

# BIOFILMS BACTÉRIENS ET MÉDECINE DENTAIRE

F. SIMAIN (1), E. ROMPEN (2), E. HEINEN (3)

**RÉSUMÉ :** Les pathologies bucco-dentaires généralement décrites sont de deux grands types, d'une part, les caries, d'autre part, les parodontopathies. Leur nature polymicrobienne a été clairement démontrée; la théorie de la plaque dentaire à la base de cette réflexion a régulièrement évolué. Dès lors, le concept de pellicule biologique acquise ou de biofilm a été abondamment décrit, puis largement développé. Un biofilm bactérien est un ensemble de microcolonies bactériennes, engluées dans une matrice d'exopolymères et adhérant à une surface inerte ou vivante. Le but de cette revue de la littérature est le rappel de la formation, de la composition des biofilms et du lien étroit existant entre les biofilms et la médecine dentaire.

**MOTS-CLÉS :** *Biofilm - Médecine dentaire - Bactériologie*

## DENTAL BIOFILMS

**SUMMARY :** Oro-dental pathologies are generally classified into two main groups : caries and parodontopathies. They result from polymicrobial infections based on the dental plaque's theory which has constantly evolved. Therefore, the concept of acquired biological pellicle or biofilm has been described and largely elaborated. A bacterial biofilm is a unit of bacterial microcolonies embedded within an exopolymeric matrix and adherent to an inert or living surface. The aim of this paper is to provide a review of the literature with regard to the formation, and composition of the biofilm, as well as to point out the close link that exists between biofilm and dental medicine.

**KEYWORDS :** *Biofilm - Dentistry - Bacteriology*

Étymologiquement, le terme biofilm, vient du grec «bios» (vie) et de l'anglais «film» (pellicule). L'unité de base est la microcolonie, c'est-à-dire un petit amas de cellules bactériennes identiques (1). Leur caractère physiopathologique a été largement décrit en médecine; les biofilms sont ainsi impliqués dans près de 60% des infections nosocomiales et dans un nombre non négligeable d'infections prothétiques (2), (3). Il est unanimement admis que la grande majorité des micro-organismes sont présents dans leur environnement naturel, sous la forme de biofilms. L'état planctonique n'est en réalité qu'une étape transitoire, favorisant le passage d'un biofilm à un autre. Cette hypothèse a été décrite dans une étude pionnière de Zobell qui mit ainsi en évidence un plus grand nombre de bactéries vivantes sur les surfaces d'un récipient que dans le liquide qu'il contenait (4).

## FORMATIONS DES BIOFILMS DENTAIRES

Quatre étapes sont décrites lors de la formation d'un biofilm en général, et d'un biofilm dentaire en particulier.

- 1) On observe d'abord une fixation réversible de bactéries à la surface support (dents, crochets de prothèse, couronnes prothétiques);
- 2) Ensuite, un ancrage irréversible des bactéries via des systèmes classiques d'attaches tels que les flagelles, les pili;
- 3) Puis, une maturation de la structure, traversée entre autres par des courants de nutriments, des molécules signal, etc...;
- 4) Enfin, une dégradation du biofilm, avec un détachement cellulaire massif.

## ADHÉSION RÉVERSIBLE DES BACTÉRIES AUX STRUCTURES DENTAIRES

La présence de la pellicule exogène acquise, dite salivaire, composée de glycoprotéines, est la condition majeure à la constitution du biofilm dentaire; l'attachement bactérien se voit, par conséquent, grandement facilité. Les bactéries passent d'un milieu liquide, dans lequel elles évoluent librement, à une organisation en amas, de plus en plus complexe. Cet attachement initial est promu par différents facteurs (6). L'un d'entre eux est la force hydrodynamique, responsable du déplacement aléatoire des bactéries, voire de leur rapprochement vers le support, en l'occurrence dentaire. Notons également, le chimiotactisme, responsable du rapprochement spécifique via des récepteurs exprimés sur la membrane bactérienne. Il existe aussi des forces électrostatiques, et de Van der Waals; elles jouent un rôle déterminant dans les mécanismes d'attraction-répulsion.

(1) Chargé de cours, Université de Liège, Chef de Clinique, (2) Chef de Service, Service de Médecine Dentaire, CHU de Liège.

