



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

ACADEMIE DE NANCY-METZ

UNIVERSITE HENRI POINCARE NANCY 1
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2007



N° 26-04
Double

THESE

pour le

**DIPLÔME D'ETAT DE DOCTEUR
EN CHIRURGIE DENTAIRE**

par

Marie CRITON

Née le 02 Décembre 1982 à LAXOU (Meurthe et Moselle)

**DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE EN
PARODONTOLOGIE : METHODES ET INTERETS
CLINIQUES.**

Présentée et soutenue publiquement le : 17 Avril 2007

Examineurs de la Thèse :

Mme C. STRAZIELLE

M P. AMBROSINI

M N. MILLER

Mme C. BISSON-BOUTELLIEZ

Professeur des Universités

Maître de Conférences des Universités

Maître de Conférences des Universités

Maître de Conférences des Universités

Présidente

Juge

Juge

Juge

PPN 115834583
BIB 186524

ACADEMIE DE NANCY-METZ

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ NANCY 1
FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2007



N° 26-04
Double

THESE

pour le

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR
EN CHIRURGIE DENTAIRE**

par

Marie CRITON

Née le 02 Décembre 1982 à LAXOU (Meurthe et Moselle)

**DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE EN
PARODONTOLOGIE : METHODES ET INTERETS
CLINIQUES.**

Présentée et soutenue publiquement le : 17 Avril 2007

Examineurs de la Thèse :

Mme C. STRAZIELLE

M P. AMBROSINI

M N. MILLER

Mme C. BISSON-BOUTELLIEZ

Professeur des Universités

Maître de Conférences des Universités

Maître de Conférences des Universités

Maître de Conférences des Universités

Présidente

Juge

Juge

Juge



D

104 076168 0

Vice-Doyens : Dr. Pascal AMBROSINI - Dr. Jean-Marc MARTRETTE - Dr Jacques PREVOST
Membres Honoraires : Pr. F. ABT - Dr. L. BABEL - Pr. S. DURIVAUX - Pr. G. JACQUART - Pr. D. ROZENCWEIG - Pr. M. VIVIER
Doyen Honoraire : Pr. J. VADOT

Sous-section 56-01 Odontologie pédiatrique	Mme M. Mlle Mme M.	<u>DROZ Dominique (Desprez)</u> PREVOST** Jacques MARCHETTI Nancy ROY Angélique (Mederlé) SABATIER Antoine	Maître de Conférences Maître de Conférences Assistant Assistant Assistant
Sous-section 56-02 Orthopédie Dento-Faciale	Mme Mlle M.	<u>FILLEUL Marie Pierryle</u> BRAVETTI Morgane GEORGE Olivier	Professeur des Universités* Assistant Assistant
Sous-section 56-03 Prévention, Epidémiologie, Economie de la Santé, Odontologie légale	M. Mme	<u>WEISSENBACH Michel</u> JANTZEN-OSSOLA Caroline	Maître de Conférences* Assistant Assistant
Sous-section 57-01 Parodontologie	M. M. Mme M. Mme M.	<u>MILLER** Neal</u> AMBROSINI Pascal BOUTELLIEZ Catherine (Bisson) PENAUD Jacques BACHERT Martine PONGAS Dimitrios	Maître de Conférences Maître de Conférences Maître de Conférences Maître de Conférences Assistant Assistant
Sous-section 57-02 Chirurgie Buccale, Pathologie et Thérapeutique Anesthésiologie et Réanimation	M. M. M. M. Mlle M.	<u>BRAVETTI Pierre</u> ARTIS Jean-Paul VIENNET Daniel WANG Christian LE Audrey PERROT Ghislain	Maître de Conférences Professeur 1er grade Maître de Conférences Maître de Conférences* Assistant Assistant
Sous-section 57-03 Sciences Biologiques (Biochimie, Immunologie, Histologie, Embryologie, Génétique, Anatomie pathologique, Bactériologie, Pharmacologie)	M. M. Mme	<u>WESTPHAL** Alain</u> MARTRETTE Jean-Marc MOBY Vanessa (Stutzmann)	Maître de Conférences * Maître de Conférences Assistant
Sous-section 58-01 Odontologie Conservatrice, Endodontie	M. M. M. M. M. M. M.	<u>AMORY** Christophe</u> PANIGHI Marc jusqu'au 2/3/07 FONTAINE Alain ENGELS DEUTSCH** Marc CLAUDON Olivier PERRIN Sébastien SIMON Yorick	Maître de Conférences Professeur des Universités* Professeur 1 ^{er} grade* Maître de Conférences Assistant Assistant Assistant
Sous-section 58-02 Prothèses (Prothèse conjointe, Prothèse adjointe partielle, Prothèse complète, Prothèse maxillo-faciale)	M. M. M. M. M. M. M. M. M.	<u>SCHOUVER Jacques</u> LOUIS** Jean-Paul ARCHIEN Claude LAUNOIS** Claude KAMAGATE Sinan DE MARCH Pascal HELPER Maxime SEURET Olivier WEILER Bernard	Maître de Conférences Professeur des Universités* Maître de Conférences * Maître de Conférences Assistant associé au 1/10/05 Assistant Assistant Assistant Assistant
Sous-section 58-03 Sciences Anatomiques et Physiologiques Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, Radiologie	Mlle M. Mme	<u>STRAZIELLE** Catherine</u> SALOMON Jean-Pierre HOUSSIN Rozat (Jazi)	Professeur des Universités* Maître de Conférences Assistante Associée au 01/01/2007

*Par délibération en date du 11 décembre 1972,
la Faculté de Chirurgie Dentaire a arrêté que
les opinions émises dans les dissertations
qui lui seront présentées
doivent être considérées comme propres à
leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner
aucune approbation ni improbation.*

A notre présidente,

Madame Catherine STRAZIELLE

Docteur en Chirurgie Dentaire
Professeur des Universités
Habilité à diriger des Recherches par l'Université Henri Poincaré, Nancy-I
Responsable de la sous-section : Sciences Anatomiques et Physiologiques,
Occlusodontiques, Biomatériaux, Biophysique, radiologie

Vous avez bien voulu nous faire
l'honneur d'accepter la présidence de
cette thèse.

Nous sommes heureuse d'avoir pu
bénéficier de la richesse de votre
enseignement, de votre expérience
dans les relations internationales et
nous avons été particulièrement
sensible à la simplicité de votre
contact.

Que ce travail soit l'expression de
notre gratitude et de notre sincère
admiration.

A notre juge et maître de thèse,

Monsieur Pascal AMBROSINI

Docteur en Chirurgie Dentaire
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-I
Vice-Doyen au budget et aux affaires hospitalières
Maître de Conférences des Universités
Sous-section : Parodontologie

Vous nous faites l'honneur de juger
cette thèse, dont vous nous avez
inspiré le sujet.
Vous nous avez aidé dans le
déroulement de ce travail et nous
remercions pour votre disponibilité,
votre bienveillance et vos conseils.
Veuillez trouver ici le témoignage de
notre sincère reconnaissance et de
notre plus respectueux attachement.

A notre juge,

Monsieur Neal MILLER

Docteur en Sciences Odontologiques
Docteur d'Etat en Odontologie
Maître de Conférences des Universités
Responsable de la sous-section : Parodontologie

Vous nous faites l'honneur de juger
cette thèse.

Nous sommes heureuse d'avoir pu
bénéficier de la clarté et de la qualité
de votre enseignement.

Puissiez vous trouver ici l'expression
de notre gratitude et de notre profond
respect.

A notre juge,

Madame Catherine BISSON-BOUTELLIEZ,

Docteur en Chirurgie Dentaire
Maître de Conférences des Universités
Sous-section : Parodontologie

Vous avez accepté de juger cette
thèse.
Nous sommes reconnaissante de
l'attention que vous avez bien voulu
porter à notre travail.
Veuillez trouver ici l'expression de
notre profond respect.

ET ENCORE MERCI A

A mes parents,

Qui m'ont soutenu pendant toutes les étapes de la rédaction. Que ce travail soit le témoignage de mon amour et de mon attachement.

A Lionel qui sera bientôt mon mari,

La présentation de ce travail lui doit beaucoup. Son amour et son expérience de la mise en page ont apaisé bien des soucis.

A ma sœur Camille,

Dont les histoires de lycées m'aident à me changer les idées. Sa présence quotidienne me manque mais les retrouvailles n'en sont que plus joyeuses.

A Yasmine SARRHINI,

Nos travaux et les problèmes communs que nous avons rencontrés m'ont une fois de plus fait apprécier son amitié et sa gentillesse.

A toute ma famille

A notre doyen, Monsieur Pierre BRAVETTI,

Vous nous avez porté une attention bienveillante pendant notre scolarité. Que ce travail soit l'occasion de manifester notre reconnaissance et de notre profond respect.

A Pascale SEJOURNANT-VIOT,

Pour son amitié et son aide précieuse pour la bibliographie.

Aux Docteurs Christian MOLE et Sylvie YGUEL,

Qui m'ont accueilli en stage et m'ont fait profité de la richesse et de la qualité de leur expérience professionnelle.

Au Docteur Isabelle SILBERSTIEN,

Qui m'a fait confiance pour mon premier remplacement. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon amitié.

A toute l'équipe du service d'odontologie de l'hôpital Jeanne D'Arc,

Pour leur enseignement et leurs conseils, dispensés dans une ambiance des plus conviviale.

Au personnel des bibliothèques universitaires,

Qui m'a aidé dans mes recherches. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

Et enfin à mes amis, Samuel, Sarah, Cécile, Olivier, Céline, Marc, Gwladys, Thomas, Florence, et bien d'autres...



Table des matières

PARTIE I	ETIOLOGIE MICROBIOLOGIQUE DE LA PARODONTITE	4
I.1.	LES INTERACTIONS BACTÉRIENNES.	7
I.2.	LES COMPLEXES BACTÉRIENS AU SEIN DE LA PLAQUE DENTAIRE.	9
I.3.	LES PRINCIPALES BACTÉRIES PARODONTOPATHOGÈNES.	16
I.3.1.	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans.</i>	16
I.3.2.	<i>Porphyromonas gingivalis.</i>	22
I.3.3.	<i>Tannerella forsythensis.</i>	33
I.3.4.	<i>Prevotella intermedia.</i>	36
I.3.5.	<i>Fusobacterium nucleatum.</i>	37
I.3.6.	<i>Eubacterium.</i>	38
I.3.7.	<i>Capnocytophaga.</i>	39
I.3.8.	<i>Peptostreptococcus.</i>	40
I.3.9.	<i>Campylobacter rectus.</i>	41
I.3.10.	<i>Eikenella corrodens.</i>	42
I.3.11.	<i>Selenomonas et Centipeda periodontii.</i>	42
I.3.12.	<i>Spirochètes.</i>	43
I.3.13.	<i>Entérobactéries.</i>	46
I.4.	MICROORGANISMES NON BACTÉRIENS À POTENTIEL PARODONTOPATHOGÈNE.	47
I.4.1.	<i>Parasites.</i>	47
I.4.2.	<i>Virus.</i>	48
I.4.3.	<i>Candida.</i>	50
PARTIE II	MÉTHODES ACTUELLES DE DIAGNOSTIC : PRINCIPES, AVANTAGES ET INCONVÉNIENTS.	51
II.1.	PRÉLÈVEMENT DE LA FLORE PARODONTALE.	53
II.1.1.	<i>Précautions préalables.</i>	54
II.1.2.	<i>Prélèvement au cure-dent monté.</i>	54
II.1.3.	<i>Prélèvement avec une pointe de papier endodontique.</i>	55
II.1.4.	<i>Prélèvement avec une curette.</i>	55
II.1.5.	<i>Conclusion.</i>	56
II.2.	EVALUATION DES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC.	57
II.3.	EXAMEN DIRECT.	58
II.3.1.	<i>Coloration à l'orange d'acridine.</i>	59
II.3.2.	<i>La coloration de Gram.</i>	60
II.4.	CULTURE BACTÉRIENNE.	61
II.4.1.	<i>Principe.</i>	61
II.4.2.	<i>Avantages.</i>	65

II.4.3.	<i>Inconvénients.</i>	66
II.5.	DÉTECTION IMMUNOLOGIQUE DES PATHOGÈNES.	67
II.5.1.	<i>Immunofluorescence directe ou indirecte.</i>	67
II.5.2.	<i>La technique ELISA.</i>	70
II.5.3.	<i>Avantages et inconvénients communs à ces deux techniques.</i>	72
II.6.	IDENTIFICATION BACTÉRIENNE PAR DÉTECTION D'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE : TEST BANA.	73
II.7.	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE.	76
II.7.1.	<i>Sondes ADN et ARN.</i>	78
II.7.2.	<i>Technique de la PCR.</i>	87
PARTIE III INTÉRÊT CLINIQUE ET LIMITE DU DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE		
AU CABINET DENTAIRE.96		
III.1.	QUELS TYPES DE TEST, DANS QUELLE SITUATION ?	98
III.2.	INTÉRÊT PRÉVENTIF : DÉTECTION DES SUJETS À RISQUE.	98
III.2.1.	<i>Microorganismes endogènes et exogènes.</i>	99
III.2.2.	<i>Les bactéries représentant un facteur de risque.</i>	101
III.3.	INTÉRÊT DIAGNOSTIC.	103
III.3.1.	<i>Détection des parodontopathies.</i>	103
III.3.2.	<i>Prédiction du type de parodontopathie.</i>	104
III.3.3.	<i>Pronostic.</i>	106
III.4.	INTÉRÊT THÉRAPEUTIQUE : ADAPTATION DU TRAITEMENT EN FONCTION DES RÉSULTATS DE TESTS.	109
III.4.1.	<i>Objectif du traitement.</i>	111
III.4.2.	<i>Le besoin de traitement.</i>	113
III.4.3.	<i>L'antibiothérapie.</i>	114
III.4.4.	<i>Le cas particulier des parodontites réfractaires.</i>	122
III.4.5.	<i>En pratique, quand utiliser les tests microbiologiques dans la phase de traitement? ..</i>	124
III.5.	INTÉRÊT EN PHASE DE MAINTENANCE : DÉTECTION DES SIGNES DE GUÉRISON ET DE SIGNES INDIQUANT LES RISQUES DE RÉCIDIVE.	128
III.5.1.	<i>Recolonisation ou persistance bactérienne et récurrence de la pathologie.</i>	129
III.5.2.	<i>Quand utiliser les tests microbiologiques en phase de maintenance ?</i>	131
PARTIE IV ANNEXE : LES DIFFÉRENTES CLASSIFICATIONS DES MALADIES PARODONTALES. 133		
PARTIE V BIBLIOGRAPHIE142		



Introduction

L'étiopathogénie de la parodontite est l'infection bactérienne, les bactéries concernées étant présentes dans la plaque sus et sous gingivale. Il semble que la majeure partie de celles-ci soit compatible avec la santé parodontale, ce qui pose le problème de distinguer les bactéries pathogènes des bactéries non pathogènes. Il existe à ce sujet deux modalités. La première est que ces bactéries proviennent d'un réservoir extra buccal, et que leur acquisition déclenche la pathologie. La deuxième est que l'apparition de la pathologie soit la conséquence d'un déséquilibre de l'écosystème bactérien : certaines espèces bactériennes opportunistes deviennent dominantes et pathogènes.

Au fil des progrès technologiques, de nombreuses méthodes se sont succédées pour identifier et dénombrer les bactéries présentes dans le sillon sous-gingival. La culture a été, et reste encore, une méthode de choix pour identifier les souches bactériennes et tester leur sensibilité aux antibiotiques. Cependant, de nouvelles technologies de biologie moléculaire lui font aujourd'hui concurrence. Si elles ne peuvent remplacer certains aspects de la culture, ces techniques sont néanmoins précises et fiables et peuvent détecter jusqu'à la présence d'un seul exemplaire bactérien. Elles permettent également d'identifier des bactéries difficilement cultivables, de différencier des bactéries de phénotype proche, et même de distinguer différents variants génétiques d'une même espèce. Ces nouveaux procédés, aux possibilités apparemment illimitées, peuvent aider les praticiens à déterminer de manière plus claire l'étiologie des pathologies parodontales, pourvu qu'on choisisse la bonne technique.

L'identification des espèces bactériennes ou des complexes bactériens à l'origine de la pathologie parodontale est devenue un nouvel enjeu. Elle permettrait non seulement de mieux comprendre l'étiopathogénie de la parodontite, mais possiblement de prévenir la pathologie, de rationaliser les traitements, et d'éviter les récives. En effet, s'il était possible d'identifier certains pathogènes comme étant à l'origine de l'apparition de la pathologie, cela pourrait aboutir à la réalisation de campagnes de prévention. De même, si on parvient à déterminer la cause microbiologique précise de la pathologie, il pourrait être possible de rationaliser le traitement afin d'obtenir l'élimination des bactéries causales et /ou la rééquilibrage de la flore afin de la rendre compatible avec la santé parodontale. Enfin, définir quelles bactéries sont à l'origine de récives lors de la maintenance pourrait aider à prévenir ces « rechutes ».

Partie I

Etiologie microbiologique de la parodontite

Les classifications successives des maladies parodontales ont toujours distingué les pathologies gingivales des pathologies parodontales. Les gingivopathies correspondent à une inflammation de type infectieuse plus ou moins importante de la gencive sans perte d'attache, c'est-à-dire sans lyse osseuse. Elles sont causées par la plaque sus-gingivale qui se dépose sur la dent le long de la gencive marginale. Les parodontopathies correspondent à une formation de poche parodontale et une perte d'attache simultanée. En plus de l'inflammation, il y a destruction des tissus parodontaux. Cette pathologie est causée par la plaque bactérienne qui se dépose dans le sulcus.

La parodontite est caractérisée par la présence de poches parodontales contenant de la plaque bactérienne sous-gingivale. On s'intéressera donc principalement à la composition de cette plaque ou biofilm bactérien, qui contient les agents étiologiques.

Lors de la santé gingivale, les micro-organismes à gram positif tels que les streptocoques et les *actinomyces* sont dominants dans la composition de la plaque. Lors de la pathologie, cette composition évolue : elle est caractérisée par une présence importante de bactéries anaérobies à gram négatif (Ezzo PJ and Cutler CW, 2003).

