matrice intercellulaire de polymères d'origine microbienne et salivaire.

Ainsi le biofilm dentaire apparaît comme une véritable unité écologique hautement organisée et non plus comme une simple accumulation de bactéries.

Selon le modèle le plus récent d'étiologie des maladies parodontales, la conjonction de quatre facteurs est nécessaire pour altérer ou détruire les tissus parodontaux superficiels et profonds:

- présence de bactéries pathogènes anaérobies gram -,
- absence de bactéries protectrices aérobies gram + antagonistes des précédentes,
- déficience du système immunitaire: leucopénie, réponse immunitaire inadéquate,
- environnement dento-gingival favorable aux bactéries virulentes.

Ces quatre facteurs sont nécessaires mais insuffisants à eux seuls pour provoquer une infection parodontale avec destruction des tissus. L'évolution et la sévérité de la maladie vont être conditionnées par la fréquence et l'intensité avec laquelle s'exprime chacune de ces quatre conditions.

II- LOCALISATION

Basée sur la relation avec le rebord gingival, la localisation de la plaque et du tartre se divise en deux catégories: supra-gingivale et sous-gingivale.

A- Plaque et tartre supra-gingivaux

Ils sont le plus souvent situés:

- quand la dent travaille, sous la ligne de plus grand contour,
- quand il existe une absence de la dent antagoniste, sur toute la surface dentaire.

Elle est décelable cliniquement dès qu'elle atteint une certaine épaisseur. Présente seulement en très faible quantité, son identification reste difficile et se réalise soit à l'aide d'une sonde déplacée sur la surface dentaire, soit par coloration à l'aide de révélateurs de plaque.

Le tartre supra-gingival est retrouvé plus fréquemment en regard des canaux excréteurs des glandes salivaires. A l'examen clinique, l'inspection des surfaces linguales des incisives inférieures et des faces vestibulaires des premières molaires maxillaires permet de mettre en évidence les calculs de tartre supra-gingival. De couleur claire et de consistance friable, il est relativement peu adhérent aux surfaces colonisées. Il est aisément coloré par le tabac, le thé, les aliments ou les produits du catabolisme bactérien.

B- Plaque et tartre sous-gingivaux

Le sulcus et la poche abritent une collection diverse de bactéries.

La colonisation du sulcus gingival se fait à partir d'un dépôt de plaque supra-gingival pré-existant. La composition de la plaque sous-gingivale est partiellement influencée par le dépôt bactérien supra-gingival.

Cependant, la nature des micro-organismes qui colonisent ces zones de rétention diffère de celles des micro-organismes observées au niveau de la plaque supra-gingivale. En effet, l'environnement sous-gingival va influencer les conditions de croissance et notamment le dépôt de bactéries anaérobies.

Le tartre sous-gingival ou tartre sérique est de couleur brune, de consistance ferme, très adhérent aux surfaces radiculaires. Sa localisation est irrégulière au sein de la cavité buccale. Son enfouissement intra-sulculaire peut passer inaperçu lors de l'inspection visuelle mais se détecte au sondage parodontal. A l'examen radiographique, il se différencie, soit sous forme de masse se superposant à l'image des tissus durs dentaires, soit par de petits spicules visibles le long des racines au niveau des espaces interdentaires. Sa coloration brune pourrait être due au type de flore bactérienne rencontrée à ce niveau et par l'exsudat sanguin fréquent à cet endroit.

III- MODE DE FORMATION DU BIOFILM

A- Adhésion bactérienne

Le premier temps de la formation du biofilm buccal ne dépend pas des bactéries, mais correspond à la création de leur substrat d'attache: la pellicule acquise. C'est un film glycoprotéique issu des protéines salivaires. Des histatines et du lysozyme (peptides antimicrobiens), de la statherine (protéine riche en proline), mais aussi des cytokératines font, entre autres, partie de la pellicule acquise. Il n'y a donc pas que des protéines salivaires.