(3) Directeur du Laboratoire d'Histologie humaine, CHU de Liège.



Figure 1. Plaque dentaire (biofilm) chez un patient présentant une parodontite.

#### ADHÉSION IRRÉVERSIBLE AUX STRUCTURES DENTAIRES

Les bactéries disposent d'un arsenal de fixation d'une grande richesse, composé de flagelles, de curli et de pili. On peut observer des mouvements de type «twitching motility», basés sur la rétraction des poils à l'interface avec la surface solide; les pili présents au niveau d'un grand nombre de bactéries Gram, jouent un rôle important dans l'interaction avec la surface de support. A ce stade, on observe une surproduction d'exopolymères, renforçant par là même, la cohésion hétérogène interbactérienne. A noter que les flagelles, quant à elles, jouent un rôle dans le rapprochement des bactéries vers la surface-support, grâce à un mécanisme de nage (7).

#### MATURATION DU BIOFILM DENTAIRE

Lors de cette phase, on observe une modification importante de la taille de la structure, résultat des nombreuses multiplications des bactéries. La matrice extracellulaire augmente en épaisseur avec des modifications des gradients d'oxygène, de substrats, voire de pH. Des mécanismes de communication intercellulaire s'installent durablement; la bactérie est ainsi informée de la densité cellulaire et des interactions cellulaires dans son proche environnement. Des auteurs ont décrit des phéromones, telles les homosérines lactones (HSL) et un grand nombre de peptides, produits par les bactéries, tel que le *Pseudomonas aeruginosa*; c'est le concept du «quorum sensing» (8). Ces molécules diffusent à travers la membrane bactérienne et induisent l'activation d'un groupe de gènes-cibles lorsqu'elles ont atteint leur concentration critique; elles renforcent, par là même, le profil biofilm de la structure.

#### DÉTACHEMENT CELLULAIRE

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» (du verbe «to slough», muer). (9). L'appauvrissement nutritionnel au sein de la structure, favorise le détachement des bactéries, voire des fragments de biofilms. Un grand nombre de bactéries quittent la structure tridimensionnelle, elles se dispersent grâce à des forces de cisaillement et vont, par conséquent, contaminer d'autres sites, constituant de véritables réservoirs de bactéries pathogènes. 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.

#### COMPOSITION DU BIOFILM DENTAIRE

La composante cellulaire, majoritairement bactérienne, constitue la fraction principale du biofilm, le reste étant formé en partie de polysaccharides, de lipides et d'acides nucléiques (10). Outre les éléments microbiens qui constituent la fraction cellulaire (en moyenne 70%), les biofilms dentaires sont également composés d'une fraction acellulaire ou matrice (30% de la masse), riche en polysaccharides et autres molécules. On retrouve au sein de cette structure complexe, de nombreux canaux, constituant les principales voies d'évacuation des produits de dégradation et des axes d'acheminement de nutriments au sein de la matrice d'exopolymères. La matrice ou fraction acellulaire comprend environ 80% d'eau et 20% de phase solide; cette dernière est constituée de polysaccharides, de protéines, de lipides, d'oligoéléments, et d'éléments minéraux. Les polysaccharides, constituants-clés de la structure, forment deux familles, extracellulaire et intracellulaire; ils sont constitués de fructanes, à savoir des polymères de fructose et de glucanes, c'est-à-dire des polymères de glucose. Les glucanes sont de deux types : les dextrans, avec des liaisons alpha ( $\alpha$ ) 1-6, qui constituent la réserve énergétique facilement utilisable par les bactéries, et les mutanes, avec des liaisons ( $\alpha$ ) 1-3, qui permettent l'adhésion des bactéries à la pellicule exogène acquise et la cohésion inter-bactérienne. Les fructanes, quant à elles, limitent la diffusion de différents éléments tels que les bicarbonates salivaires. Les bactéries constituent l'élément prépondérant des biofilms dentaires. Il existe environ cent millions à un

milliard de bactéries par milligramme de pellicule biologique acquise. Environ trois cents espèces bactériennes ont été identifiées dans la cavité buccale; cette population microbienne est complexe, hétérogène, et changeante, car elle évolue quantitativement et qualitativement lors des phases de maturation de la plaque dentaire. De nombreuses espèces bactériennes aérobies sont décrites, entre autres, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa*, et les staphylocoques. Le nombre d'espèces au potentiel cariogène est restreint, il s'agit principalement des streptocoques, actinomyces et lactobacilles. En effet, les bactéries doivent, d'une part, être capables de synthétiser, en anaérobiose, des acides organiques à partir du saccharose, elles sont dites acidogènes, et, d'autre part, résister, se développer dans un milieu acide, elles sont dites aciduriques.