Les travaux effectués depuis plus de 20 ans ont montré que seules une vingtaines d'espèces parmi les centaines présentes en bouche, sont potentiellement parodontopathogènes. A l'opposé des maladies infectieuses « classiques », il n'y a pas un seul germe responsables de l'infection : c'est une infection polybactérienne, dite mixte car le pouvoir pathogène de chaque espèce prise isolément est faible. Une coopération entre les bactéries est nécessaire pour qu'elles puissent chacune exprimer leur pouvoir pathogène. Il faut donc prendre en considération plusieurs facteurs pour déterminer si une bactérie a un potentiel pathogène : les facteurs de virulence qu'elle possède, les interactions avec les autres bactéries, et les interactions avec l'hôte.

L'écosystème parodontal est constitué par l'ensemble des organismes dans un environnement spécifique, et par les éléments non microbiens qui l'entourent. Il inclut aussi les associations entre les microorganismes et les constituants organiques et inorganiques caractérisant ce site particulier. Pour résumer, l'écosystème parodontal comprend :

- L'habitat : c'est le sulcus, qu'il soit sain ou pathologique (poche parodontale).
- Le milieu abiotique : il s'agit des éléments histologiques, physiques, biochimiques et immunologique de l'hôte présents dans le sulcus.
- La communauté biotique : ce sont les bactéries du biofilm sous gingival.
- La dynamique écologique : ce sont les relations entre la communauté biotique et l'hôte d'une part, et les relations des bactéries entre elles d'autre part.

Les scientifiques qui étudient cet écosystème étudient donc les effets des microorganismes sur leur environnement et l'influence de l'habitat sur ceux-ci. Ici, on se limitera à l'étude de la communauté biotique et aux relations des bactéries entre elles.

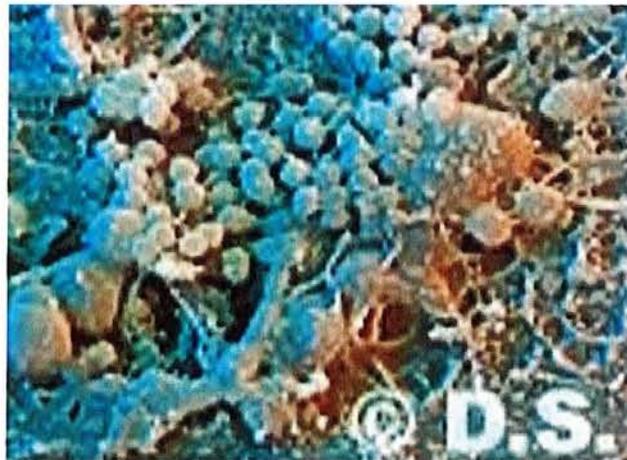


Figure 1: la plaque dentaire (www.scharfphoto.com).

1.1. Les interactions bactériennes.

Les interactions bactériennes peuvent être positives ou négatives. Le mutualisme, le commensalisme et le synergisme sont des interactions positives. La compétition et l'antagonisme sont des interactions négatives.

Le mutualisme est une relation de symbiose dont les deux espèces profitent. Il y a synergisme si le profit des deux espèces conjointes est supérieur à la somme des profits de chaque espèce prise séparément.

Il y a commensalisme quand seule une espèce profite de l'association, sans qu'il y ait bénéfice ou préjudice pour la seconde. Une synergie de virulence a été montrée sur un modèle expérimental chez la souris entre *P.gingivalis* et *T.denticola* (Kesavalu L, Holt LC et al, 1988). Une étude réalisée sur un modèle animal d'infection mixte a aussi montré une synergie entre *P.gingivalis* et *F.nucleatum*. Leur potentiel pathogénique était de loin supérieur au potentiel de chacune, et pouvait provoquer la destruction des tissus mous (Feuille F, Ebersole JL et al, 1997).

La compétition se produit lorsque deux espèces ne peuvent pas occuper la même niche écologique selon le principe d'exclusion compétitive. L'organisme le plus apte à utiliser les ressources de l'habitat fini par dominer jusqu'à le faire disparaître complètement.

Il y a antagonisme quand une espèce sécrète des substances inhibitrices pour l'autre ou des substances qui altèrent le milieu, défavorisant le développement de l'autre. *P.gingivalis* a l'une des capacités inhibitrices les plus étendue, contre des bactéries gram négatives comme *P.intermedia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella loescheii* et *P.melaninogenica*, et contre des bactéries à gram positif comme *Streptococcus mutans*, *S.mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Corynebacterium matruchotii*, *Corynebacterium parvum*, et *Propionibacterium acnes*. De même, des espèces telles que *Staphylococcus aureus*, *S.mutans*, *P.melaninogenica*, *P.intermedia*, *A.actinomycetemcomitans*, et *F.nucleatum*, sont capables de modifier la croissance de *P.gingivalis* par des mécanismes inconnus à l'heure actuelle (Nakamura T, Fujimura S et al, 1981). Des études d'isolement et de culture ont aussi montré l'existence d'un lien entre la présence de *S.sanguis* et l'absence de *A.actinomycetemcomitans*. Cela serait dû à la production de peroxyde d'hydrogène par *S.sanguis* en quantité suffisante pour que la catalase de *A.actinomycetemcomitans* soit inactive (Shivers M, Hillman JD et al, 1987).

Enfin, il existe un antagonisme entre *S.mutans* et *A.actinomycetemcomitans*. Cette dernière est retrouvée en grande quantité chez les sujets atteints de parodontite juvénile, et en faible quantité chez les sujets sains. On a pu établir un lien entre sa présence dans les lésions parodontales et une faible présence de *S.mutans* (Hillman JD, Socransky SS et al, 1985). Cet antagonisme serait dû à une bactériocine, l'actinobacilline, produite par *A.actinomycetemcomitans* (Stevens RH, Lilard SE et al, 1987).

1.2. Les complexes bactériens au sein de la plaque dentaire.

Pour désigner les bactéries responsables de la parodontite, on peut s'appuyer sur les postulats de Koch, modifiés dans ce cas par Socransky (Slots J and Taubman Me, 1992). En effet, les postulats de Koch ont été définis pour des infections « monobactériennes », alors que la parodontite est causée par plusieurs bactéries évoluant elles-mêmes au sein d'un écosystème complexe : la plaque dentaire. Parmi ces postulats, on peut retenir les critères suivant pour définir un microorganisme comme parodontopathogène :

- Le microorganisme doit être présent en proportion plus élevée dans les sites malades actifs que dans les sites malades inactifs.
- L'élimination du microorganisme doit arrêter la progression de la maladie.
- Le microorganisme doit posséder des facteurs de virulence pertinents par rapport à la physiopathologie de la maladie.
- Le microorganisme doit provoquer une réponse immunitaire humorale ou cellulaire de la part de l'hôte.
- Les tests sur les modèles animaux doivent confirmer son potentiel pathogène.

A partir de ces données, le *World Workshop on Clinical Periodontics*, en 1996, a décidé de limiter ses résultats à trois microorganismes considérés actuellement comme les trois principaux parodontopathogènes. Il s'agit de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* (à l'époque *Bacteroides forsythus*) et *Porphyromonas gingivalis* (Offenbacher S and Zambon JJ, 1996).

Toutefois, il faut toujours considérer la parodontite comme une infection polybactérienne, étant données les nouvelles connaissances concernant les complexes bactériens.

En effet, des études s'appuyant sur les connaissances acquises depuis 20 ans, mais aussi sur la technique des sondes ADN et l'interprétation statistique des résultats ont montré l'association en complexes de certaines espèces bactériennes et l'association de certains complexes avec l'état pathologique (Haffajee AD, Socransky SS et al, 1999; Socransky SS, Haffajee AD et al, 1998). Les résultats de ces études allaient dans le sens des résultats

d'études de coagrégation *in vitro* (Kolenbrander PE, Ganeshkumar N et al, 1993; Kolenbrander PE and London J, 1993). L'origine de cette approche est la supposition que doivent s'effectuer des associations bactériennes spécifiques dans le biofilm, puisque c'est un phénomène courant dans d'autres écosystèmes naturels. La notion de complexe bactérien repose sur l'observation suivante : quand on détecte une bactérie, on peut détecter aussi très probablement d'autres bactéries du même complexe. Cette notion a été testée avec des données provenant de plus de 13000 échantillons de plaque sous gingivale provenant de 185 sujets à différents stades de santé ou de pathologie parodontale (Socransky SS, Haffajee AD, 1998).

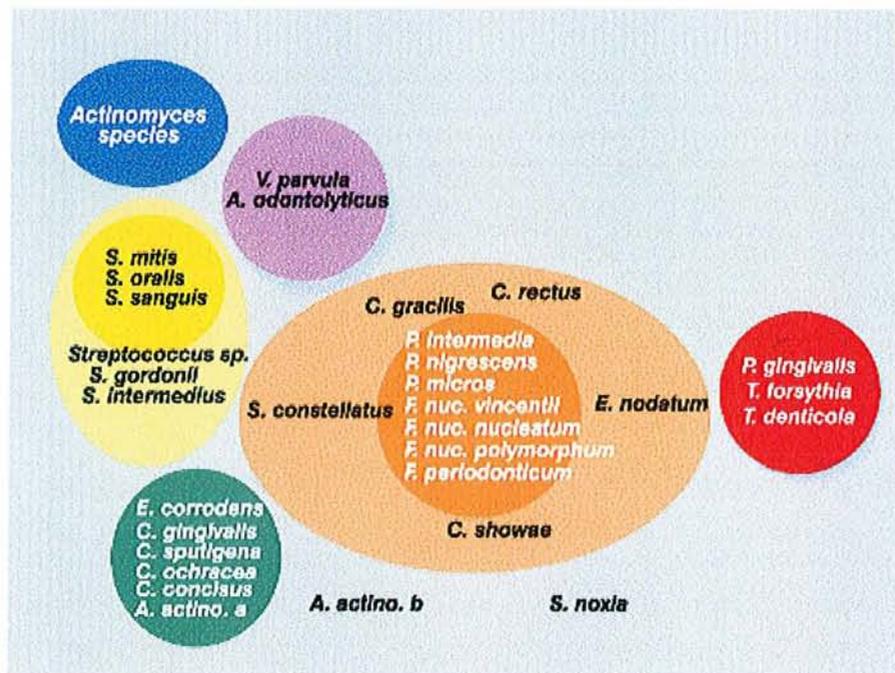


Figure 2 : Les complexes bactériens de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

Tableau 1 : Détails des complexes bactériens de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

Genre et espèce	Appartenance au complexe de Socransky et al.
<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Veillonella parvula</i>	Pourpre
<i>Streptococcus</i> : - <i>S. gordonii</i> - <i>S. intermedius</i> - <i>S. mitis</i> - <i>S. oralis</i> - <i>S. sanguis</i>	Jaune
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sérotype a <i>Camphylobacter concisus</i> <i>Capnocytophaga</i> : - <i>C. gingivalis</i> - <i>C. ochracea</i> - <i>C. sputigena</i> <i>Eikenella corrodens</i>	Vert
<i>Camphylobacter</i> : - <i>C. gracilis</i> - <i>C. rectus</i> - <i>C. showae</i> <i>Eubacterium nodatum</i> <i>Fusobacterium</i> : - <i>F. nucleatum</i> se <i>nucleatum</i> - <i>F. nucleatum</i> se <i>polymorphum</i> - <i>F. nucleatum</i> se <i>vincentii</i> - <i>F. periodonticum</i> <i>Micromonas micros</i> (<i>Peptostreptococcus micros</i>) <i>Prevotella</i> : - <i>P. intermedia</i> - <i>P. nigrescens</i> <i>Streptococcus constellatus</i>	Orange
<i>Bacteroides forsythus</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Treponema denticola</i>	Rouge
<i>Actinomyces</i> : <i>A. gerencseriae</i> <i>A. israelii</i> <i>A. naeslundii</i> espèce génomique 1 <i>A. naeslundii</i> espèce génomique 2	Espèces d'Actinomyces
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> sérotype b <i>Selenomonas noxia</i> <i>P. melaninogenica</i>	Non groupables

Mais les complexes ont aussi des relations entre eux. Les espèces du complexe rouge sont toujours en association avec celles du complexe orange, alors que *A. naeslundii* et les complexes jaune et vert sont plutôt associés entre eux qu'avec les complexes orange et rouge. Il existerait un « tronc commun » de bactéries entre les sites sains et les sites atteints ; il serait constitué de bactéries appartenant aux divers complexes : des représentants des genres *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, et *Veillonella*.

Dans un écosystème en développement, certaines espèces dites « pionnières » colonisent l'habitat en premier. Ces espèces sont souvent remplacées par d'autres après avoir modifié l'habitat, le rendant ainsi favorable aux espèces suivantes. Il y a deux types de succession. Il y a succession autogénique quand la population résidente altère son environnement de telle façon qu'elle soit remplacée par d'autres espèces mieux adaptées à ce nouvel environnement. Il y a succession allogénique quand une communauté remplace une autre du fait de la modification de l'habitat par des facteurs non microbiens, comme des changements des propriétés chimiques ou physiques du milieu (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

Il y a succession microbienne dans la gingivite. Des études ont montré que lors du développement de la gingivite, il y a colonisation initiale par des cocci et des bâtonnets à gram positif, puis par des cocci et bâtonnets à gram négatif, puis par des fusobactéries et des filaments, et enfin par des spirilles et des spirochètes. L'apparition des symptômes était corrélée à l'apparition des formes à gram négatif (Loe H, Theilade E et al, 1965; Theilade E, Wright WH et al, 1966). Socransky et al ont établi un schéma de succession bactérienne utilisant les complexes bactériens de la plaque.

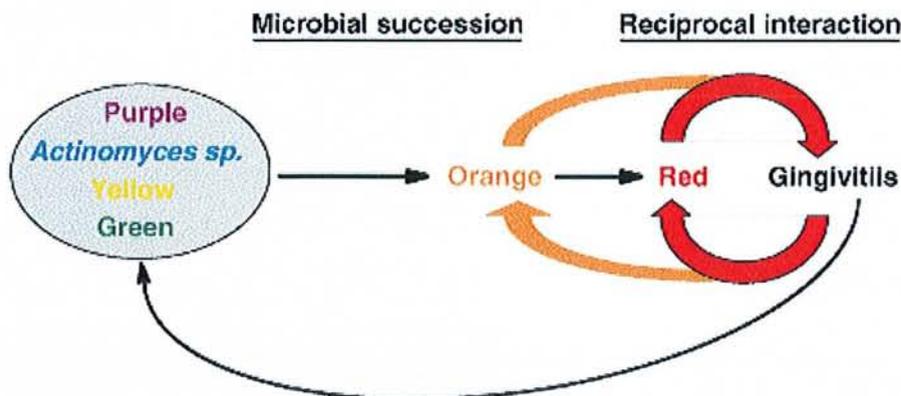


Figure 3 : Succession des complexes bactériens au sein de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

On voit que les complexes se succèdent, puis qu'une fois l'état de gingivite atteint, la présence des complexes orange et rouge « auto stimulent » leur propre croissance. Cette succession d'espèces est une succession autogénique. Au contraire, l'élimination de la plaque qui entraîne une succession des espèces « à l'envers » avec retour à la présence des complexes pourpre, jaune et vert, est une succession allogénique. Il y a en effet diminution de l'état de gingivite, donc modification de l'habitat, ce qui arrête « l'auto stimulation » des complexes orange et rouge (Socransky SS and Haffajee AD, 2005). Les espèces des différents complexes semblent être localisées dans différentes régions de la poche parodontale ou du sulcus, d'après des études par immunocytochimie (Kigure T, Saito A et al, 1995; Noiri Y and Ebisu S, 2000; Noiri Y, Ozaki K et al, 1997).