Sa vitesse de formation permet de dire que les bactéries n'adhèrent pas aux surfaces dentaires mais à ce film. La colonisation initiale se caractérise par son aspect réversible; les premières bactéries à Gram positives pour la plupart (47 à 82 % sont des streptocoques, le reste étant des coccobacilles), sont liées à la pellicule acquise par des liaisons faibles (liaisons hydrogènes et forces de Van der Waals). Ces liaisons se renforcent avec le temps: protéoglycanes, *pilis* et *fimbriae*, les premières bactéries, qui sont sous forme planctoniques, vont pouvoir se fixer aux surfaces dures et à la pellicule acquise. *Actinomyces naeslundii* est une des bactéries les plus importantes dans la formation de ce biofilm. Cette espèce, avec les *Actinomycetes*, est à l'origine de l'attache bactérienne. La croissance se fait ensuite par la division des bactéries déjà présentes, ce qui entraîne une croissance latérale les premiers jours. Quand toute la surface disponible est couverte, les bactéries croissent en colonnes et la formation du biofilm proprement dit commence.

A partir du troisième jour, on peut parler de coagrégation bactérienne: on trouve des bactéries filamenteuses à la surface, et la plaque commence à se structurer en épi de maïs. Cette augmentation en volume du biofilm permet à celui-ci de gagner en complexité et d'autoriser par la suite la colonisation par des bactéries comme *Fusobacterium nucleatum*. Cette bactérie va permettre l'adhésion d'autres espèces en assurant la liaison entre celles déjà présentes et les nouvelles espèces candidates.

B- Croissance et colonisation

La croissance du biofilm et la colonisation d'autres sites proches par celui-ci reste un sujet relativement peu connu: elle aurait lieu par un phénomène de détachement cellulaire, et pourrait survenir selon trois procédés:

- érosion de cellules selon une manière prévisible (plus ou moins équivalente à un phénomène de desquamation),
- détachement sporadique de larges groupes cellulaires,
- processus intermédiaire: détachement de groupes cellulaires de façon prévisible.

Les détachements de cellules en groupes offrent comme avantage principal de permettre à celles-ci de profiter des mêmes protections qu'à l'intérieur du biofilm d'où elles se sont détachées, et d'en reproduire la structure. Il s'agit donc du mode de colonisation le plus fréquemment retrouvé. Cependant, le biofilm pourrait adhérer de façon directe et se développer à partir du biofilm préexistant et non à partir de cellules planctoniques.

La croissance cellulaire des bactéries déjà présentes dans le biofilm se fait de façon lente, en raison de la faiblesse relative en nutriments, des conditions parfois défavorables et surtout en raison de la compétition bactérienne existant à l'intérieur de ce biofilm. Ceci entraîne une sélection bactérienne des souches les plus résistantes.

C- Minéralisation de la plaque

Elle se fait après 8 à 9 jours et aboutit à la formation de tartre.

La naissance du tartre suit le développement de la plaque; les noyaux de calcification apparaissent dans la matrice interbactérienne ou à l'intérieur des micro-organismes.

La quantité de tartre dépend de facteurs individuels tels la composition de la salive et sa concentration en certaines enzymes. Cette quantité varie donc d'un patient à l'autre. Il est important d'attirer l'attention du patient sur le fait que le tartre ne peut se former qu'à partir des dépôts mous laissés sur les dents. La solution à tout problème de formation de tartre passe donc par le contrôle mécanique de la plaque dentaire.

IV- COMPOSITION DU BIOFILM

A- Structure

Il s'agit de microcolonies de bactéries (15 à 20% du volume) réparties de façon précise dans une matrice ou glycocalix. Leur organisation révèle un système de colonisation et des courants d'eau présents entre les colonies, ce qui permet le passage des nutriments et autres agents nutritifs jusqu'aux couches profondes du biofilm et agit ainsi comme un système circulatoire primitif: les nutriments parviennent aux colonies plus par le biais de ces microcourants que par diffusion passive dans la matrice. Le matériel sec de la matrice est composé d'exopolysaccharides, de protéines, de sels et de matériaux cellulaires. Les exopolysaccharides sont produits par les cellules du biofilm et représentent 50 à 95% de l'extrait sec. Ils jouent un rôle majeur dans la maintenance de l'intégrité du biofilm.