#### PHÉNOTYPE BIOFILMS

Les biofilms représentent le mode de vie le plus fréquent des bactéries. Dans les années 1980, leur résistance face aux antibiotiques, voire à certains antiseptiques buccaux, était expliquée par la constitution d'une barrière physique empêchant toute forme de diffusion. Cependant, l'équipe de G. Geesey a montré, dans une étude de 1994, que les antibiotiques peuvent atteindre les profondeurs d'un biofilm de 500 micromètres ( $\mu\text{m}$ ) d'épaisseur en 90 secondes (11). Dès lors, de nombreuses hypothèses ont été envisagées, à savoir, l'effet colle de la gangue de polymères, l'existence de microenvironnements au sein des biofilms, et l'émergence d'un phénotype biofilm persistant chez les bactéries immobilisées (ce dernier étant le reflet des altérations de l'expression génique des bactéries adhérentes). Les bactéries au sein des biofilms (dentaires) possèdent des propriétés phénotypiques exceptionnelles, à savoir résistance face à certains antibiotiques et aux tampons salivaires (12). La matrice extracellulaire joue un rôle de barrière filtrante par interaction avec le composé ou par «piégeage». D'autres phénomènes environnementaux tels que les zones carencées en nutriments, en oxygène, ou des valeurs basses de pH interviennent également. Ces différentes stratégies pourraient expliquer l'inefficacité de certains bains de bouche, voire de certains antibiotiques qui, malgré une excellente diffusion, restent relativement inefficaces, phénomène observé lors de l'utilisation de la vancomycine (13). Ce phénotype biofilm reflète des altérations de l'expression génique des bactéries adhérentes telles que les streptocoques, lactobacilles,

actinomyces, et permet d'expliquer les différences observées avec des espèces en suspension (14). L'installation d'un biofilm signifie, dans de nombreuses situations cliniques, l'instauration d'une infection chronique, la stratégie de la colonisation dépendant des facteurs environnementaux. C'est ainsi que la bactérie exprime des mécanismes de virulence adaptés pour échapper à des réponses immunitaires. L'une des techniques est le système de phosphorelais; c'est un ensemble de deux protéines, un senseur localisé au niveau de la membrane interne qui détecte les signaux environnementaux et un régulateur transcriptionnel, qui une fois activé, régule l'expression des gènes en se fixant à hauteur des régions promotrices de ces derniers. Certains régulateurs agissent par l'intermédiaire d'une activité enzymatique qui génère un composé terminal, le diguanosyl monophosphate cyclique (c-di-GMP). Leur concentration intracellulaire est contrôlée par la diguanylate cyclase (DGC) et la phosphodiesterase (PDE). Le taux de c-di-GMP intracellulaire est un indicateur cellulaire par lequel la bactérie va choisir un mode de vie en biofilm ou planctonique (15). La cellule va dès lors, s'orienter vers une production importante de glycosaminoglycans, ciment bactérien. C'est ainsi que des travaux sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, ont montré que celle-ci répond à une diversification génétique quand elle pousse en biofilm, et sa résistance au stress environnemental s'en trouve augmentée (16).

Cette gamme étendue de phénotypes différents, obtenus à partir d'une souche unique de *Pseudomonas aeruginosa*, montre pour certains groupes un métabolisme ralenti, se mettant ainsi à l'abri d'un antibiotique type pénicilline, sachant que celle-ci agit préférentiellement sur les bactéries en phase de multiplication. Au sein de la structure biofilm, les bactéries sont susceptibles de développer des mécanismes de résistance classique aux antibiotiques, par sélection d'une mutation spontanée, par échange de matériel génétique entre bactéries. Ces phénomènes sont beaucoup plus fréquents au sein d'un biofilm que dans un état planctonique (17). Par ailleurs, certains gènes du *Pseudomonas* impliqués dans l'assemblage des appendices nécessaires aux premières étapes de l'adhésion irréversible, voient leur expression diminuer lorsque le biofilm atteint son stade de maturation; c'est le cas des gènes *cupA*, *fliC* et *pilA*. Le développement de nouvelles approches dites «post-génomiques» telles que les puces ADN, la protéomique et l'hybridation soustractive d'ADNc, ont permis de dresser un inventaire des différences d'expression génique chez les bactéries organi-