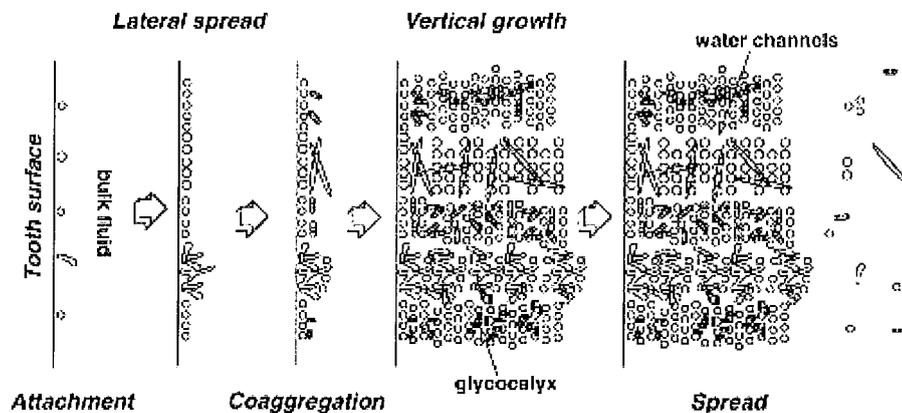


Figure 4 : Formation de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

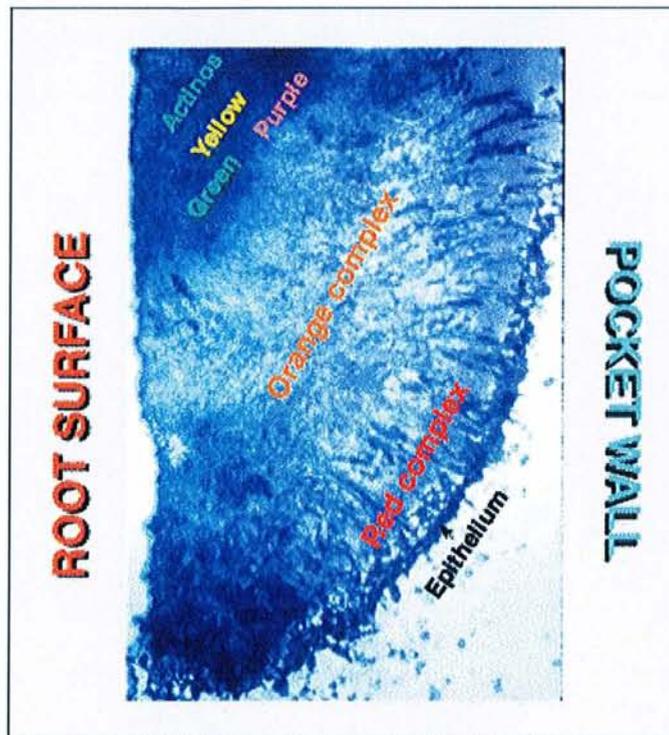


Figure 5 : Localisation des complexes bactériens au sein de la plaque sous gingivale (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

Les proportions entre les espèces de la plaque sus et sous gingivale ne sont pas significativement différentes chez les sujets sains. Il y a une proportion plus grande d'*Actinomyces* et de *S.sanguis* dans les sites sus gingivaux, alors que les espèces du complexe orange sont en plus grande proportion dans les sites sous gingivaux (Socransky SS and Haffajee AD, 2005). Par contre, chez les sujets atteints de parodontite, il y a une nette augmentation en proportion des espèces des complexes orange et rouge dans la plaque sous gingivale. Cela a été confirmé par de nombreuses études employant la PCR pour examiner la fréquence de détection à l'état sain ou lors d'une parodontite (Ashimoto A, Chen C et al, 1996; Choi BK, Park SH et al, 2000; Griffen AL, Becker MR et al, 1998; Klein MI and Gonclaves RB, 2003; Kumar PS, Griffen AL et al, 2003; Leys EJ, Lyons SR et al, 2002; Mayanagi G, Sato T et al, 2004; Takeuchi Y, Umeda M et al, 2001), la real time PCR (Kawada M, Yoshida A et al, 2004; Lyons SR, Griffen AL et al, 2000), la culture (Haffajee AD and Socransky SS, 1994), les sondes ADN (Albandar JM, Brown LJ et al, 1997), et des techniques utilisant des anticorps (Chaves ES, Jeffcoat MK et al, 2000; Di Murro C, Paolantonio M et al, 1997; Gmur R and Thurnheer T, 2002; Simonson LG, Goodman CH et al, 1990; Yang HW, Huang YF et al, 2004). Il existe aussi une différence marquée entre la flore des sites sains des sujets sains, et celle des sites « sains » des sujets atteints de

parodontite chronique pour quasiment toutes les espèces. Pour les sujets atteints, les sites considérés malades étaient les poches parodontales de profondeur supérieure à 6mm saignant au sondage et les sites considérés sains étaient des poches de moins de 4mm de profondeur qui ne saignaient pas au sondage. On constatait en particulier une plus grande proportion de bactéries des complexes orange et rouge dans la plaque sous gingivale des sites sains des sujets malades que dans celle des sites sains des sujets sains (Socransky SS and Haffajee AD, 2005). Riviere et al avaient déjà démontré précédemment une plus grande fréquence de détection de *P.gingivalis* (complexe rouge) et de spirochètes dans les sites sains de sujets malades par rapport aux sites sains de sujets sains (Riviere GR, Smith KS et al, 1996).

La plupart des bactéries des complexes vert, jaune, et pourpre, seraient compatibles avec la santé parodontale, et seraient même protectrices. Les espèces des complexes jaune et pourpre sont des espèces pionnières ou colonisatrices précoces.

Au contraire, les complexes orange et rouge sont associés à la pathologie, qu'il s'agisse de gingivite ou de parodontite. Les espèces du complexe orange précèdent et permettent la colonisation du sulcus par les espèces du complexe rouge.

Il faut aussi noter la tendance des bactéries du biofilm à former des communautés « abouties » (climax communities). Les interactions entre les facteurs microbiens et non microbiens d'un écosystème engendrent un état de stabilisation dans lequel les composants microbiens et non microbiens coexistent en harmonie et en équilibre avec leur environnement. Il s'agit alors d'une communauté « aboutie ». Cet « aboutissement » est une entité qui a tendance à se reproduire elle-même avec une remarquable fidélité. Cet « aboutissement » peut être modifié par des forces exogènes mais a tendance à retourner à son état d'origine, de même donc que l'habitat. Il est possible que les traitements préventifs et thérapeutiques soient contrariés par cette tendance de l'écosystème et donc de l'habitat à revenir à son état d'origine. Cependant, il convient de définir précisément la flore compatible avec la santé parodontale ou protectrice avant de vouloir modifier durablement l'équilibre en place. On pourrait sinon obtenir une modification vers un équilibre tout aussi, voire plus défavorable (Socransky SS and Haffajee AD, 2005). De même, on ne sait pas encore si le passage de l'état sain à la pathologie, qui entraîne l'apparition d'un nouvel équilibre microbien (pathologique), est initié par un changement de la flore bactérienne, ou un changement de l'hôte.

I.3. Les principales bactéries parodontopathogènes.

I.3.1. Actinobacillus actinomycetemcomitans.

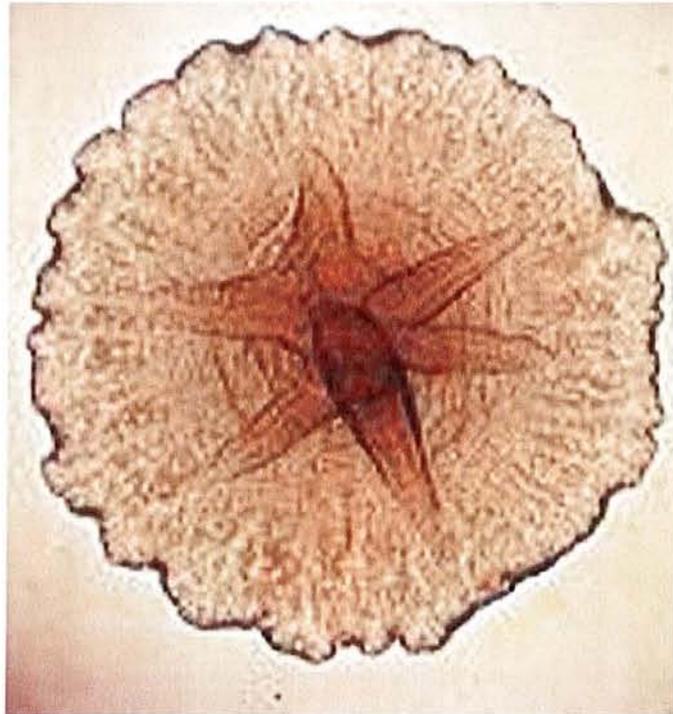


Figure 6 : Une colonie d'*A.actinomycetemcomitans* sur un milieu de culture (www.dgk.org).

A.actinomycetemcomitans est une bactérie à morphologie en bâtonnet court, ou bacillaire. Le terme « actinobacillus » fait référence d'une part à cette morphologie, et d'autre part à la forme en étoile visible de ces bactéries quand elles sont mises en culture sur boîte de Petri. Elle est non mobile, à gram négatif, saccharolytique et capnophile (Haffajee AD and Socransky SS, 1994). Elle connue pour être le parodontopathogène majeur dans la parodontite agressive localisée, mais on la retrouve aussi dans les lésions de certaines parodontopathies de l'adulte. Elle peut enfin être l'agent causal d'infections extra buccales comme l'endocardite, la péricardite, la méningite, l'ostéomyélite et les abcès sous-cutanés.

1.3.1.1. *Epidémiologie.*

Son rôle a été très vite mis en évidence dans la parodontite agressive localisée, ou anciennement, parodontite juvénile localisée (Slots J, Reynolds HS et al, 1980). Elle est mise en évidence chez 75 à 100% des sujets atteints (Slots J and Ting M, 1999; Zambon J, Christersson LA et al, 1983). Sa prévalence peut varier, mais augmente de façon caractéristique chez les sujets malades. Selon une étude, 0 à 26% d'enfants sains étaient porteurs de *A.actinomycetemcomitans* en sous-gingival, alors que 40 à 100% des sites sous gingivaux chez des patients ayant une parodontite agressive contenaient cette même bactérie (Slots J and Ting M, 1999). Dans une autre étude, cette bactérie a même été détectée avant la maladie sur des sites qui ont ensuite subi une perte d'attache supérieure à 2mm en trois mois. La proportion de la bactérie au sein de la flore augmentait moins de un an avant l'apparition des symptômes (Bogert M, Berthold P et al, 1989). Plus les poches sont profondes, plus il y a de chances de retrouver *A.actinomycetemcomitans* dans la flore sous gingivale. Il y a aussi quatre fois plus de chances de la retrouver dans les défauts infra osseux que dans les défauts supra osseux (Van der Weijden G, Timmerman M et al, 1994). Il a aussi été démontré que les patients atteints de parodontite agressive ont un taux élevé d'anticorps contre cette bactérie (Altman LC, Page RC et al, 1982) et qu'il y a une synthèse locale de ces anticorps (Ebersole JL, Taubman MA et al, 1985; Smith DJ, Gadalla LM et al, 1985). Après un traitement réussi, on constate une baisse du nombre de *A.actinomycetemcomitans*. Parallèlement, les échecs de traitements sont associés à un niveau de bactéries toujours élevé dans les sites traités (Kornman KS and Robertson PB, 1985; Mandell RL, Tripodi LS et al, 1986).

Elle est aussi fréquemment présente chez les sujets sains, mais avec une distribution très variable selon les régions du globe. Sa prévalence chez les sujets jeunes est de 13% en Finlande, 20-25% aux Etats-Unis, de 60% à Panama chez des adolescents d'origine africaine, et de 78% chez des enfants vietnamiens (Slots J, 1999; Slots J and Schonfeld S, 1991). Il est donc vraisemblable que des facteurs ethniques influent sur l'épidémiologie de *A.actinomycetemcomitans*. De même les facteurs ethniques influeraient sur le risque de développer une parodontite agressive localisée. Selon une étude réalisée sur différents types de population à Los Angeles, la relation entre la présence de *A.actinomycetemcomitans* et parodontite est 12 fois plus forte chez les patients d'origine hispanique et 7 fois plus forte chez les patients d'origine asiatique, par rapport aux patients d'origine caucasienne (Umeda M, Tominaga Y et al, 1996).

A.actinomycetemcomitans semble avoir un rôle important dans le caractère réfractaire des parodontites, peut-être parce que cette bactérie est capable d'envahir les tissus parodontaux, échappant ainsi aux efforts des praticiens et des patients (Slots J, 1999). Dans une étude, 40 patients ayant une parodontite réfractaire au traitement et 50 ayant une parodontite sévère généralisée, tous présentant des prélèvements positifs pour *A.actinomycetemcomitans*, ont été traités. Le traitement consistait en un débridement mécanique et l'administration systématique d'amoxicilline et de métronidazole pendant sept jours. Seulement un patient sur les quatre-vingt dix était positif pour cette bactérie trois à neuf mois après le traitement. Il y avait eu un gain d'attache significatif et une diminution de la profondeur des poches chez presque tous les patients (van Winkelhoff AJ, Tijnhof CJ et al, 1992).

Cette bactérie a aussi été impliquée dans certains cas de parodontite chronique de l'adulte (Papapanou PN, Baelum V et al, 1997; Rodenburg JP, van Winkelhoff AJ et al, 1990). Les données les plus convaincantes quant au rôle de *A.actinomycetemcomitans* dans la parodontite chronique concernent les réponses immunitaires des patients ayant une parodontite chronique réfractaire. Des examens réalisés au Forsyth Dental Center à différentes périodes sur des patients ayant une parodontite chronique réfractaire ont montré que trente-six adultes sur cinquante-six avaient un taux élevé d'anticorps sériques contre cette bactérie. Parallèlement, les taux d'anticorps contre d'autres bactéries étaient généralement beaucoup plus faibles (Haffajee AD and Socransky SS, 1994).

La distribution des souches virulentes et non virulentes varie selon les régions du globe. Il a été observé que chez 62% des chinois atteints de parodontites à progression peu rapide, 63% des souches étaient du sérotype c, peu virulent. Il n'y avait pas de sérotype b, la souche la plus virulente (Mombelli A, Gmür R et al, 1998). Il semble aussi que les clones les plus producteurs de leucotoxine soient prédominants chez les sujets d'origine africaine alors qu'ils sont absents en Europe du Nord (Haubek D, Poulsen K et al, 1995; Haubek D, Poulsen K et al, 1996).

Le seul habitat connu de *A.actinomycetemcomitans* est la cavité buccale. Elle y colonise préférentiellement les muqueuses, le dos de la langue, la salive, et les poches parodontales. La cavité buccale étant le seul réservoir de cette bactérie, il semble qu'elle se transmette d'une bouche à l'autre. Cela a été vérifié par plusieurs études. Quand un enfant est positif pour cette bactérie, une souche similaire est toujours retrouvée chez un des parents. Et

quand un parent atteint de parodontite est positif pour *A.actinomycescomitans*, une souche similaire est retrouvée chez l'enfant dans 32% des cas (Asikainen S, Chen C et al, 1996). Il est aussi admis que la présence de *A.actinomycescomitans* dans la cavité buccale indique un déséquilibre de l'écosystème et un risque de perte d'attache (Asikainen S and Chen C, 1999).

I.3.1.2. Caractéristiques.

La structure cellulaire de *A.actinomycescomitans* est caractéristique d'une bactérie à gram négatif. Elle comprend une membrane externe recouverte d'une micro capsule de nature glucidique, un espace péri plasmique, et une membrane cytoplasmique.

Sa croissance est difficile dans l'air mais forte dans un air enrichi de 5 à 10% de gaz carbonique et sous des conditions anaérobies. Cette bactérie est capnophile et n'est pas anaérobie stricte.

Quand elle est cultivée sur boîte de Pétri, elle forme des colonies de 0,5 à 1mm de diamètre très adhérentes à la gélose, circulaires, convexes et translucides, au sein desquelles est visible une structure en étoile.

Les caractères permettant son identification sont : la présence d'une catalase, l'absence d'oxydase, d'uréase, et de production d'indole.

Cinq sérotypes différents d'*A.actinomycescomitans* ont pu être mis en évidence : les sérotypes a, b, c, d, et e. Les sérotypes a et b sont les plus communs dans la cavité buccale, alors que le sérotype c n'est mis en évidence que dans 10% des prélèvements. Les antigènes qui définissent les sérotypes permettent la détection de la bactérie par immunofluorescence. Le sérotype b, considéré comme le plus virulent est fréquemment retrouvé chez les sujets atteints de parodontite agressive, alors que le sérotype a est associé à la parodontite chronique (Asikainen S, Chen C et al, 1995; DiRienzo JM, Slots J et al, 1994).

I.3.1.3. Facteurs de virulence.

A.actinomycetemcomitans possède plusieurs facteurs de virulence qui en font une bactérie à fort potentiel pathogène.

Ses facteurs de virulence reconnus sont : une leucotoxine, une cytotoxine, le lipopolysaccharide et un antigène de la capsule polysaccharidique (CPA : *Capsular Polysaccharide Antigen*). Une collagénase a aussi été décrite.

La leucotoxine est une protéine de 115 kD appartenant à la famille des toxines RTX (*Repeats-in-ToXin*). Baheni et al ont été les premiers à montrer sa cytotoxicité pour les polymorphonucléaires neutrophiles (Baehni P, Tsai CC et al, 1979). Elle a des séquences similaires à l' α -hémolysine d'*Escherichia coli*, la cytolysine de *Pasteurella haemolytica* et la leucotoxine d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (Lally ET, Golub EE et al, 1989). Elle agit en formant des pores dans la membrane des polymorphonucléaires neutrophiles (PMN), des monocytes, et de certaines sous populations de lymphocytes. Son tropisme pour les cellules de la lignée myéloïde est dû à une interaction avec la β 2-intégrine LFA-1 (*Lymphocyte Function Associated molecule*) se trouvant à la surface des cellules cibles. Cette toxine est dépendante de l'environnement de la bactérie, notamment de la présence ou l'absence de fer (Spitznagel J, Kraig E et al, 1991). Les bactéries du sérotype b produisent de grandes quantités de leucotoxine, de même que la variété RFLP groupe II (Haubek D, Dirienzo JM et al, 1996). Il est probable que la capacité de cette leucotoxine à détruire les PMN assurant la première ligne de défense assure à cette bactérie une protection contre la phagocytose et donc contre la bactéricidie. La libération des granules des PMN entraînerait la destruction des tissus. Une étude a montré que la protection d'une souche hyper productrice de leucotoxine est obtenue avec un rapport de 25 bactéries par PMN. Un nombre inférieur de bactéries ou des souches peu leucotoxiques permettent une phagocytose efficace (Johansson A, Sandström G et al, 2000). Il a aussi été démontré que des protéines produites par *A.actinomycetemcomitans*, en particulier la leucotoxine, entraîne aussi l'apoptose des cellules de l'hôte. L'apoptose, quand elle est bien régulée, est un phénomène normal de l'homéostasie tissulaire. La nécrose entraîne la libération de granules détruisant les tissus mais aussi la libération d'enzymes antibactériennes : les défensines. Ces enzymes peuvent tuer la bactérie et attirer des cellules de la réaction inflammatoire. Comme *A.actinomycetemcomitans* pénètre dans les cellules épithéliales de l'hôte, il bénéficie de cette induction de l'apoptose au lieu de la nécrose car il

échappe aux défensines et n'est pas détecté par les cellules immunitaires (Korostoff J, Wang JF et al, 1998; Meyer DH, Sreenivasan PK et al, 1991).

Une cytotoxine de 50 kD produite par *A.actinomycetemcomitans* est capable de bloquer la synthèse de l'ADN chez les fibroblastes, inhibant ainsi leur prolifération (Helgeland K and Nordby O, 1993).

Les lipopolysaccharides (LPS) et l'antigène de la capsule polysaccharidique (CPA) sont des médiateurs puissants de la résorption osseuse. Le LPS a le pouvoir de moduler la réaction immunitaire en stimulant le relargage par les macrophages d'IL-1 β et de TNF α . Ces cytokines ont un effet pro inflammatoire et participent à la résorption osseuse (Fives-Taylor P, Hutchins Meyer D et al, 1999; Kiley P and Host SC, 1980; Saglie FR, Simon K et al, 1990). Il faut aussi remarquer que le *A.actinomycetemcomitans* de sérotype b produit une LPS différente de celle des autres sérotypes. En effet, l'antigène O du LPS diffère par rapport à celui des autres sérotypes. Chez la souris, le CPA du sérotype b provoque la formation d'ostéoclastes par production d'IL-1 β , et son action antiproliférative sur les ostéoblastes entraîne la mort de ceux-ci par apoptose (Yamamoto S, Mogi M et al, 1999).