B- Interrelation bactérienne

65% des infections survenant chez l'homme proviennent de biofilms. La raison d'être de ce biofilm est d'autoriser la croissance des micro-organismes dans les différents milieux: il permet, par le biais de la collaboration bactérienne, une protection contre les facteurs environnementaux (défenses de l'hôte, substances toxiques,...). Il autorise aussi la fabrication et la capture de nutriments par alimentation croisée entre bactéries. Le nettoyage des déchets toxiques est réalisé par les autres bactéries présentes. Enfin, il se crée en son sein un environnement favorable à la croissance des différentes espèces qui le composent.

V- RECONNAISSANCE DES PARODONTOPATHIES COMME INFECTIONS

La reconnaissance des maladies parodontales comme infections est donc fondamentale pour assumer le concept des traitements chimiques, et les arguments en faveur de l'étiologie infectieuse sont finalement les suivants.

- en l'absence de bactéries, il n'y a pas de gingivite ni de parodontite chez l'animal,
- l'accumulation de plaque à la surface des dents provoque une inflammation gingivale, son élimination entraînant une disparition des signes cliniques. Les dépôts massifs sont régulièrement associés à une pathologie localisée,
- tous les principes de traitements efficaces incluent une réduction substantielle de la quantité de plaque et une modification de sa composition,
- une hygiène méticuleuse est le facteur critique de succès à long terme des thérapeutiques.

A- Principales bactéries parodontopathogènes

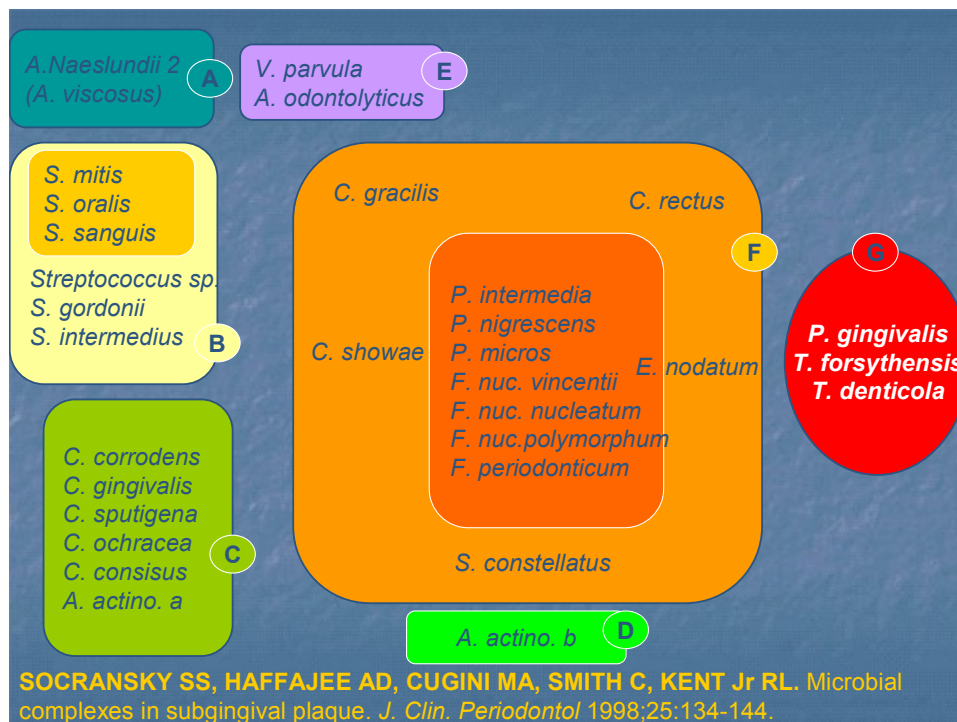
En 1996, L'American Association of Periodontology est arrivée à un consensus sur les espèces parodontopathogènes. Leur incrimination dans les pathologies parodontales repose sur les postulats de Koch modifiés, et sur un grand nombre d'études portant sur ces bactéries.