sées en biofilm et les bactéries en suspension (14, 18). Pour rappel, l'approche protéomique consiste à identifier et à quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné. La technique transcriptomique consiste, quant à elle, à identifier et quantifier les ARNm exprimés. La méthode protéomique suggère qu'un grand nombre de protéines sont différemment exprimées chez des bactéries des biofilms soit, entre 15 et 50% de modifications du protéome. Les résultats par puces ADN, quant à eux, montrent qu'une faible proportion du génome, entre 1 et 15%, présente des modifications significatives d'expression.

Les différences peuvent s'expliquer par la faible corrélation entre la quantité d'ARNm et la quantité de protéines, mais pourraient tout autant indiquer l'existence de protéines-clés qui ne seraient pas encore identifiées, parce que modifiées qualitativement et non quantitativement, via les mécanismes, par exemple, de phosphorylation. Peu de nouvelles voies de régulation associées à la vie en biofilm ont été identifiées et aucune n'a été démontrée comme étant spécifique ou nécessaire quel que soit le biofilm. Une des rares exceptions concerne le gène *pA1163* de *Pseudomonas aeruginosa* qui est impliqué, non pas dans la formation des biofilms, mais dans la résistance des bactéries adhérentes à la tobramycine (19). L'autre exception est le gène *arr pA2818*, toujours de *Pseudomonas aeruginosa*, codant une phosphodiesterase de la membrane interne dont le substrat est le c-di-GMP (20).

## BIOFILMS ET PATHOLOGIES DENTAIRES

La carie dentaire est une maladie infectieuse polymicrobienne. Le contrôle, voire l'élimination mécanique de la plaque dentaire, organisée sous la forme d'un biofilm, constitue une des clés de voûte de sa prévention. Pour rappel, le terme de biofilm ne s'applique pas aux débris alimentaires, encore appelés *materiae alba*, qui eux, sont éliminés par simple jet d'eau sous pression, car ils ne font pas intervenir des phénomènes d'adhérence, mais uniquement de simples mécanismes de rétention et de tassement. L'élimination de la plaque nécessite sa désorganisation mécanique par un brossage méticuleux. Lors de la phase de maturation, le biofilm peut acquérir une taille tridimensionnelle dite en épis de maïs ou de champignon, avec une masse variant entre 5 et 200 milligrammes.

Rappelons que pour pouvoir croître et se développer, les bactéries ont besoin d'énergie; celle-ci est apportée par les glucides, et leur dégradation,

ou glycolyse, aboutit à l'acétylcoenzyme A. En absence d'oxygène, ce qui est le cas lorsque les conditions d'anaérobiose prédominent dans le biofilm dentaire, la glycolyse ne peut se faire selon la voie oxydative, mais uniquement selon le processus de fermentation. On assiste dès lors à la formation d'acides organiques du type lactique, acétique, formique, propionique, pyruvique et succinique, qui vont entraîner la dissolution progressive des cristaux d'hydroxyapatite des tissus minéralisés dentaires et/ou des structures parodontales.

## ELIMINATION DES BIOFILMS, ET PERSPECTIVES D'AVENIR

Deux stratégies sont proposées dans la lutte contre les biofilms à hauteur des matériaux dentaires, le développement de surfaces antiadhésives et la mise en place de matériaux antibactériens. La modification de la surface support tend à supprimer les rugosités à hauteur des prothèses squelettiques, voire des couronnes dentaires, en privilégiant les surfaces lisses, par exemple par un polissage dentaire, dans le but de réduire l'interaction avec la bactérie. C'est ainsi que l'utilisation de polymères mixtes ou copolymères possédant une queue hydrophobe pouvant adhérer à la surface et une tête hydrophile limitant les interactions avec les protéines peut être une stratégie d'avenir (21). Dans le cadre de l'élaboration de surfaces à revêtements antimicrobiens, leur application dentaire nous semble à ce stade difficilement réalisable. Cependant, l'utilisation de l'ion Argent, agent antibactérien, par diffusion et fixation sur l'ADN microbien et sur les groupes sulhydryles des enzymes, peut être une voie de recherche, et constitue une technique du futur. Dans le cadre de l'incorporation d'agents antimicrobiens, Manefield et coll. ont montré que la furanone, substance qui prévient la contamination de l'algue marine *Delisea pulchra* par des biofilms, possède une structure proche des HSL, et se comporte comme un antagoniste des HSL. Elles sont de nos jours incorporées dans des pâtes dentifrices, des chewing-gums (22).