A.actinomycetemcomitans libère des vésicules qui résultent d'excroissances de la membrane externe. Ces vésicules qui contiennent des facteurs de virulence solubles (leucotoxine, cytotoxine) en plus de leurs composants intrinsèques (LPS, adhésines, antigènes) sont des véhicules privilégiés des facteurs de virulence et doivent donc être considérés comme des facteurs pathogènes à part entière.

Le dernier facteur de virulence que l'on peut citer est la capacité de cette bactérie à envahir les tissus gingivaux (Christersson LA, Albini B et al, 1998). Un épithélium de cellules humaines de carcinome épidermoïde peut être pénétré à partir du contact de cette bactérie avec les microvillosités cellulaires. Une fois à l'intérieur, elle peut se déplacer par l'intermédiaire des microtubules de la cellule hôte.

I.3.2. *Porphyromonas gingivalis*.

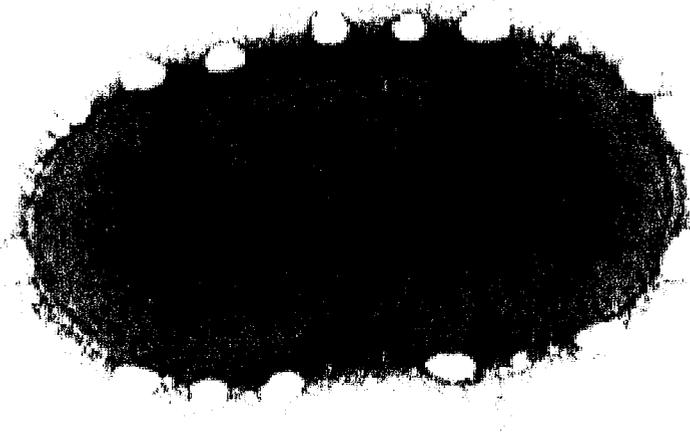


Figure 7 : Une bactérie de l'espèce *Porphyromonas gingivalis* vue à fort grossissement (www.microbewiki.kenyon.edu).

Cette bactérie fait partie du groupe des *Bacteroides* à pigmentation noire. Les microorganismes de ce groupe forment des colonies noires à brunes sur des milieux composés de sang et d'agar, et ont été au départ classés dans une même espèce : *Bacteroides melaninogenicum* (Haffajee AD and Socransky SS, 1994). Les *bacteroides* à pigmentation noire sont depuis longtemps associées à la parodontite, depuis les premières études de Burdon (Burdon KL, 1928). L'intérêt porté à *P.gingivalis* ainsi qu'aux autres *bacteroides* à pigmentation noire, a été dû au départ, à leur rôle dans certaines infections mixtes expérimentales (Macdonald JB, Socransky SS et al, 1963) et à leur production de nombreux facteurs de virulence.

1.3.2.1. *Epidémiologie.*

Des études ont montré que *P.gingivalis* est une espèce bactérienne prédominante en prévalence comme en nombre dans les lésions des parodontites de l'adulte, alors qu'elle est peu ou pas présente chez des sujets sains ou ayant une gingivite (Choi I, Nakagawa S et al, 1990; Slots J, 1999). Aux Etats-Unis, les patients d'origine hispanique et africaine ont respectivement 6,5 et 3 fois plus de chances d'être positifs pour *P.gingivalis* que les patients de race blanche (Umeda M, Chen C et al, 1998). De grandes variations de prévalence sont aussi observées chez les enfants en fonction de leur origine ethnique. Mais on ne peut pas établir une corrélation liant une prévalence augmentée de *P.gingivalis* à une augmentation du nombre de parodontites. Il est possible que la présence de *P.gingivalis* dans les poches parodontales soit liée à la présence de cytomégalovirus ou du virus d'Epstein Barr de type 1, qui affaibliraient les défenses immunitaires du parodonte (Contreras A, Umeda M et al, 1999; Contreras A, Zadeh HH et al, 1999).

Cette espèce est considérablement réduite dans les sites traités avec succès, alors qu'on la rencontre fréquemment dans les sites réfractaires après traitement (Bragd L, Dahlén G et al, 1987; Haffajee AD, Dzink JL et al, 1988). D'après une étude, le taux de *P.gingivalis* augmente avec l'aggravation de la pathologie, et est également augmenté sur les sites où la pathologie est active par rapport aux sites stables (Papapanou PN, Baelum V, 1997). Chaves et al ont essayé de corréliser la progression de la pathologie avec les microorganismes présents. Dans cette étude, *P.gingivalis* a été couramment retrouvé dans la plaque des patients présentant une perte osseuse progressive (Chaves ES, Jeffcoat MK, 2000). *P.gingivalis* pourrait aussi avoir un rôle dans les parodontites chroniques réfractaires, car on retrouve souvent ce microorganisme dans les sites toujours actifs après traitement d'une parodontite chronique (Shiloah J, Patters MR et al, 1998).

P.gingivalis est détecté dans de faibles proportions dans les lésions des parodontites agressives localisées, même quand la maladie évolue. Des exceptions ont toutefois été constatées au Chili et en Jamaïque. Par contre, c'est une espèce dominante dans les parodontites agressives généralisées (Slots J, 1999). On la retrouve aussi sur la langue, les amygdales, la muqueuse buccale, les gencives, et dans la salive des patients atteints de parodontite (Loos B, Dyer D et al, 1993).

Il a aussi été montré que *P.gingivalis* induit des réactions immunitaires systémiques et locales élevées chez les sujets atteints de parodontite (Mahanonda R, Seymour GJ et al, 1991). Des études animales réalisées sur des singes et des rats gnotobiotiques ont montré que l'immunisation contre les microorganismes entiers ou des antigènes spécifiques affecte la progression des lésions parodontales. Dans la plupart des cas cependant, la progression est simplement diminuée (Evans RT, Klausen B et al, 1992; Persson R, Weinberg A et al, 1993).

I.3.2.2.

Caractéristiques.



Figure 8 : Des colonies de *Porphyromonas gingivalis* (www.alunos.crb.ucp.pt).

Il s'agit d'une bactérie en bâtonnet à gram négatif de dimension 0,5 sur 1,2 μm , anaérobie stricte, non motile, et assaccharolytique. Sur une gélose au sang enrichie en hémine et en vitamine K, elle forme des colonies marron foncées à noir qui ne sont pas fluorescentes sous la lumière ultraviolette. Au laboratoire, l'identification définitive est obtenue d'après les caractéristiques suivantes : l'absence de fermentation des sucres, l'agglutination des érythrocytes, l'absence de production de catalase, la présence d'une enzyme pseudo-trypsine, la présence d'une N-acétyl-bD-glucosaminidase, et la production d'acide phénylacétique.

Il existe une grande diversité au sein de l'espèce. Six sérotypes correspondant à des antigènes de la capsule ont été identifiés, ainsi que cinq sérotypes selon les fimbriae et de nombreux types clonaux (Laine ML, Appelmelk BJ et al, 1997; Lee JY, Sojar HT et al, 1991; Ménard C and Mouton C, 1995).

P.gingivalis a un potentiel pathogène qui ne s'exprime qu'en synergie avec d'autres bactéries. Des études d'infection expérimentale chez l'animal ont montré que *P.gingivalis* était le composant bactérien indispensable pour qu'une lésion apparaisse suite à l'injection d'une combinaison de bactéries à potentiel parodontopathogène. Mais aucune espèce injectée seule, y compris *P.gingivalis* ne provoquait de lésion (Mayrand D and Holt SC, 1988).

Les facteurs de virulence de *P.gingivalis* sont : les adhésines, le LPS, les enzymes, en particuliers protéolytiques, et les vésicules.

Les adhésines

La surface de cette bactérie est recouverte de fimbriae, qui sont des filaments fins et longs d'un diamètre de 3 à 5 nm et d'une longueur allant jusqu'à 25 nm. Ils sont constitués par la juxtaposition d'une même protéine, la fimbrilline. Celle-ci est sous le contrôle d'un seul gène nommé *fimA*. Les fimbriae permettent d'établir un pont entre la bactérie et la surface à coloniser, et d'établir un contact même si elle est à distance de cette surface. La fimbrilline elle-même joue le rôle d'adhésine et permet la fixation de *P.gingivalis* à l'hydroxyapatite couverte de salive. D'autres adhésines qui n'appartiennent pas aux fimbriae, surtout des cystéines protéinases spécifiques de l'arginine, seraient responsables de l'adhésion de *P.gingivalis* aux fibroblastes, au collagène, et à la fibronectine. Enfin, l'hémagglutinine, en conjonction avec les fimbriae, permettrait son adhésion aux cellules épithéliales (Mouton C and Chandad F, 1993).

L'adhésion de *P.gingivalis* aux cellules épithéliales est dépendante de plusieurs facteurs (environnementaux, souches et lignées épithéliales). Mais il existe un plateau de saturation d'adhérence aux cellules épithéliales qui témoigne que celles-ci possèdent un nombre limité de sites récepteurs à *P.gingivalis* (Huart-Delcourt A, Ménard C et al, 1998). Les déterminants génétiques et fonctionnels de l'adhésion, de la protéolyse, de l'hémagglutination, et de la fimbriation sont étroitement liés chez *P.gingivalis* (Lamont RJ and Jenkinson HF, 1998). Des mutants de *P.gingivalis* déficients en fimbriae n'adhèrent presque pas aux cellules eucaryotes (Weinberg A, Belton CM et al, 1997). Les fimbriae de *P.gingivalis* permet donc son adhérence à des récepteurs spécifiques des cellules de l'hôte, en particulier les cellules épithéliales. La fimbrilline de *P.gingivalis* possède des domaines de fixation à la fibronectine, à la lactoferrine, aux PRP (*Prolin-Rich Protein*), et à la stathérine.

Il semblerait que, ensemble, ces mécanismes d'adhésion permettent une association stable de la fimbriine avec plusieurs récepteurs de la salive, et donc permettent une adhérence à toute surface de la cavité buccale recouverte de salive (Amano A, Sharma A et al, 1996).

Le fimbriae module aussi la production de cytokines pro inflammatoires comme IL-1 β , IL-6, et TNF α ; et induit l'activation des lymphocytes T chez la souris (Isogai E, Sogal H et al, 1994; Ogawa T, Uchida H et al, 1999).

L'activité hémagglutinante de *P.gingivalis* est liée d'une part aux fimbriae, et d'autre part à des hémagglutinines distinctes des fimbriae à tout stade de la synthèse ou de l'assemblage (Chandad F and Mouton C, 1995; Du L, Pellen-Mussi P et al, 1997; Ogawa T and Hamada S, 1994). Cinq hémagglutinines ont été décrites, et sont codées par les gènes *hagA*, *hagB*, *hagC*, *hagD*, et *hagE* (Lépine G and Progulske-Fox A, 1996). Le potentiel protéolytique important de *P.gingivalis*, dont en particulier les gingipaïnes, auraient un rôle dans l'adhérence aux tissus gingivaux, grâce à la formation de complexes protéinase-adhésine (Kontani M, Ono H et al, 1996; Pike R, McGraw W et al, 1994).

La séquence d'acides aminés des fimbriae de *P.gingivalis* n'a aucune homologie avec ceux des autres bactéries. Il représenterait donc une classe unique de fimbriae (Dickinson DP, Kubinieć MA et al, 1988). Les souches mutantes avec un fimbriae déficient, comme la souche DGP-3, se lient peu aux composants salivaires et adhèrent faiblement aux surfaces dentaires et aux cellules épithéliales ; et la vaccination contre le fimbriae protège les animaux contre la parodontite (Malek RJ, Fisher JG et al, 1994). La souche DGP-3 est également incapables d'envahir les cellules épithéliales et n'induit pas de parodontite chez le rat (Sandros J, Madianos PN et al, 1996; Xie H, Cai S et al, 1997).

Dans des cultures de cellules non transformées, il a été observé la fixation, l'enrobage par des replis de la membrane cytoplasmique, puis l'internalisation de *P.gingivalis* (Lamont RJ, Chan A et al, 1995). Seulement 10% des cellules d'une souche donnée de cette bactérie seraient capable d'adhérer, et seulement 10% des cellules épithéliales seraient envahies (Duncan MJ, Nakao S et al, 1993). C'est le fimbriae qui induirait l'internalisation de la bactérie en activant et mobilisant le cytosquelette de la cellule (Ezzo PJ and Cutler CW, 2003). La pénétration de *P.gingivalis* entraîne une désorganisation de la signalisation cellulaire, basée sur des mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation des protéines. Il s'agit d'un détournement au profit de la bactérie.

Il semble que certains évènements intracellulaires le confirment (Izutsu KT, Belton CM et al, 1996) :

- L'augmentation de la concentration de calcium à l'intérieur de la cellule,
- La phosphorylation de résidus tyrosine sur une protéine de 43 kD modifie le système des cascades enzymatiques à l'origine de la stimulation de facteurs transcriptionnels du noyau cellulaire,
- La désorganisation du cytosquelette lors de l'adhésion.

P.gingivalis est capable d'envahir les cellules de l'épithélium gingival humain *in vitro* et a été trouvé en plus grande quantité dans des cellules provenant de l'épithélium de poches parodontales que dans des cellules de l'épithélium provenant de zones sus gingivales (Duncan MJ, Nakao S, 1993; Sandros J, Papapanou P et al, 1993).

Le lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide est un constituant amphipathique très important de la membrane externe des bactéries à gram négatif, qui permet leur intégrité structurale et leur activité biologique. Le lipopolysaccharide de *P.gingivalis* est unique, tant au niveau de la structure chimique du polysaccharide et des lipides A de sa partie centrale, qu'au niveau de son activité biologique, par rapport à ceux des autres bactéries à gram négatif (Ezzo PJ and Cutler CW, 2003; Ogawa T, 1994). Il a une faible teneur en heptose et en 2-kéto-3-déoxyoctonate.

Il se caractérise par un faible pouvoir endotoxique : le lipide A de *P.gingivalis* est mille fois moins actif que celui des bactéries entériques. Le lipide A stimule indirectement la réponse inflammatoire en déclenchant la production d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-8. Le lipide A participe aussi, par action sur les cellules endothéliales, au déclenchement de l'inflammation en inhibant l'expression de la E sélectine. Certaines souches de *P.gingivalis* sont capables de stimuler plus que d'autres la sécrétion de TNF α , d'IL-2, d'IL-4 et d'IL-6 par les macrophages. Il est probable que la faible action du lipide A, et surtout sa faible endotoxicité, permettent à *P.gingivalis* de passer inaperçu de l'hôte, et donc d'envahir le parodonte.

Sur le modèle animal, TRL4 est le principal récepteur transmembranaire pour le lipopolysaccharide des bactéries à gram négatif, et TRL2 permet la réponse contre les bactéries à gram négatif et les levures. Une exception à cette règle serait le lipopolysaccharide de *P.gingivalis*, qui pourrait utiliser le récepteur TRL2 (Hirschfeld M, Weis JJ et al, 2001; Jotwani R, Palucka AK et al, 2001; Pulendran B, Kumar P et al, 2001). Le déclenchement des récepteurs TRL2 des macrophages murins provoque des schémas distincts d'expression des gènes de l'inflammation, comparés à l'activation des récepteurs TRL4 (Hirschfeld M, Weis JJ, 2001). Le lipopolysaccharide de *P.gingivalis* semble donc avoir une action régulatrice de la réponse immunitaire en favorisant une réponse humorale, ce qui faciliterait sa survie *in vivo* (Ezzo PJ and Cutler CW, 2003).

Les enzymes

Les enzymes protéolytiques de *P.gingivalis* sont soit extracellulaires, sous forme soluble ou incluse dans des vésicules, soit liées à la cellule. Trois activités protéolytiques sont le fait de protéinases différentes :

- Les cystéine-protéinases (appelées aussi *trypsin-like proteinases*) clivent les protéines ou les polypeptides spécifiquement après l'arginine ou la lysine. On les appelle collectivement les gingipaïnes. Leur activité catalytique est liée à la présence d'un groupement thiol dans la cystéine de la molécule.
- La X-prolyl-dipeptidyl peptidase est active sur des aminopeptides.
- Les collagénases.

Environ quarante protéinases de *P.gingivalis* ont été décrites, mais l'essentiel de l'activité protéolytique serait due aux gingipaïnes. Les gingipaïnes sont des protéases produites par *P.gingivalis*, et dont la fonction majeure est l'acquisition de nutriments via la dégradation des protéines en peptides. Trois gènes codant pour trois protéines distinctes ont été identifiés : les Arg-gingipaïnes 1 et 2 (RGP-1 et RGP-2) et la Lys-gingipaïne (KGP) (Potempa J, Pike R et al, 1995). Les deux premières sont capables d'hydrolyser les liens des peptides avec des résidus Arg-X, et la dernière les liens avec les résidus Lys-X (Pike R, McGraw W, 1994). Des souches mutantes de *P.gingivalis* déficientes en certaines protéinases définies, dont les gingipaïnes RGP et KGP, ont été testées sur l'animal. Il en résulte que ces gingipaïnes sont essentielles dans l'expression de la virulence de *P.gingivalis*. La gingipaïne de type RGP est un médiateur de la perméabilité vasculaire par le relargage de bradykinine, permet la liaison du fimbriae aux fibroblastes et détruit les protéines du complément. La gingipaïne KGP a des effets similaires et est une fibrinogénase très puissante (Fletcher HM, Schenkein HA et al, 1995; Nakayama K, Kadawi T et al, 1995; Park Y and McBride BC, 1993; Pike R, McGraw W, 1994).

La gingivaïne, une autre cystéine protéinase, est une hémolysine, c'est-à-dire qu'elle est capable de lyser les globules rouges.