B- Complexes bactériens

L'importance de l'organisation bactérienne en biofilm étant prouvée, il faut compléter cette notion d'organisation spatiale par une notion d'organisation qualitative: les relations interbactériennes ne sont pas le fruit du hasard, et SOCRANSKY, en 1998, a montré que les espèces bactériennes impliquées dans les pathologies parodontales pouvaient être regroupées par groupes. La notion de complexes bactériens dans la flore parodontopathogène prend forme: il n'est plus possible de parler de cette pathogénie parodontale associée à une seule bactérie, hormis pour *Actinobacillus actinomycetemcomitans*.

On retrouve donc:

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sérotype b qui forme un complexe à lui tout seul, n'ayant pas pu être rapproché des autres bactéries,
- Le complexe jaune: *Streptococcus sp.*,
- Le complexe vert: *Capnocytophaga sp.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* sérotype a, *Eikenella corrodens* et *Campylobacter concisus*,
- Le complexe violet: *Veillonella parvula* et *Actinomyces odontolyticus*,
- Le complexe orange: *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, et les sous-espèces de *Fusobacterium nucleatum*,
- Le complexe rouge: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis* et *Treponema denticola*.



L'existence de ces complexes repose sur le fait que les bactéries qui les composent sont plus souvent retrouvées ensemble qu'avec celles des autres complexes. Les bases biologiques de ces associations ne sont pas connues, mais certaines bactéries pourraient sécréter des facteurs de croissance pour les autres. De plus, des associations inter complexes existent, le complexe orange étant fortement lié au complexe rouge, et les complexes jaune et vert étant eux aussi en relation. Enfin, l'existence d'exclusions mutuelles entre des espèces différentes présuppose un antagonisme bactérien, ou tout au moins une déformation de la niche écologique en faveur des espèces présentes.

Ces complexes se retrouvent à différents stades au cours de la pathologie: les premiers à intervenir sont les complexes vert et jaune, le complexe violet pouvant servir de lien entre ceux-ci et les complexes orange et rouge, que l'on retrouve dans

les poches les plus profondes et dans les tableaux cliniques les plus révélateurs de phase active des parodontites.

Enfin, on retrouve les complexes orange et rouge de façon plus fréquente et en proportion plus importante dans la flore des patients répondant très faiblement au traitement.

VI- MECANISMES PATHOGENIQUES

A- Hypothèses sur la pathogénie bactérienne

Les postulats de Koch, datant de 1882 et définissant les propriétés qu'une bactérie doit remplir pour être considérée comme étant à l'origine d'une maladie sont rediscutés: SOCRANSKY les modifie en 1996 pour intégrer la place grandissante de la biologie moléculaire.

- une séquence d'acides nucléiques associée avec un pathogène spécifique doit être présente dans la majorité des cas de la maladie, et retrouvé préférentiellement dans les sites les plus atteints.
- Les acides nucléiques associés aux pathogènes doivent être retrouvés en moins grand nombre ou absents chez les hôtes et dans les sites sains.
- Le nombre de séquences d'acides nucléiques doit décroître ou devenir indétectable avec la résolution de la maladie, et l'inverse doit avoir lieu avec une réapparition clinique de la maladie.
- La séquence d'acides nucléiques représente plus facilement une relation causale quand elle est détectée avant la survenue de la maladie, ou lorsque son nombre de copies est corrélé avec la sévérité de la maladie.
- La nature de l'organisme à laquelle appartient la séquence doit être en relation avec les caractéristiques biologiques de ce groupe d'organismes.

B- Facteurs de virulence bactérienne

On considère aujourd'hui les facteurs de virulence comme étant l'ensemble des artifices cellulaires et moléculaires qui permettent aux bactéries pathogènes de croître, de s'échapper du système de défense de l'hôte et de provoquer l'inflammation et la destruction tissulaire, que ce soit de façon directe (par le biais d'enzymes) ou de façon indirecte.