## CONCLUSION

Une étude de Costerton et coll., portant sur les communautés bactériennes peuplant les cours d'eau, a montré que le nombre de bactéries attachées aux rochers sous forme de biofilms, dépasse d'un facteur 1.000 à 10.000 celui des bactéries flottant dans l'eau (23); ils existent à la fois dans le milieu naturel (coques des navires), en milieu industriel (réseaux de distribution



d'eau chaude, laiteries, brasseries), et dans le monde médical, (couronnes dentaires, cathéters, pacemakers). Leur élimination non mécanique au niveau des matériaux tels que les couronnes, les crochets de prothèses dentaires, pourra se baser en partie, sur le développement de surfaces antiadhésives. Dans le cadre des biofilms dentaires, si leur élimination repose en priorité sur une utilisation régulière de la brosse à dent et du fil dentaire, les perspectives d'avenir sont encourageantes et l'élaboration de matériaux antibactériens par adsorption de la molécule sur la surface après fabrication du matériau, ou l'incorporation de la molécule durant la fabrication, reste prometteuse.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Costerton JW.— Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*, 1999, **11**, 217-221.
2. Goffart J, Gillet P.— Endodontic biofilms and secondary infection of total hip arthroplasty. *Rev Med Liege*, 2007, **62**, 736-742.
3. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP.— Bacterial biofilms : a common cause of persistent infections. *Science*, 1999, **284**, 1318-1322.
4. Zobell CE.— The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol*, 1943, **46**, 39-56.
5. Lappin-Scott HM, Bass C.— Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *Am J Infect Control*, 2001, **29**, 250-251.
6. Donlan RM.— Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, **8**, 881-890.
7. O'Toole GA, Kolter R.— Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol*, 1998, **30**, 295-304.
8. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, et al.— The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 1998, **280**, 295-298.
9. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R.— Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 2000, **54**, 49-79.
10. Branda SS.— Biofilm : the matrix revisited. *Trends in Microbiol*, 2005, **13**, 20-26.
11. Suci PA, Mittelman MW, Yu FP, Geesey GG.— *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, **38**, 2125-2133.
12. Teitzel GM, Parsek MR.— Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**, 2313-2320.
13. Dunne WM Jr, Mason EO Jr, Kaplan SL.— Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, **37**, 2522-2526.
14. Ghigo JM.— Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Research in microbiology*, 2003, **154**, 1-8.
15. D'Argenio DA, Miller SI.— Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology*, 2004, **150**, 2497-2502.
16. Boles BR, Thoendel M, Singh PK.— Self-generated diversity produces «insurance effects» in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, **101**, 16630-16635.
17. Ghigo JM.— Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 2001, **412**, 442-445.
18. Jouenne T, Vilain S, Cosette P, Junter GA.— Proteomics of biofilm bacteria. *Curr Proteomics*, 2004, **1**, 211-219.
19. Mah TF, Pitts B, Pellock B, et al.— A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 2003, **426**, 306-310.
20. Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, et al.— Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 2005, **436**, 1171-1175.
21. Li ZF, Ruckenstein E.— Two liquid adsorptive entrapment of a pluronic polymer into the surface of polyaniline films. *J Colloid Interface Sci*, 2003, **264**, 370-377.
22. Manefield M, de Nys R, Kumar N, et al.— Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology*, 1999, **145**, 283-291.
23. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ.— How bacteria stick. *Sci Am*, 1978, **238**, 86-95.

Les demandes de tirés à part sont à adresser au Pr F. Simain, Service de Médecine Dentaire, CHU de Liège, 4000 Liège, Belgique.  
Email : fsmain@chu.ulg.ac.be