L'activité collagénolytique de *P.gingivalis* serait due à au moins une collagénase, différente des collagénase des vertébrés, et active sur les collagènes de type I, II, et III. Certaines Arg-gingipaïnes seraient active sur les collagènes de type I, II, IV, et V, ainsi que

sur le C3 du complément, le fibrinogène, la fibronectine, l' α 1-antitrypsine, l' α 2-macroglobuline, l'apotrannsferrine, et l'albumine sérique.

Les protéinases donnent à *P.gingivalis* un pouvoir infectieux, en intervenant à trois niveaux dans :

- L'adhérence,
- La croissance de la bactérie,
- Et l'inactivation des systèmes de défense de l'hôte.

Les protéinases fixées à la surface de la bactérie peuvent agir comme des adhésines, permettant ainsi à la cellule d'adhérer à un substrat. Les protéinases peuvent aussi, par leur activité enzymatique, découvrir un site de fixation normalement caché (on parle alors de cryptitope) à la sub-surface du substrat. Celui-ci peut être une cellule épithéliale, un complexe fibronectine-collagène, un globule rouge, ou une autre bactérie.

P.gingivalis est asaccharolytique et n'utilise donc pas les sucres pour sa croissance, mais a besoin de peptides courts et d'acides aminés pour assurer son développement. La dégradation des protéines de l'environnement parodontal par ses protéinases permet donc à *P.gingivalis* de se fournir en nutriments nécessaires à sa survie et à sa multiplication. La dégradation des opsonines du sérum et celle des tissus de l'hôte contribuent respectivement à la résistance à la phagocytose et à la formation d'abcès extensifs chez la souris (Genco CA, Cutler CW et al, 1991). La destruction tissulaire qui découle de la dégradation des peptides est donc, pour une grande partie, le résultat direct de l'activité protéolytique propre à cette bactérie.

Le fer est un facteur de croissance également indispensable à *P.gingivalis*. Il est présent dans le milieu parodontal sous forme d'hémoglobine, d'hémine, ou de ferritine et peut être libéré par *P.gingivalis* en libérant l'hémine des érythrocytes grâce à son hémolysine.

L'inactivation des défenses immunitaires locales est aussi le résultat de cette activité protéolytique. En effet, les protéinases dégradent les immunoglobulines IgA et IgG, les protéines C3 et C5 du complément et des inhibiteurs plasmatiques des protéases. Les mécanismes locaux de la réponse inflammatoire sont ainsi perturbés au profit des bactéries infectantes qui échappent à la phagocytose et à la bactériolyse.

En plus des protéinases, *P.gingivalis* produit de nombreux autres enzymes : phosphatase alcaline, sulfatase, héparinase, chondroïtinase, qui ont une action catalytique sur les composants de la matrice intercellulaire. Une superoxyde dismutase lui permet aussi de résister aux ions superoxyde produits par les PMN, et bénéficie ainsi d'une protection contre l'effet toxique de l'oxygène. Bien qu'elle soit une bactérie anaérobie stricte, elle peut donc tolérer des taux d'oxygène dissous.

Des produits du métabolisme de *P.gingivalis*, comme l'acide acétique, l'acide propionique, l'acide butyrique, des composés sulfurés, et les méthylmercaptans, peuvent avoir un effet délétère sur les tissus parodontaux. Entre autres, les méthylmercaptans seraient responsables d'un élargissement des espaces intercellulaires de l'épithélium et altéreraient le métabolisme des fibroblastes (Johnson PW, Ng W et al, 1992).

Les vésicules

Les vésicules sont des excroissances de la membrane externe de *P.gingivalis*. Elles sont relâchées dans le milieu environnant et sont en elles-mêmes un facteur de virulence car elles assurent la diffusion, à distance de la cellule bactérienne, ses attributs pathogènes. La faible dimension de ces vésicules (de 10 à 15 nm) leur permet de traverser les barrières épithéliales et donc d'accéder aux tissus sous-jacents.

Les vésicules contiennent tous les enzymes synthétisés par la bactérie et stockés avant leur excrétion dans l'espace péri plasmique (Mayrand D and Grenier D, 1989). De plus, comme elle sont issues de la membrane externe, elles en possèdent les propriétés endotoxiques et antigéniques. Il est possible que les vésicules protègent ainsi la bactérie en fixant une partie des anticorps dirigés contre elle.

I.3.3. *Tannerella forsythensis*.

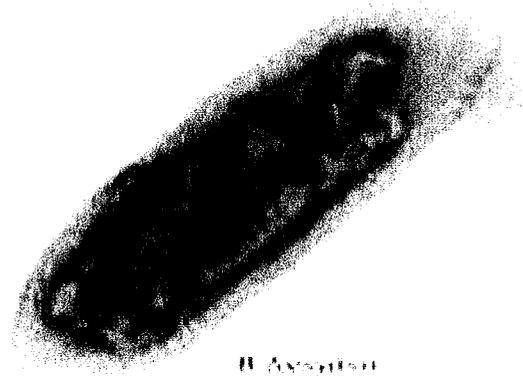


Figure 9 : Une cellule de l'espèce *Tannerella forsythensis* (anciennement *B.forsythus*) vue à fort grossissement (www.acsu.buffalo.edu).

C'est une bactérie peu connue, qui portait précédemment le nom de *Bacteroides forsythensis*. Elle a été récemment renommée *Tannerella forsythensis* (Sakamoto M, Suzuki M et al, 2002). Cette bactérie a été décrite pour la première fois en 1979, et était difficilement cultivable. Les colonies sont très petites et n'apparaissent qu'après 7 à 14 jours sur des milieux enrichis contenant un supplément d'acide muramique, ou en co-culture avec *F.nucleatum*. En effet, lors des prélèvements dans des poches parodontales, *T.forsythensis*, qui appartient au complexe rouge de Socransky, est habituellement isolé en même temps que des bactéries du groupe orange, dont *F.nucleatum* (Haffajee AD and Socransky SS, 1994).

I.3.3.1. Epidémiologie.

Les cellules se présentent sous la forme de très petits fuseaux aux extrémités allongées, parfois étirées en filaments. C'est une bactérie à gram négatif, anaérobie stricte, et non glucidolytique (Haffajee AD and Socransky SS, 1994).

Une étude utilisant une sonde ADN dans un protocole de très haute sensibilité a révélé une prévalence de 82% dans une cohorte de 39 individus boliviens âgés de 4 à 79 ans dont l'hygiène bucco-dentaire était sommaire (Chandad F, Guillot E et al, 1997).

T.forsythensis est communément détecté dans les sites sous gingivaux et son taux est fortement lié à la profondeur de poche (Gmur R, Strub JR et al, 1989). Lai et al ont confirmé ces découvertes en utilisant des techniques d'immunofluorescence, démontrant ainsi que *T.forsythensis* est beaucoup plus fréquent dans la plaque sous gingivale que dans la plaque sus gingivale (Lai CH, Listgarten MA et al, 1987).

Cette bactérie est plus souvent retrouvée dans les sites avec perte d'attache que dans les sites sains ou en état de gingivite (Lai CH, Listgarten MA, 1987). C'est une espèce prédominante en prévalence et en nombre dans les lésions actives, par rapport aux sites inactifs (Dzink J, Socransky SS et al, 1988). De plus, *T.forsythensis* était trouvé en plus grande concentration dans les sites de récurrence après traitement parodontal que dans les sites stables.

Cette espèce est aussi fréquemment détectée chez les sujets réfractaires, et les anticorps contre cette bactérie se sont révélés élevés chez de nombreux patients atteints de parodontite, ainsi que chez un certain nombre de sujets réfractaires (Listgarten MA, Lai CH et al, 1993; Taubman MA, Haffajee AD et al, 1992).

Dibart et al, en utilisant l'hybridation d'ADN, ont enfin démontré que *T.forsythensis* est la bactérie la plus retrouvée sur ou dans les cellules épithéliales provenant de poches parodontales, et au contraire était rare en ce qui concerne les cellules épithéliales de sites sains (Dibart S, Skobe Z et al, 1994).

I.3.3.2. *Caractéristiques et facteurs de virulence.*

T.forsythensis possède plusieurs particularités. Elle produit une protéase *trypsine-like* et un lipopolysaccharide (Moncla BJ, Braham P et al, 1991), et elle peut pénétrer dans les cellules de l'hôte et induire l'apoptose (Arakawa S, Nakajima T et al, 2000).

L'enzyme *trypsin-like* peut être mise en évidence par un test utilisant le substrat benzoyl-D-L-arginine-b-naphtyl-amine (BANA). Un test BANA positif signifie la présence dans un échantillon de *P.gingivalis*, *T.denticola*, et *T.forsythensis*, ensemble ou séparément.

La capacité de *A.actinomycetemcomitans* et de *P.gingivalis* à envahir les cellules hôte *in vivo* et *in vitro* a été bien décrite. Comme *T.forsythensis* est presque toujours retrouvée là où est localisée *P.gingivalis*, les chercheurs ont supposé qu'elle devait aussi pénétrer les cellules hôte. Grâce à la PCR, puis à l'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH), les chercheurs ont réussi à détecter *T.forsythensis* à l'intérieur des cellules de l'épithélium buccal (Rudney JD and Chen R, 2001). Ils ont aussi été capables de montrer que la bactérie se multiplie activement à l'intérieur des cellules. Cela implique que *T.forsythensis* garde des « réserves » intracellulaires dans des zones autrement difficiles à coloniser à cause de ses caractéristiques anaérobies. Il est aussi possible que ces cellules infectées transmettent des bactéries de site à site, et d'hôte à hôte lors du turnover cellulaire, ce qui les protégerait des conditions hypotoniques défavorables de la salive (Baron S, Poast J et al, 2000).

T.forsythensis induit l'apoptose. Quand elle est mise en présence de HL-60 ou d'autres cellules leucémiques humaines, une activité cytocide est décrite. La perte du potentiel de membrane mitochondrial et de l'intégrité de la membrane cellulaire caractérise le processus d'apoptose induit par cette bactérie (Arakawa S, Nakajima T, 2000). Comme l'apoptose repose sur le principe que l'organisme ne doit pas être reconnu comme étranger par les macrophages, il se pose la question de savoir si *T.forsythensis* déclenche un mécanisme de réponse auto-immun.

I.3.4. Prevotella intermedia.



Figure 10 : La bactérie *Prevotella intermedia* vue à fort grossissement
(www.mmsimages.cardiff.ac.uk).

Il s'agit d'un coccobacille anaérobie à gram négatif, modérément glucidolytique, et producteur de pigment noir. La présence en grand nombre de *P.intermedia* a été mise en évidence dans les maladies parodontales nécrosantes aiguës, les gingivites inflammatoires et différentes parodontites (Loesche W, Syed S et al, 1982; Moore L, Moore W et al, 1987; Moore W, 1987).

Cette bactérie possède beaucoup de facteurs de virulence communs avec *P.gingivalis* et fait partie des bactéries nécessaires pour déclencher une infection mixte par injection chez l'animal (Haffajee AD and Socransky SS, 1994).

On sait aujourd'hui que le taxon est composé de deux espèces distinctes : *Prevotella intermedia* et *Prevotella nigrescens* (Shah HN and Gharbia SE, 1992). L'identification différentielle est délicate et requiert des analyses biochimiques élaborées et le recours aux marqueurs sérologiques ou génétiques. Cela explique que les deux espèces ont été longtemps confondues (Bernal LA, Guillot E et al, 1998). Des travaux postérieurs à cette découverte permettraient d'associer *P.nigrescens* à la santé gingivale et *P.intermedia* aux lésions avec perte d'attache (Gmür R and Guggenheim B, 1994; Mättö J, Saarela M et al, 1996).

Le taxon *P.intermedia* est connu pour regrouper la majorité des souches résistantes aux pénicillines par production de β -lactamase que l'on peut isoler des poches parodontales (Kinder S, Holt S et al, 1986). Mais il semblerait que trois quarts des souches productrices de β -lactamase appartiennent à l'espèce *P.nigrescens* contre seulement 20% à l'espèce *P.intermedia* (Bernal LA, Guillot E, 1998).

I.3.5. Fusobacterium nucleatum.



Figure 11 : *Fusobacterium nucleatum* vu à fort grossissement (www.zuova.cz).

C'est une espèce anaérobie à gram négatif dont les cellules ont une forme caractéristique de fuseau aux extrémités pointues. En dimension, elle peut aller de 0,4 à 0,7 μ m de largeur pour 3 à 10 μ m de longueur.

Cette bactérie couvre ses besoins énergétiques par le métabolisme des acides aminés, et produit de l'indole et de l'hydrogène sulfuré.

Cette bactérie est la plus commune dans les prélèvements sous-gingivaux, toutes conditions cliniques confondues (Dzink J, Socransky SS, 1988; Moore L, Moore W et al, 1985; Moore W and Moore L, 1994). Plusieurs sous-espèces ont été décrites. Les travaux de Socransky et al ont pu montrer que *F.nucleatum se nucleatum*, *F.nucleatum se polymorphum*, et *F.nucleatum se vincentii* étaient inclus le complexe orange des bactéries parodontopathogènes (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

F.nucleatum, et en particulier *F.nuceatum se nucleatum* sont des espèces riches en adhésines, qui peuvent reconnaître des récepteurs sur plus de dix espèces bactériennes de la flore buccale. Elles auraient donc un rôle clé dans l'évolution complexe de la plaque dentaire, et notamment dans l'évolution vers l'acquisition des bactéries du complexe rouge (Kolenbrander PE, Andersen RN et al, 1999).

On remarque que *Fusobacterium periodonticum*, proche de *F.nucleatum*, fait également partie des espèces du complexe orange (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

I.3.6. Eubacterium.

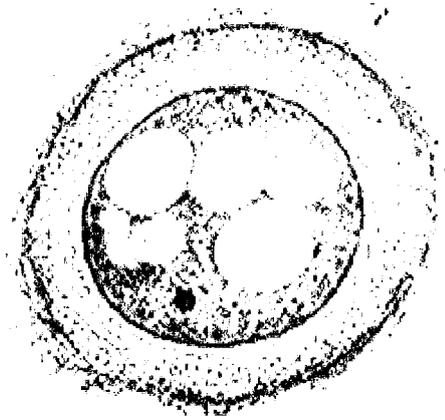


Figure 12 : Une bactérie du genre *Eubacterium* à fort grossissement (www.zuova.cz).

Le genre *Eubacterium* rassemble beaucoup d'espèces anaérobies à gram positif, qui sont des petits coccobacilles souvent pléomorphes.

Il a pu être établi que la proportion des espèces *E.alactolyticum*, *E.brachy*, *E.nodatum*, *E.saphenum*, et *E.timidum* augmente avec la gravité des lésions (Moore W and Moore L, 1994). Des phylotypes non-cultivables sont aussi associés à la maladie parodontale (Kumar PS, Griffen AL et al, 2005).

I.3.7. Capnocytophaga.

Le genre *Capnocytophaga* rassemble de nombreuses espèces propres à la cavité buccales : ce sont de longs bâtonnets à gram négatif. Ces bactéries ne sont pas anaérobies strictes : elles sont capnophiles mais leur croissance est meilleure en conditions d'anaérobie.

Ces bactéries ont la faculté de se déplacer à la surface des milieux de culture par un glissement appelé translocation. Cela donne aux colonies un aspect étalé.

Le métabolisme énergétique de ces bactéries est glucidolytique et elles sont naturellement résistantes au métronidazole.

Diverses études associent *Capnocytophaga* à la santé parodontale (Haffajee AD, Cugini MA et al, 1998; Kumar PS, Griffen AL, 2005; Tanner A, Maiden MF et al, 1998).

Les espèces *C.gingivalis*, *C.ochracea* et *C.sputigena* sont classées dans le complexe vert (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

I.3.8. Peptostreptococcus.

Peptostreptococcus micros (ou *Micromonas micros*) et *Peptostreptococcus anaerobius* sont des espèces anaérobies à gram positif. Ces bactéries ont une forme de coques qui peuvent isolées ou associées en courtes chaînettes.

Ces espèces sont connues pour leur rôle dans de nombreuses pathologies extra buccales, en association avec des espèces des genres *Bacteroides*, *Prevotella*, et *Fusobacterium*. Il s'agit d'infections abdo-péritonéales, d'infections cérébrales, ou de cellulites cervico-faciales.

P.micros est augmenté en prévalence et en nombre dans les lésions parodontales par comparaison avec les sites sains, et dans les sites actifs par rapport aux sites inactifs (Dzink J, Socransky SS, 1988; Rams T, Feik D et al, 1992). Cette bactérie est classée dans le complexe orange (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

Cependant une étude plus récente tend à montrer que *P.micros* ferait partie de la flore buccale normale, quel que soit son génotype (il existe deux génotypes : Sm et Rg). Par contre ces deux génotypes se comporteraient de manière opportuniste dans les parodontites (Kremer BH, Loos BG et al, 2000).

La proportion de *P.anaerobius* augmente avec la sévérité des lésions, surtout dans les parodontites à début précoce (Moore W and Moore L, 1994).

Il semble que les différentes espèces de *peptostreptococcus* soient liées à la parodontite (Salari MH and Kadkhoda Z, 2004).

I.3.9. Campylobacter rectus.

Campylobacter rectus, anciennement *Wolinella recta*, est un vibriion motile, à gram négatif, anaérobie, et non glucidolytique. Sa motilité en trajectoires rectilignes est due à son flagelle simple unipolaire.

Il est probable que cette bactérie colonise l'espace sous gingival grâce à son tropisme pour le formate produit par d'autres bactéries telles que *Micromonas micros*, les genres *Eubacterium* et *Fusobacterium nucleatum*.

C.rectus produit une leucotoxine. *C.rectus* et *A.actinomycetemcomitans* sont les deux seules espèces buccales connues ayant cette caractéristique (Gillespie J, De Nardin E et al, 1992).

C.rectus est rarement trouvé dans les sites sains (dans 3%) des cas, mais est trouvé dans près de 50% des sites atteints de parodontite modérée (Moore W and Moore L, 1994). Il est aussi présent chez 80% des individus de tout âge présentant des lésions avancées (Rams T, Feik D et al, 1993). C'est aussi une espèce prédominante en prévalence et en nombre dans les lésions actives par rapport aux sites inactifs (Dzink J, Socransky SS, 1988).