C- Facteurs impliqués dans la croissance et la colonisation bactérienne

1- Structure de surface: pili et fimbriae

Il s'agit d'appendices fins et filamenteux de surface qui autorisent la colonisation des tissus de l'hôte. Ces structures, d'abord décrites sur les entérobactéries, étaient appelées à l'origine *pilis*. Ils sont aujourd'hui dénommés *fimbriae*, ce qui correspond mieux à leur aspect chevelu. Deux grands types de *fimbriae* sont décrits: ceux qui sont incriminés dans les interactions avec les autres bactéries et les cellules mammaliennes (ils possèdent à leur extrémité des protéines spécifiques: les

adhésines) et avec les surfaces cellulaires dures et molles (*fimbriae* types spécifiques), et ceux qui sont impliqués dans les conjugaisons bactériennes, qui sont représentés par les *F-pili* ou les *sex-pili*.

Leur répartition sur les cellules varie beaucoup, certaines en ayant très peu (cellules lisses), d'autres en portant jusqu'à 1000 (cellules rugueuses). Les souches rugueuses de *P.gingivalis* sont les plus virulentes.

De plus, les *fimbriae* sont impliqués dans la coagrégation bactérienne.

2- Composants de surface

Ils sont représentés par les adhésines. Il s'agit de protéines qui sont portées par les *fimbriae*. Les cellules épithéliales, et notamment celles de l'épithélium oral, ont des résidus d'acide sialique exposés à leur surface. Après le détachement de celui-ci par une neuraminidase, un autre récepteur (en général, un résidu galactosyl) est exposé. Ce résidu est reconnu par les espèces bactériennes telles qu'*Actinomyces*, *F.nucleatum*, *P.intermedia* et *E.corrodens* qui y adhèrent. *P.g* peut, quant à elle, se lier aux fibres de collagène.

La majorité des adhésines sont des protéines de type lectine qui se lient aux hydrates de carbone présents sur les surfaces. En se fixant à la surface des bactéries cibles, elles autorisent le phénomène de coagrégation bactérienne.

3- Enzymes favorisant la croissance

L'équipement enzymatique en protéases permet aux bactéries qui le possèdent de se procurer les nutriments nécessaires à leur multiplication, au détriment de l'hôte. Certaines bactéries comme *P.g* possèdent des hemagglutinines et des enzymes hémolytiques qui lui permettent de dégrader les produits sanguins en vue d'obtenir des facteurs essentiels tels que les hémines.

4- Bactériocines

Elles permettent de gagner la compétition cellulaire pour la survie dans les niches écologiques. *A.a* en possède une particulièrement efficace sur sa surface et dans ses vésicules.

D- Facteurs impliqués dans l'évasion des systèmes de défense de l'hôte

1- Capsule

De nature polysaccharidique, rarement polypeptidique, elle entoure les bactéries à gram – et empêche la phagocytose de celle-ci. Elle sert aussi de barrière de perméabilité contre les ions métalliques toxiques et peut empêcher la dessiccation de la bactérie. Les mécanismes de défense contre ces bactéries encapsulées nécessitent des quantités adéquates d'anticorps contre le polysaccharide de la capsule, l'intervention du complément pour une opsonisation accrue, et des phagocytes actifs.

2- Blocage des polymorphonucléaires neutrophiles

A.a et d'autres bactéries possèdent une protéine inhibant leur chimiotactisme. Ceci interfère avec leur capacité à tuer et à phagocyter les cellules présentes. De plus les catalases et superoxydes dismutases rendent inactifs le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes produits par les neutrophiles.

3- Leucotoxines

Elles appartiennent à la famille des RTX (repeat toxin) de cytolysines bactériennes. Elles agissent à forte concentration par la formation de pores dans les cellules cibles, et particulièrement les leucocytes polymorphonucléaires. A faible concentration, elles inhibent la formation des anticorps et provoquent des réactions inflammatoires. Les vésicules d'*A.a* sont les réservoirs de la leucotoxine de celui-ci, mais ont en outre la particularité d'avoir une activité leucotoxique par elles-mêmes.