Cette bactérie est aussi trouvée en quantité significativement plus importante chez les patients atteints de parodontite agressive par rapport aux patients atteints de parodontite chronique (Gajardo M, Silva N et al, 2005).

C.rectus, ainsi que deux espèces proches, *Campylobacter gracilis* et *Campylobacter showae*, appartiennent au complexe orange de Socransky (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

I.3.10. Eikenella corrodens.

Eikenella corrodens est une bactérie à gram négatif, non glucidolytique, et anaérobie facultative. Sa croissance peut être stimulée par le CO₂ : elle est capnophile.

Les cellules ont une forme de bâtonnet rigide, et les colonies sont à l'origine d'une corrosion de la gélose où elles s'incrument.

E.corrodens est un pathogène pouvant provoquer des infections extra buccales telles que l'ostéomyélite ou des infections du système nerveux central.

Mais, bien qu'elle puisse faire partie de la flore sous gingivale, aucune association importante avec les parodontites n'a été montrée (Chen CK, Dunford R et al, 1989).

Cette espèce est classée dans le complexe vert de Socransky (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).

I.3.11. Selenomonas et Centipeda periodontii.

Deux genres, *Selenomonas* et *Centipeda*, rassemblent les bactéries dont la motilité est remarquable dans des prélèvements de plaque sous gingivale issus de lésions parodontales et examinés à l'état frais en contraste de phase ou sur fond noir.

Les bactéries du genre *Selenomonas* ont une forme de croissant de lune. Leur motilité en culbutes successives est due à une touffe de flagelles ancrés dans la concavité de la cellule. Les *Selenomonas* sont des bactéries à gram négatif, anaérobies strictes, glucidolytiques, et produisent de l'acide propionique. La proportion relative de *S.fleggei*, *S.infelix*, *S.noxia*, et *S.sputigena* augmente avec la sévérité des lésions (Moore W and Moore L, 1994).

Centipeda periodontii est une bactérie anaérobie stricte, à gram négatif, et glucidolytique. Elle possède de multiples flagelles disposés en spirale le long de la cellule, et auxquels elle doit sa motilité.

I.3.12. Spirochètes.

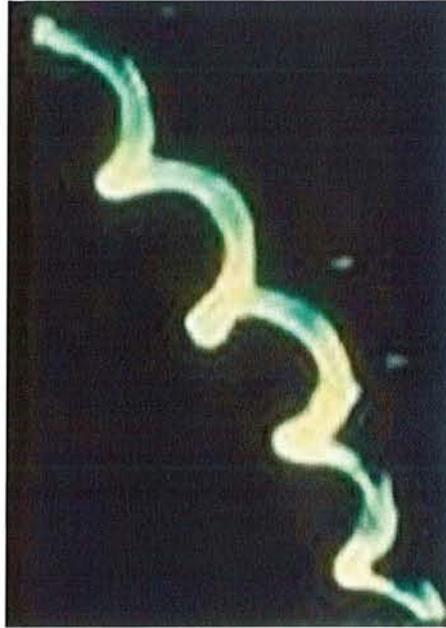


Figure 13 : Un spirochète vu à fort grossissement (www.nescb.org).

La famille des spirochètes (*Spirochetaceae*) comprend quatre genres, tous anaérobies stricts à gram négatif, dont seul le genre *Treponema* est présent dans la cavité buccale.

Les tréponèmes sont des bâtonnets spiralés dont le système de locomotion est un ensemble de fibrilles axiales enveloppées dans une gaine, ont une motilité en vrille. Les spirochètes ont ainsi une capacité unique chez les procaryotes de se mouvoir dans un environnement très visqueux.

Ces bactéries sont prédominantes dans les préparations fraîches de prélèvements de débris de poches parodontales lorsqu'ils sont examinés en microscopie à fond noir ou à contraste de phase (Saglie FR, Carranza FAJ et al, 1985). Les chercheurs ne se sont pas beaucoup intéressés aux spirochètes après les années quatre-vingt, étant donnée la difficulté de les cultiver et le peu de résultats obtenus par les études utilisant les méthodes de culture. Il y a eu plus récemment un regain d'intérêt pour les spirochètes grâce à l'utilisation de nouvelles méthodes comme les anticorps monoclonaux, l'hybridation génétique, la PCR, et le séquençage d'ADN. Celles-ci ont replacées les spirochètes en tête d'une longue liste de pathogènes possibles (Moter AC, Hoenig BK et al, 1998).

L'habitat le plus favorable pour eux au niveau buccal est le sillon gingivodentaire. Seulement quatre espèces sont cultivables :

- *T.denticola* et *T.vincentii* qui utilisent le métabolisme des acides aminés,
- *T.pectinovorum* et *T.socranskii* qui sont glucidolytiques.

Sur un plan uniquement morphologique, il existe 12 types supplémentaires de spirochètes, non cultivables. On les classe en petits, moyens, et grands spirochètes.

Un spirochète présentant des similarités antigéniques avec *Treponema pallidum*, l'agent de la syphilis, a été observé dans la plaque sous gingivale de sujets atteints de maladies parodontales nécrosantes aiguës (Riviere GR, Elliot K et al, 1992). Une étude utilisant le clonage de gènes 16S rRNA amplifiés directement à partir d'échantillons de plaque provenant de diverses lésions parodontales a révélé la présence de 47 espèces de spirochètes jusqu'alors inconnues et incultivables (Dewhirst F, Tamer M et al, 2000). La diversité des espèces de spirochètes ainsi que la difficulté de leur identification est un obstacle pour définir le rôle de chaque espèce dans les pathologies parodontales.

Les spirochètes peuvent constituer jusqu'à la moitié des bactéries de la plaque sous gingivale dans les maladies parodontales nécrosantes aiguës et certaines parodontites de l'adulte (Lembariti BS, Mikx FH et al, 1995). Au contraire, ils sont rares ou absents dans les sites sains (Loesche W, 1988). Et plus la lésion parodontale est sévère, plus la quantité de spirochètes augmente (Simonson LG, Goodman C et al, 1987). La quantité de spirochètes détectables par microscopie fluctue en réponse aux thérapies par surfaçage des racines et par des antibiotiques appropriés. Une quantité importante de spirochètes est considérée comme le signe de la persistance d'une population importante d'anaérobies en général (Loesche WJ, Grossman N et al, 1993; Mousques T, Listgarten MA et al, 1980). D'où l'intérêt diagnostic d'observer les spirochètes, en tant qu'indicateurs de l'activité de la maladie ou d'efficacité de la thérapie. Des études ont montré l'association des spirochètes avec à la fois l'étendue, et la sévérité des lésions (Aimetti M, Romano F et al, 2004; Beikler T, Abdeen G et al, 2001; Sakamoto M, Huang Y et al, 2004; Takeuchi Y, Umeda M, 2001). *T.denticola* est aussi plus souvent détecté chez les patients réfractaires au traitement que chez ceux traités avec succès (Socransky SS, Smith C et al, 2002). Enfin, les spirochètes sont un pathogène majeur dans les maladies parodontales nécrosantes aiguës (Riviere GR, Weisz KS et al, 1991).

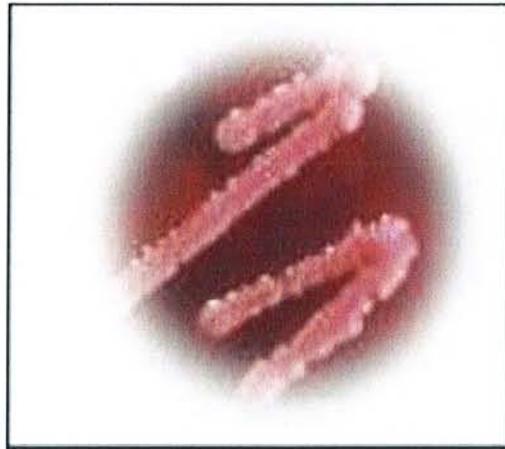


Figure 14 : Des bactéries de l'espèce *Treponema denticola* (complexe rouge) vues à fort grossissement (http://www.biltek.tubitak.gov.tr/canlilar/img/treponema_denticola.png).

T.denticola est la seule espèce dont les facteurs de virulence ont pu être étudiés. Elle peut se lier à de nombreux substrats du parodonte : fibroblastes, cellules épithéliales, fibronectine, collagène de type I et IV, laminine, gélatine et fibrinogène, par l'intermédiaire de la dentilysine (Chan ECS and McLaughlin R, 2000). La dentilysine est un facteur qui induit la dégradation des protéines de la matrice endogène qui sont exprimées à la surface des cellules hôtes, ainsi que celle des protéines de jonction (Ko KSC, Lo CM et al, 1998). La dentilysine a aussi la capacité d'activer les métallo-protéinases matricielles de l'hôte, provoquant ainsi la destruction de la matrice extra cellulaire.

Lorsqu'elle se fixe à la surface des fibroblastes par l'intermédiaire d'une protéase analogue à la chymotrypsine, *T.denticola* est cytotoxique et entraîne la mort cellulaire. Une hémolysine et la pseudo-chymotrypsine entraînent l'agglutination et la mort des hématies. L'hémine libérée par l'hémolyse est captée par un récepteur de membrane, permettant ainsi l'acquisition du fer, qui est un facteur de croissance essentiel pour cette bactérie (Ellen RP and Galimanas VB, 2005). Cela contribuerait à endommager le parodonte tout en favorisant l'invasion de la gencive par d'autres bactéries (Ding Y, Uitto VJ et al, 1996).

Les spirochètes seraient situés en grande partie à la jonction entre la plaque sous gingivale et la gencive, d'après des études par microscopie électronique à transmission (Listgarten MA, 1976). La capacité des spirochètes à se mouvoir en milieu visqueux leur permet de se déplacer dans le fluide gingival et la plaque dentaire, ce qui leur permet l'accès au parodonte sous-jacent : des spirochètes ont été observés entre les cellules de l'épithélium de jonction, dans le tissu conjonctif et dans le tissu osseux (Carranza FA, Saglie R et al, 1983).

I.3.13. Entérobactéries.

Les entérobactéries des genres *Enterobacter*, *Klebsiella*, et *Pseudomonas*, ne sont jamais présentes dans la plaque des patients sains. Par contre, elle sont présentes relativement fréquemment dans la plaque des patients atteints de parodontopathies, et auraient un rôle dans la pathogénie de la maladie (Barbosa FC, Mayer MP et al, 2001).

Leur rôle étiologique n'a pas été démontré. Cependant, un traitement par ciprofloxacine, antibiotique actif sur les entérobactéries, s'accompagne d'une réduction de la profondeur de poche (Slots J, Feik D et al, 1990; Tezel A, Yucel O et al, 2005).

I.4. Microorganismes non bactériens à potentiel parodontopathogène.

Le facteur étiologique principal de la maladie parodontale est bactérien. On se doit tout de même de mentionner quelques microorganismes dont le potentiel parodontopathogène a été évoqué.

I.4.1. Parasites.

Les protozoaires *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* font partie de la flore normale de nombreux individus. Leur nombre augmente dans les pathologies bucco-dentaires, et notamment dans les parodontopathies. *E.gingivalis* est aussi augmenté chez les personnes âgées.

On a pensé longtemps que *E.gingivalis* avait un rôle important dans le déclenchement des parodontites. Cette affirmation se fondait sur le fait que l'augmentation du nombre d'amibes était associée à une gingivite ou des lésions parodontales (Barrett M, 1914). L'hypothèse amibienne a été invalidée quand il a été démontré que des bouches saines pouvaient contenir des amibes alors que des sites atteints en étaient indemnes (Socransky SS and Haffajee AD, 1994).

I.4.2. Virus.

La présence de virus au sein de la plaque dentaire et des tissus parodontaux ainsi que leur rôle dans l'étiologie des parodontopathies a longtemps été suspecté. La présence de cytomégalovirus (HCMV), ou de virus d'Epstein Barr (EBV), voire la co-infection par ces deux virus du parodonte est très liée aux pathologies parodontales telles que les parodontites destructives, la gingivite ulcéro-nécrotique chez l'enfant et les abcès parodontaux.

Il n'est pas rare que des patients reviennent avec un « bouton de fièvre » après de longues séances de soins ou de chirurgie. Il est donc vraisemblable que le trauma occasionné par les soins ou la chirurgie réactive le virus *Herpes simplex* de type 1. HSV1 peut provoquer une gingivostomatite aiguë chez l'enfant. Il est présent à l'état latent chez 90% des adultes.

Le cytomégalovirus (HCMV) est aussi fréquemment présent sans signes chez l'adulte : 50 à 80% des adultes de 40 ans ont des anticorps anti-CMV. Le HCMV infecte les cellules endothéliales, épithéliales, et les fibroblastes. Il serait donc probable de le retrouver dans les tissus lors des parodontites. La réactivation du virus HCMV semble être liée à l'activité de la maladie.

Grâce à la biologie moléculaire, des études sont venues confirmer la présence de virus dans le parodonte. Mais le rôle étiologique des virus dans les parodontites n'a pas été prouvé. On pense qu'une infection virale des tissus parodontaux, en particulier par un virus de type *Herpes*, peut diminuer la résistance de ceux-ci et donc faciliter l'infection par des bactéries parodontopathogènes (Contreras A, Umeda M, 1999; Contreras A, Zadeh HH, 1999). Cette supposition s'appuie sur le fait que HCMV entraîne une diminution des CD4+ et une augmentation des CD8+, c'est-à-dire une immunité cellulaire diminuée. Il infecte aussi les monocytes, les macrophages, et les lymphocytes T. De même, le virus d'Epstein Barr (EBV) est cytotoxique pour les lymphocytes T et infecte les lymphocytes B. La présence des différents virus du groupe Herpes dans la plaque sous-gingivale lors des parodontites est associée à la présence de bactéries parodontopathogènes comme *P.gingivalis*, *P.nigrescens*, *T.forsythensis*, ou *T.denticola*, mais non à celle de *A.actinomycescomitans* (Slots J, 2004).

D'autres études tendent à monter un lien entre infection virale et parodontopathies. Chez des enfants nigériens atteints de maladies parodontales nécrosantes aiguës, on constate dans 68% des cas la présence d'un ou plusieurs des virus suivants dans le fluide gingival : HCMV, EBV, HSV1, HSV6 (Contreras A, Falker W et al, 1997). Des biopsies de tissus

parodontaux sains révèlent la présence de HCMV dans 9% des cas et de EBV dans 27% des cas, contre respectivement 86% et 79% des cas sur des tissus atteints de parodontite. Il faut aussi remarquer qu'une co-infection à plusieurs virus est fréquente (Contreras A, Nowzari H et al, 2000).

La présence de papillomavirus (il s'agit des génotypes 6, 11, et 16) dans le tissu gingival lors des parodontites a aussi été rapportée (Madinier I, Doglio A et al, 1992).

Selon Contreras et Slots, il y aurait quatre mécanismes possibles de participation des virus dans la pathogénie de la parodontite (Contreras A and Slots J, 2000) :

- Les virus affaiblissent les défenses immunitaires en induisant des défauts de phagocytose et de bactéricidie oxygène-dépendante, et permettraient donc la pénétration des bactéries dans les tissus.
- Les protéines virales exprimées à la surface des cellules infectées servent de récepteurs aux bactéries. Les virus autorisent donc ainsi l'adhésion et la colonisation des bactéries dans le biofilm sous-gingival.
- Les virus sont toxiques pour les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales, et pourraient donc provoquer un retard de cicatrisation.
- Les virus diminuent l'expression des complexes CMH de classe I, empêchant la présentation des antigènes aux lymphocytes et la reconnaissance de l'antigène.

1.4.3. Candida.



Figure 15 : *Candida albicans* vu à fort grossissement (www.academics.hamilton.edu).

Les *Candida* sont des levures, microorganismes unicellulaires, saprophytes de la cavité buccale. Parmi les espèces connues, seules certaines sont pathogènes pour l'homme. *Candida albicans* est la plus fréquente. Ces levures peuvent devenir des agents opportunistes en cas d'immunodépression ou de déséquilibre de l'écosystème du biofilm, ce qui peut se produire après une intervention chirurgicale, en présence d'ulcération muqueuses, ou après une antibiothérapie.

Au cours d'une infection à VIH, la candidose buccale est un signe fréquent et précoce. Sa présence correspond à un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 400/mm³.

Le port de prothèses amovibles est le principal facteur prédisposant le plus fréquent à la candidose, du fait des altérations muqueuse qu'elles peuvent provoquer (Butz-Jørgensen E and Lombardi T, 1996).

Une augmentation du nombre de *Candida* dans les poches parodontales profondes peut être observée après antibiothérapie (Helovuo H, Hakkarainen K et al, 1993).

Cependant le rôle étiologique de *Candida* dans les parodontites semble peu probable (Dalhén G and Wikström M, 1995). Il est toutefois possible de trouver *Candida* dans les poches parodontales, et dans ce cas sa présence est fréquemment associée à celle de *Eubacterium saburreum* (Reynaud AH, Nygaard-Ostby B et al, 2001).

Partie II

Méthodes actuelles de diagnostic : principes, avantages et inconvénients.

La maladie parodontale étant d'origine infectieuse, un diagnostic microbiologique doit être réalisé avant la mise en œuvre d'une thérapie spécifique. Celle-ci pourra ainsi être dirigée précisément contre le ou les agents étiologiques en cause, qu'il s'agisse de bactéries, de virus, ou de protozoaires. Pour que la maladie parodontale soit prise en charge comme une véritable infection, ce diagnostic devrait faire partie intégrante du protocole de soins. Ce n'est pas souvent le cas, pour de nombreuses raisons. La principale est que l'infection parodontale diffère beaucoup des infections « classiques ». En effet, alors que les infections des autres parties du corps obéissent souvent à la règle « un microorganisme/une pathologie », les infections bucco-dentaires sont polymicrobiennes, avec une dominance fréquente des bactéries anaérobies à gram négatif.

Comme nous l'avons vu précédemment, seules quelques unes des centaines d'espèces vivant dans le sulcus ont un rôle significatif dans l'étiologie de la maladie parodontale. Cependant, la seule présence de ces pathogènes dans le sillon gingivo-dentaire ne suffit pas pour initier l'inflammation des tissus parodontaux. Il faut pour cela que leur proportion relative soit augmentée et que leur masse (ou leur nombre total) soit suffisant pour créer des dommages tissulaires. Le but du diagnostic microbiologique n'est donc pas seulement d'identifier les espèces des bactéries présentes dans les échantillons prélevés, mais aussi de déterminer leurs nombres et leurs proportions respectives.

II.1. Prélèvement de la flore parodontale.

Le prélèvement de la plaque est un préalable commun à toutes les techniques d'identification de la flore parodontale.

Le prélèvement de la plaque dentaire supra-gingivale, d'accès immédiat ne pose pas de difficulté. Un raclage de la surface dentaire concernée à l'aide une sonde, d'une curette, ou d'une brossette interdentaire stérile, suivi du transfert dans un milieu de transport adéquat jusqu'au laboratoire, est suffisant. Cependant, le prélèvement de plaque supra-gingivale est d'un intérêt mineur en parodontologie. En effet, si la flore supra-gingivale est responsable de la gingivite « classique », nous avons vu précédemment que ce sont des microorganismes de la plaque sous-gingivale qui sont responsables des maladies parodontales avec perte d'attache.

De nombreuses techniques de prélèvement d'échantillons de plaque sous-gingivale ont été décrites par différents laboratoires. On peut citer comme technique de prélèvement, les pointes de papier endodontiques, les curettes, les cure-dents montés, les excavateurs, les limes endodontiques protégées par une canule sous mélange gazeux anaérobie, ainsi que le lavage et l'aspiration du milieu de lavage. Ces prélèvements peuvent s'effectuer directement dans la poche parodontale, mais aussi lors d'une chirurgie par lambeau, ou après avulsion de la dent. Chaque matériel ou technique utilisée peut affecter de façon variable résultat de l'analyse. Le protocole de choix est celui qui reflète le plus fidèlement la composition bactérienne réelle du site. Des études contradictoires montrent la supériorité tantôt de la technique à la curette, tantôt de celle à la pointe de papier endodontique (Baker PJ, Butler R et al, 1991; Sixou M, Duffaut-Lagarrigue D et al, 1991).

II.1.1. Précautions préalables.

Avant le prélèvement, il faut enlever la plaque supra-gingivale avec une compresse stérile ou une boulette de coton stérile, imprégnée de sérum physiologique ou de chlorhexidine. Puis, il faut assécher le site à l'aide de coton ou d'une compresse sèche (pas avec un pistolet à air). On doit isoler le site de la contamination par la salive, avec des rouleaux de coton par exemple. Il faut éviter tout contact de l'instrument servant au prélèvement avec les muqueuses jugales.



Figure 16 : Le site doit être séché et isolé. Les instruments de prélèvements ne doivent pas toucher la muqueuse jugale (<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/polymerase.html>).

II.1.2. Prélèvement au cure-dent monté.

On peut utiliser des cure-dents en bois de section ronde, disponibles dans le commerce, ou des bâtonnets interdentaires de section triangulaire. Il faut les couper pour ne conserver qu'une extrémité pointue d'environ 2cm de long, puis les conditionner en emballage qui sera ensuite stérilisé.

Une fois ces bâtonnets stérilisés, on les monte sur un porte-brossette à manche coudé comportant un orifice d'insertion et une vis de serrage. On insère la pointe du cure-dent dans l'espace sous-gingival ou la poche parodontale, puis on fait remonter l'instrument avec une légère rotation en appuyant sans forcer sur la surface radiculaire. Enfin on dévisse la vis de serrage et on fait tomber le cure-dent dans le flacon contenant le milieu de transport (Charon J and Mouton C, 2003).

II.1.3. Prélèvement avec une pointe de papier endodontique.



Figure 17 : Les prélèvements sont effectués en plusieurs sites, puis sont séparés et étiquetés.

Avec une précelle, on insère une ou plusieurs pointes de papier successivement aussi profondément que possible dans la poche parodontale. On laisse en place pendant 20 secondes, et on les transfère dans le milieu de transport.

L'insertion dans un site très enflammé, où le tissu est distendu, est plus facile que dans un site où l'inflammation est modérée. En particulier, les fumeurs ou les personnes ayant subi récemment un surfaçage, présentent un anneau gingival peu enflammé au niveau coronaire, même au niveau de poches parodontales.

L'inconvénient de cette méthode est le manque de rigidité des pointes papiers une fois qu'elles sont imprégnées de fluide. Il peut être difficile de les insérer aussi profondément que souhaité. Il est donc préférable de choisir des pointes de papier du plus gros diamètre possible.

La pointe de papier doit ensuite être déposée dans le tube contenant le milieu de transport, sans entrer en contact avec la salive, du pus, ou la muqueuse buccale. Cette technique de prélèvement avec des pointes de diamètre moyen est la plus couramment utilisée (Charon J and Mouton C, 2003).

II.1.4. Prélèvement avec une curette.

Il faut insérer la curette le plus profondément possible dans la poche et la remonter en s'appuyant sans forcer sur la surface radiculaire. Puis il faut plonger la curette dans le tube contenant le milieu de transport et l'agiter pour libérer l'échantillon prélevé.

A cause de la forme et des dimensions des curettes du commerce, il est parfois difficile d'atteindre le fond des poches. En effet, la pénétration maximale est de 3 ou 4 mm. Pour accéder à des profondeurs plus importantes, on peut utiliser de vieilles curettes aux dimensions réduites par les affûtages répétés.

Il est aussi important que le prélèvement à la curette ne soit pas agressif. Si c'est le cas, la flore bactérienne est diluée dans du sang, des cellules épithéliales, voire du tartre. Les conséquences sont mineures si l'échantillon est destiné à être placé dans un milieu de culture. Par contre l'échantillon devient quasi inutilisable pour une analyse en immunofluorescence ou en contraste de phase.

L'échantillon recueilli avec une curette est de bonne densité par rapport à celui obtenu avec une pointe de papier, ce qui garantit la détection des espèces bactériennes présentes en faible quantité dans le site étudié (Charon J and Mouton C, 2003).

II.1.5. Conclusion.

Les informations obtenues grâce aux différentes méthodes de prélèvement diffèrent, de par la nature même de ces méthodes. En effet, le prélèvement à la curette fournit des bactéries provenant de toute la poche parodontale, alors que la pointe de papier adsorbe en majorité des bactéries des couches externes du biofilm, qui ont plus de probabilités de contenir des espèces pathogènes.

De même, les pointes de papier, par leur manque de rigidité, ne peuvent collecter efficacement la plaque de la partie la plus apicale de la poche. Comme les bactéries sont inégalement réparties au sein des poches, les prélèvements à l'aide de pointes de papier ne peuvent représenter avec précision la plaque située la plus apicalement, là où la maladie progresse.

Le prélèvement à la curette présente aussi des inconvénients. Malgré la bonne densité des échantillons, les curettes ne peuvent pénétrer au plus profond des poches parodontales. Ce type de prélèvement peut aussi provoquer des saignements, ce qui rend malaisée voire impossible l'identification des bactéries.

Aucune technique de prélèvement n'étant idéale, il faut essayer de choisir la meilleure dans chaque cas de figure (Loomer PM, 2004).

II.2. Evaluation des méthodes de diagnostic.

La méthode de référence est la culture bactérienne. Les nouvelles méthodes de diagnostic microbiologiques doivent être plus efficaces, plus faciles, plus rapides, plus précises, non invasives, etc. Elles doivent être autant voire plus utiles que l'ancien «gold standard », auquel elles sont comparées.

Pour chaque test, on détermine la valeur prédictive négative et /ou positive, la sensibilité, et la spécificité. Ces données déterminent la valeur ou validité du test.

Tableau 2 : Tableau déterminant les différents paramètres d'évaluation d'un test (Wolf HF, Rateitschak EM et al, 2005).

	Maladie	Absence de maladie	
Test positif	A : vrai positif	B : faux positif	Valeur prédictive positive : $A/(A+B)$
Test négatif	C : faux négatif	D : vrai négatif	Valeur prédictive négative : $D/(D+C)$
	Sensibilité : $A/(A+C)$	Spécificité : $D/(D+B)$	

La sensibilité est la probabilité (en %) qu'une maladie existante soit évaluée comme telle (résultat positif) lors du test. Une sensibilité élevée signifie que seul un petit nombre d'individus malades (faux négatifs) est ignoré par le test.

La spécificité est la probabilité (en %) qu'un individu sain soit identifié comme tel (résultat négatif). Une spécificité élevée signifie que peu d'individus en bonne santé sont classés de manière erronée comme malades (faux positifs).

Certains auteurs estiment que, dans le cas de la parodontite, une sensibilité de 70% et une spécificité de 90% seraient suffisantes pour un test diagnostique (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

II.3. Examen direct.

Le prélèvement est effectué à la curette ou au cure-dent, puis l'échantillon est monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau.

La microscopie à fond noir et la microscopie à contraste de phase permettent un diagnostic bactérien directement au fauteuil. Ce sont des techniques faciles et rapides qui ne nécessitent pas de fixation ou de coloration de gram. Cependant, elles ne permettent qu'un diagnostic limité : seuls les morphotypes bactériens sont identifiables, ainsi que leur motilité. Mais elles permettent d'évaluer la diversité microbienne de l'échantillon. L'examen direct permet donc d'évaluer la densité microbienne (ce qui conditionne le choix des dilutions à ensemercer pour la culture) et surtout la motilité des bactéries. La motilité est un caractère physiologique particulier à certaines bactéries, qui leur permet de se déplacer de manière autonome.

Il faut observer l'échantillon dans les minutes qui suivent le prélèvement. Un objectif $\times 100$ à immersion dans l'huile ou $\times 40$ est conseillé. On note pour chaque échantillon la présence de bactéries selon leur morphotype :

- Spirochètes (grands, moyens, petits),
- Spirilles,
- Bacilles motiles droits,
- Bacilles motiles incurvés,
- Bacilles et coccobacilles,
- Fusiformes,
- Filaments,
- Coques,
- Amibes,
- Trichomonas.

Il est aussi possible d'observer le nombre et la qualité des cellules épithéliales et des polymorphonucléaires qui sont souvent présents dans les prélèvements de plaque sous gingivale.

Des coques et des bâtonnets immobiles indiquent une flore pathogène peu active, alors que la présence de nombreuses bactéries mobiles indique une phase d'activité de la poche et de sa flore (Charon J and Mouton C, 2003).

Cette méthode d'examen a peu d'intérêt clinique. Le bénéfice principal est la motivation du patient qui prend alors conscience de l'existence de la flore pathogène, surtout face à une image de nombreuses bactéries mobiles (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

On peut aussi faire une analyse plus fine de la flore en laboratoire par examen direct grâce aux méthodes suivantes.

II.3.1. Coloration à l'orange d'acridine.

Cette méthode requiert un équipement d'épifluorescence et une source d'ultraviolets. Elle est donc peu utilisée en clinique.

Une goutte de l'échantillon est déposée sur une lame et séchée à l'air. On y dépose une goutte de solution d'acridine d'orange, puis la lame est rincée à l'eau distillée et séchée à l'aide d'un papier buvard. L'observation est faite sous lumière ultraviolette (avec par exemple une lampe à vapeur de mercure de 50 watts). Un objectif $\times 100$ à immersion dans l'huile et un oculaire de $\times 10$ permettent une bonne observation.

L'orange d'acridine est un fluorochrome qui se fixe aux acides nucléiques, qui produisent alors une fluorescence orange sous lumière ultraviolette. Les bactéries de l'échantillon sont donc colorées en orange vif, contrastant fortement avec le fond noir. La distinction entre les bactéries et les autres composants de l'échantillon (cellules eucaryotes, débris de pointe de papier, débris alimentaires, ...) en est facilitée. Cette coloration est aussi utile pour l'observation de la morphologie cellulaire, la présence de granulations internes, et la disposition des bactéries les unes par rapport aux autres (formation de chaîne) (Charon J and Mouton C, 2003).

II.3.2. La coloration de Gram.

C'est une technique de coloration différentielle qui permet de classer les bactéries en deux groupes : les bactéries à gram positif et les bactéries à gram négatif. Cette technique est réalisée selon les indications du fabricant.

On obtient souvent des résultats peu tranchés à partir d'échantillons complexes comme ceux provenant d'infections buccodentaires. Il est en effet fréquent de n'observer que des bactéries à gram positif, les bactéries à gram négatif ne prenant que peu la coloration différentielle. C'est par un repiquage des subcultures que l'on peut avoir une identification définitive du caractère gram positif ou négatif d'une bactérie (Charon J and Mouton C, 2003). L'information obtenue peut être confirmée par un test à la potasse. Pour ce test, une anse de la colonie est émulsifiée sur une lame de microscope, dans une goutte de solution de potasse. La rupture des parois des bactéries à gram négatif entraîne une viscosité qui est mise en évidence par la formation d'un filament à partir de l'anse. Cette réaction est caractéristique des microorganismes à gram négatif (Halebian S, Harris B et al, 1981).



Figure 18 : Coloration de gram d'*Actinomyces* (<http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=Actinomyces.jpg&album=2>).

II.4. Culture bactérienne.

II.4.1. Principe.

La culture bactérienne est l'une des plus anciennes techniques de diagnostic.

Elle est toujours considérée comme la méthode de référence (« gold standard ») quand il s'agit de déterminer l'utilité d'un nouveau test microbiologique.

En général, les échantillons de plaque sont cultivés en milieu anaérobie en utilisant des milieux de culture sélectifs et non sélectifs, ce qui, en association avec plusieurs tests physiques et biochimiques, permet d'identifier les bactéries pathogènes (Marchal N, Bourdon JL et al, 1991).

II.4.1.1. Milieux d'isolement (Chromarat M, Dubreuil L et al, 1999).

L'immense majorité des bactéries des infections bucco-dentaires sont anaérobies, strictes ou facultatives. Des techniques de culture en anaérobiose sont donc nécessaires pour isoler et cultiver les espèces présentes dans les prélèvements. Des milieux appropriés à la culture primaire en anaérobiose doivent être sélectionnés. On peut utiliser deux types de milieu : les milieux sélectifs et les milieux non sélectifs.

Les milieux non sélectifs.

Un milieu non sélectif devrait permettre la croissance de toutes les bactéries présentes dans l'échantillon, et dans les mêmes proportions que celles de l'échantillon clinique. Beaucoup de préparations ont été testées pour retrouver en qualité et en quantité les microorganismes des échantillons cliniques d'infections buccodentaires. Une constatation a été dégagée : la nécessité d'utiliser une gélose au sang enrichie.

Différents milieux de base ont été proposés : la gélose trypticase soja, le bouillon cœur/cervelle gélosé, la gélose Brucella, et la gélose Columbia. On y ajoute du sang de mouton, de cheval ou de lapin à des concentrations de 3 à 5%. Ces géloses au sang sont ensuite enrichies en hémine et en méniadone (vitamine K₁) à des concentrations allant de 10⁻⁴ à 5.10⁻⁴ %. On peut encore enrichir les milieux avec du formate, du fumarate, du carbonate, du succinate, du nitrate, ou du lactate.

Des études ont comparé l'efficacité de différentes géloses au sang enrichies pour l'isolement des bactéries de la plaque sous gingivale provenant ou non de poches parodontales. Elles ont montré une relative supériorité du milieu MM10, car celui-ci permet des comptes bactériens plus élevés que ceux des autres milieux (Olsen I and Socransky SS, 1981; Slots J, 1975; Syed SA and Loesche WJ, 1973). Comme la préparation de cette gélose est difficile, on peut lui substituer la gélose au sang Todd-Hewitt rendue semi solide par l'ajout d'agar et enrichie avec de l'hémine et de la vitamine K₁ (Charon J and Mouton C, 2003).



Figure 19 : Colonies de *P.melaninogenica* sur une gélose au sang (<http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=Prmelaboite.jpg&album=7>).

Les milieux sélectifs.

Des espèces ayant un rôle étiologique non négligeable risquent de ne pas être retrouvées dans les milieux non sélectifs utilisés en culture primaire. Certaines peuvent être en nombre insuffisant pour résister aux dilutions en série. Par exemple, *A.actinomycetemcomitans* et *T.forsythensis* peuvent être présents en faible quantité dans un échantillon et pourtant avoir un rôle étiologique important. Sur un milieu non sélectif, certaines bactéries peuvent ne pas se développer, suite à la production par d'autres espèces bactériennes d'un facteur inhibiteur de la croissance de cette première espèce. Au contraire, certaines espèces peuvent mieux se développer sur des milieux non sélectifs, grâce à des agents stimulant leur croissance produits par d'autres espèces. Ainsi, certaines espèces bactériennes ne peuvent se développer que sur des milieux non sélectifs car elles dépendent entièrement de ces facteurs stimulants.

Un milieu sélectif est un milieu de croissance favorisant une espèce déterminée au détriment des autres espèces de l'échantillon. Leur croissance est inhibée. Cette sélection est due à un ou plusieurs agents inhibiteurs, le plus souvent des antibiotiques, qui sont ajoutés en concentration suffisante pour empêcher la croissance des bactéries indésirables et permettre la croissance de l'espèce souhaitée (qui est résistante à cette concentration de l'agent inhibiteur).

Ceci a des inconvénients. La sélectivité peut être exagérée ou insuffisante. On ne peut assurer à la fois la croissance d'une espèce et la suppression de toutes les autres. Quand la sélectivité est exagérée, on obtient que certains variants, certaines sous-espèces de l'espèce souhaitée, ce qui fausse la représentation de l'importance de cette espèce dans la pathologie (en la diminuant). C'est le cas en particulier de *T.forsythensis*, de certains *Actinomyces*, et des streptocoques du groupe *mutans*.

Une sélectivité trop faible peut être à l'origine du masquage par les espèces « indésirables » de l'espèce recherchée, en particulier si les morphologies des colonies sont similaires.

Ces milieux restent toutefois intéressants si l'espèce recherchée a une morphologie de colonie typique.

II.4.1.2. Préparation de l'échantillon.