4- Protéases spécifiques des immunoglobulines

P.g, *P.i*, *P.m* et *Capnocytophaga sp.* possèdent des protéases dirigées spécifiquement contre les immunoglobulines (Ig)A et les IgG. La destruction des immunoglobulines empêche les phénomènes d'agglutination bactérienne et l'opsonisation préphagocytaire. Par ailleurs, *A.a* possède des composants pouvant se fixer sur les fragments Fc des immunoglobulines.

5- Protéases dégradant le complément

certaines protéases comme l'Arg gingipain de *P.g*, qui est une cystéine protéase, peut dégrader les composants de défense de l'hôte (immunoglobulines, complément, protéines de régulation).

6- Internalisation dans les cellules de l'hôte

A.a et *P.g* peuvent pénétrer dans les cellules de l'hôte et restent donc difficiles à éliminer.

E- Inflammation et destruction tissulaire

1- Directe

a- Enzymes

On parle de protéases quand elles sont non spécifiques, et de protéinases quand elles le sont. Le matériel enzymatique des bactéries est très complet, et on peut les envisager en fonction de leur substrat cible. Parmi les analogues de la trypsine, on

notera les Arg et Lys protéases: en plus de dégrader les protéines de défense, Arg gingipain peut dégrader les protéines du tissu conjonctif de l'hôte, et participer à la destruction indirecte en dégradant les inhibiteurs de la réaction inflammatoire sécrétés par l'hôte dans le sillon, gingival. Suivent ensuite les enzymes dirigées contre les molécules de structure: collagénases, hyaluronidases, chondroïtines sulfatases, phosphatases acides, phospholipases, lécithinases neuraminidases, β glucuronidases. Cet équipement permet aux bactéries qui le possèdent de dégrader les tissus environnants. *P.g* produit aussi une thiol protéinase qui dégrade le collagène du ligament parodontal et active les zymogènes (précurseurs inactifs des métalloprotéases impliquées dans la dégradation tissulaire).

b- Facteurs entraînant la résorption osseuse

Représentés par l'acide lipoteichoïque, le lipopolysaccharide et l'ammoniaque, ils sont sécrétés de façon active par les bactéries. La capsule et le matériel de surface jouent aussi un rôle non négligeable: *A.a* possède un matériel amorphe de surface qui interagit et active les ostéoclastes.

c- Cytotoxines

Les bactéries sécrètent des acides butyriques et propioniques, indoles, amines, ammoniaque et composés sulfurés volatils qui sont directement cytotoxiques.

2- Indirecte

► Certaines protéases de *P.g* peuvent activer le système kallikréine-quinine qui augmente la perméabilité vasculaire, entraînant à la fois une augmentation de la concentration en nutriments dans les sites atteints, et une augmentation du recrutement des polymorphonucléaires neutrophiles par le biais de l'activation du C5a. L'augmentation de ces neutrophiles va entraîner une destruction tissulaire par le biais des relargages enzymatiques.

► Les cellules de l'hôte présentes dans le sillon gingival contiennent des inhibiteurs de protéinases comme les α 1-protéinases, ou l' α 2-macroglobuline. Ces molécules inactivent les protéases présentes dans les tissus. Certaines protéases bactériennes sont dirigées contre ces contrôles de l'hôte.

► Le lipopolysaccharide est une molécule à large potentiel de destruction tissulaire et cellulaire. Il est présent sur toutes les bactéries gram -. Sa partie lipidique (le lipide A) est impliquée dans les effets biologiques, qui sont comparables quelle que soit l'espèce bactérienne. Son action s'exerce suite à sa liaison avec une protéine sérique: la lipoprotéine *binding protein*; ce complexe active les récepteurs CD14 des macrophages et leur forme soluble circulante. Il entraîne résorption osseuse, nécrose cutanée, agrégation plaquettaire et production de cytokines: interleukines (IL)1 α et β , 8 et 12, *tumor necrosis factor* (TNF) α . Le lipopolysaccharide ainsi que les

cytokines qu'il induit peuvent passer dans la circulation générale et causer de nombreuses pathologies, notamment cardiaques.