Pour obtenir chaque microorganisme de l'échantillon en culture pure, et en assurer l'identification, une série de manipulations est nécessaire. Il faut disperser l'échantillon, faire une dilution en série, puis l'ensemencer par étalement sur gélose et en bouillon. Chaque étape est importante pour obtenir la séparation des bactéries en colonies distinctes sur la gélose primaire et en obtenir des isolats. Chaque isolat est une population homogène qui constitue une culture pure. Elle s'obtient par repiquage d'une seule colonie isolée sur une gélose. Une colonie est un amas visible à l'œil nu de cellules toutes identiques provenant d'une seule cellule d'origine (c'est un clone). Mais on n'obtient pas toujours des colonies provenant d'une seule cellule. Le plus souvent, les colonies proviennent d'un amas de plusieurs cellules que l'on appelle « unité formant une colonie » (UFC).

Il est difficile d'isoler et de cultiver les bactéries de la plaque dentaire à cause de la forte densité microbienne des échantillons, de la multitude et de la diversité des espèces présentes, et de la cohésion des bactéries entre elles. La dispersion, la dilution et l'étalement (ensemencement) doivent être rigoureusement effectués pour permettre la croissance de toutes les UFC et permettre ainsi le dénombrement des bactéries viables, des anaérobies viables, etc. La dispersion est une étape particulièrement critique pour ce type d'échantillon. Il faut qu'elle soit suffisamment efficace pour garantir la constitution de colonies à partir de cellules isolées ou d'UFC homogènes sans porter préjudice à la vitalité des bactéries. Il faut si possible effectuer cette dispersion en anaérobiose. Une dispersion optimale de la plaque dentaire est obtenue en appliquant la technique à la seringue, puis celle par bain aux ultrasons (Charon J and Mouton C, 2003).

II.4.2. Avantages.

C'est la méthode de choix qui permet de faire évoluer les connaissances sur les agents étiologiques des infections buccodentaires. Elle est la seule méthode qui révèle l'identité de pathogènes encore inconnus et permet ensuite leur caractérisation ainsi que celle de leur potentiel pathogène. Une identification précise n'est possible que grâce à une taxonomie stricte, elle-même basée sur la culture bactérienne.

Cette technique permet d'obtenir un comptage absolu et relatif des espèces cultivées.

Elle permet enfin la réalisation d'un antibiogramme. Celui-ci détermine à quels antibiotiques le germe cultivé est sensible ou résistant. Ainsi une antibiothérapie efficace pourra être mise en place si nécessaire (Greenstein G, 1988; Lamster IB, Celenti RS et al, 1993; Socransky SS, Haffajee AD et al, 1987).

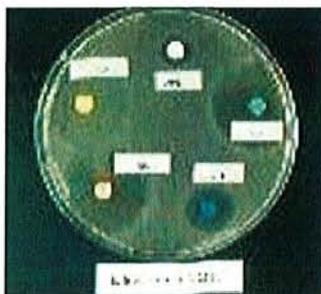


Figure 20 : Antibiogramme de *B.fragilis* (http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=B_frag_ATB.jpg&album=16).

Ceci explique que la culture bactérienne trouve encore sa place en tant que diagnostic de routine quand il s'agit d'identifier et de quantifier des pathogènes, malgré l'avènement de nouvelles méthodes, telles que celles de la biologie moléculaire.

II.4.3. Inconvénients.

Les germes prélevés doivent être maintenus en vie jusqu'à leur arrivée dans le milieu de culture. Comme vu précédemment, les bactéries parodontopathogènes sont le plus souvent anaérobies, ce qui pose des problèmes pour le prélèvement et le transport jusqu'au laboratoire (présence d'oxygène, température, milieu de transport...).

Certaines bactéries pathogènes, comme les espèces de *Treponema* (spirochètes) et *Tannerella forsythensis*, sont très difficiles à cultiver et demandent beaucoup de moyens (Sakamoto M, Suzuki M, 2002).

La culture est une technique lente et chère. Elle requiert du matériel de laboratoire spécifique et du personnel expérimenté. Elle prend aussi beaucoup de temps : les bactéries anaérobies buccales se multiplient très lentement et un résultat significatif n'est souvent obtenu qu'après trois semaines.

Isolement et culture ont un seuil de détection élevé : pour être détectée, une espèce doit être présente dans l'échantillon à plus de 10^3 , voire 10^4 exemplaires. La sensibilité de la culture bactérienne est donc assez basse, surtout pour les milieux non sélectifs. Une concentration faible d'un pathogène précis ne sera donc pas détectée (Sanz M, Lau L et al, 2004).

II.5. Détection immunologique des pathogènes.

Cette détection repose sur des anticorps spécialement créés et marqués par des molécules rapporteuses (RM). Ce marquage peut être effectué par des substances colorées ou fluorescentes.

II.5.1. Immunofluorescence directe ou indirecte.

II.5.1.1. Principe.

L'immunofluorescence met à profit la réaction entre des antigènes et des anticorps présents à la surface de cellules bactériennes cibles d'une espèce dont on cherche à déterminer la présence.

Les anticorps peuvent provenir de trois sources :

- Du sérum hyperimmun produit chez un animal (le lapin, par exemple) par injection d'une préparation de la bactérie cible (des cellules entières ou des extraits),
- De la fraction IgG purifiée à partir d'un sérum hyperimmun,
- De l'anticorps monoclonal produit contre la préparation d'une bactérie cible.

Dans la technique d'immunofluorescence directe, les bactéries, placées sur un support en verre, se fixent par l'intermédiaire d'antigènes de surface spécifiques à leur espèce (structures comme les pili ou fimbriae, en général des hydrates de carbone ou des glycoprotéines) aux anticorps spécifiques fournis. Ces anticorps deviennent visibles à la lumière ultraviolette (au microscope par fluorescence) grâce à leurs molécules fluorescentes (Gmür R and Guggenheim B, 1994). Les bactéries mortes et vivantes sont ainsi recensées et peuvent être différenciées par leur couleur (Netuschil L, Brecx M et al, 1996).

La technique de l'immunofluorescence indirecte se déroule en deux étapes :

- Les anticorps responsables de la réaction antigène/anticorps à la surface des cellules bactériennes cibles sont déposés sur les frottis,
- Cette réaction est rendue visible par la lumière ultraviolette, grâce à des anticorps secondaires marqués par un fluorochrome. On les appelle le conjugué. Ces anticorps proviennent s'un sérum hyperimmun produit contre les IgG de lapin (si les anticorps initiaux proviennent du lapin) par un animal d'une autre espèce. Les IgG (d'une autre espèce) anti-IgG de lapin sont isolés et conjugués à un colorant fluorescent : la fluorescéine (qui donne une fluorescence verte) ou la rhodamine (qui donne une fluorescence rouge)

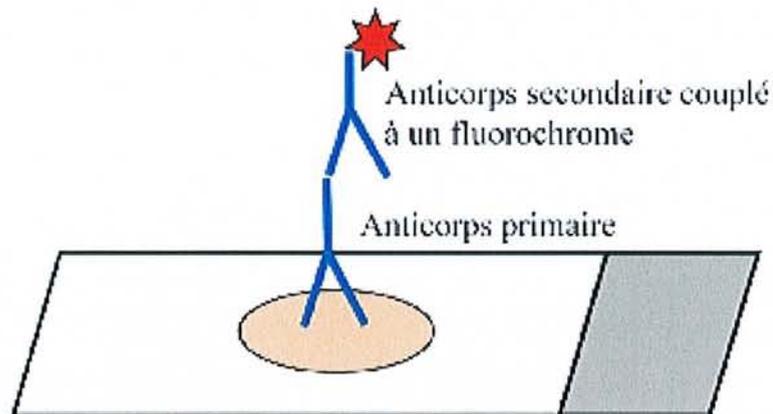


Figure 21 : Principe de l'immunofluorescence indirecte
(www.theses.ulaval.ca/2005/22895/ch02.html).

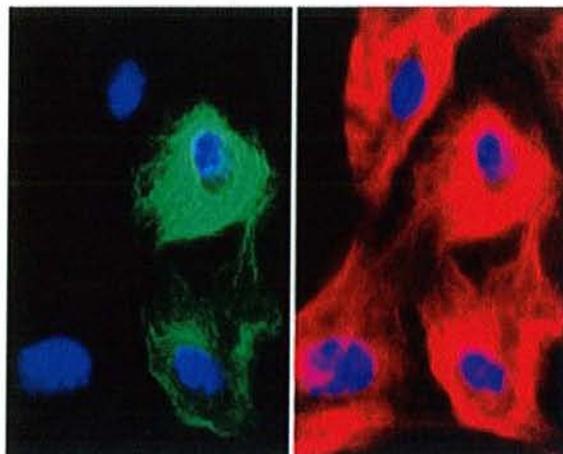


Figure 22 : Détection de fibroblastes par immunofluorescence : à gauche la fluorescence verte est due à la fluorescéine, et à droite la fluorescence rouge est due à la rhodamine
(www.img.cas.cz/dbc/gallery.html).

II.5.1.2. *Avantages.*

Ces techniques permettent d'identifier un pathogène donné et de calculer son pourcentage par rapport à la flore globale en utilisant un frottis d'un échantillon de plaque.

L'immunofluorescence indirecte est utilisée principalement pour la détection d'*A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, et *T.forsythensis*. Il a été démontré que cette méthode a une sensibilité plus grande que celle de la culture bactérienne pour la détection d'*A.actinomycetemcomitans* et *P.gingivalis*. Des études comparatives ont démontré que cette méthode avait une sensibilité allant de 82 à 100% pour la détection d'*A.actinomycetemcomitans*, de 91 à 100% pour la détection de *P.gingivalis*, et une spécificité allant respectivement de 88 à 92% et de 87 à 89% (Zambon JJ, Bochacki V et al, 1986; Zambon JJ, Reynolds HS et al, 1985).

L'immunofluorescence indirecte présente également une plus grande sensibilité pour la détection de *P.gingivalis* et *T.forsythensis* que les sondes ADN complémentaires de la région hypervariable 16S rRNA des bactéries (Listgarten MA, Wong MY et al, 1995).

II.5.1.3. *Inconvénients.*

La difficulté principale de l'immunofluorescence est d'obtenir la spécificité de la fluorescence observée. Il faut être sûr que la réaction détecte uniquement les bactéries cibles et non pas celles d'autres espèces. Il faut aussi que les anticorps détectent toutes les variantes de l'antigène au sein de l'espèce cible.

D'autre part, le seuil de détection de l'immunofluorescence est de 10^5 bactéries cibles. La capacité de l'immunofluorescence à détecter une bactérie cible n'est pas fiable si l'échantillon en contient moins de 10^5 .

II.5.2. La technique ELISA.

II.5.2.1. Principe.

La technique ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) peut être réalisée selon deux modalités : la fixation d'anticorps ou la fixation d'antigène.

- La fixation d'anticorps (antibody capture): un antigène bactérien « capture » un anticorps monoclonal spécifique auquel est fixé un second anticorps marqué par une molécule rapporteuse.
- La fixation d'antigène (antigen capture): un anticorps de surface de la bactérie « capture » un antigène élaboré spécifiquement pour s'y fixer. A cet antigène est fixé un autre anticorps marqué d'une molécule rapporteuse.

La molécule rapporteuse est révélée ensuite par une réaction enzymatique ayant des produits de dégradation colorés, ce qui permet de mettre en évidence les bactéries. L'intensité de la couleur dépend de la concentration d'antigènes. Le résultat est lu par spectrophotomètre, ce qui permet une grande précision (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005). Mais si on peut mesurer la quantité d'antigènes présents, il est difficile de la relier précisément à la quantité de cellules bactériennes, étant donné que le nombre de marqueurs par cellule est variable.

La fixation d'antigène était le principe de base du test Evalusite® (Kodak), test donnant une coloration semi-quantitative des germes *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, et *P.intermedia*. Ce test a un seuil de détection de 10^5 bactéries pour *A.actinomycetemcomitans* et 10^6 pour *P.gingivalis* : il a une sensibilité basse. Cependant, une étude a montré que le test Evalusite® est efficace pour détecter une colonisation cliniquement significative par les bactéries testées chez les individus à risque de parodontite (Boyer BP, Ryerson CC et al, 1996). Le manque de fiabilité de ce test a toutefois entraîné son abandon en France.

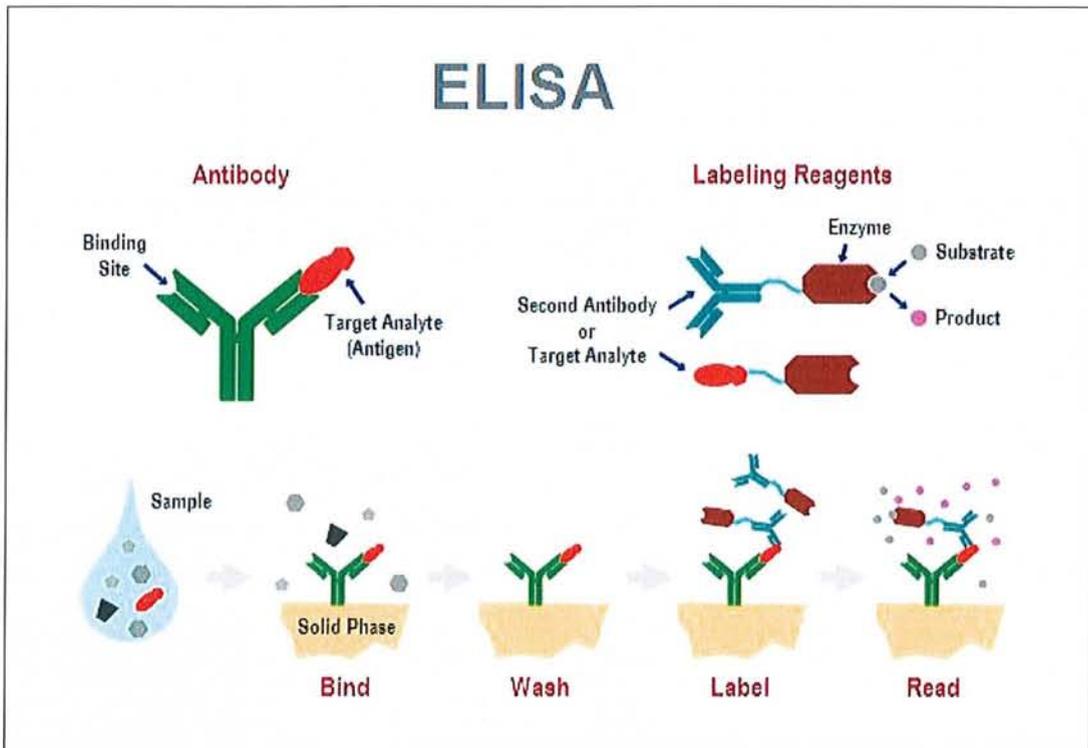


Figure 23 : Principe de la technique ELISA (www.biosystemdevelopment.com/technology.html).

II.5.2.2. Avantages.

Cette méthode permet d'avoir une quantification ou une semi-quantification des bactéries recherchées.

Ces tests donnant des résultats par coloration (comme Evalusite®) sont intéressants car ils peuvent être réalisés entièrement au fauteuil et nécessitent peu de matériel (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

II.5.2.3. Inconvénients.

Ils sont les mêmes que ceux de l'immunofluorescence.

II.5.3. Avantages et inconvénients communs à ces deux techniques.

Les techniques de détection immunologique des pathogènes donne une quantification ou une semi-quantification des microorganismes ciblés. Elles ne nécessitent pas la viabilité des microorganismes, et ne nécessitent donc pas des conditions de prélèvement et de transport draconiennes. Elles ont une sensibilité et une spécificité accrues par rapport à la culture pour certains pathogènes.

Par contre, il faut utiliser des anticorps monoclonaux pour avoir une bonne spécificité, et les seuils de détection ne sont pas significativement plus bas que ceux de la culture. Ces méthodes sont enfin limitées par le nombre d'anticorps testés et ne permettent pas de connaître la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques.

II.6. Identification bactérienne par détection d'activité enzymatique : test BANA.

La BANA (N- α benzoyl-DL-arginine-2-naphtylamide) est un substrat synthétique qui est hydrolysé par une enzyme similaire à la trypsine (trypsin-like). Cette enzyme est elle-même synthétisée par certaines bactéries parodontopathogènes, notamment par *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, et *Treponema denticola*, qui appartiennent au complexe rouge (Socransky SS, Haffajee AD, 1998). L'un des produits de dégradation de la BANA est la β -naphtylamide, qui peut être mise en évidence par une réaction de coloration. La présence des bactéries productrices d'enzyme trypsin-like est ainsi détectée.

Une étude a relié ce test à la « morbidité parodontale », par l'intermédiaire de la profondeur de poche, en considérant que plus une poche est profonde, moins la dent concernée a de chance de « survivre ». Il a été démontré que le test BANA était positif pour 10% des échantillons provenant de poches peu profondes, et qu'il était positif pour 90% des échantillons provenant de poches profondes (7mm ou plus) (Loesche WJ, 1992).

Une autre étude a démontré que la sensibilité de test et sa précision étaient similaires à celles des techniques immunologiques ou des sondes ADN, et supérieures à celles de la culture. Toutefois, une réaction BANA clairement positive indique la présence d'au moins 10^5 bactéries cibles. Le seuil de détection est donc élevé (il se situe de 10^5 à 10^6 bactéries présentes dans l'échantillon). On ne peut pas effectuer de quantification précise, mais un résultat fortement positif suggère la nécessité d'un traitement antibiotique en association du traitement mécanique (Loesche WJ, Lopatin DE et al, 1992).

Les inconvénients de ce test sont que *A.actinomycetemcomitans*, qui appartient aussi au complexe rouge, ne peut être détecté, et que d'autres bactéries peu pathogènes des poches parodontales peuvent aussi être positives à ce test. D'autre part, ce test ne détecte qu'une combinaison de pathogènes peu nombreux. Un résultat négatif n'exclue donc pas la présence d'autres pathogènes parodontaux importants, ou même celle des pathogènes ciblés s'ils sont en nombre réduit.

Il a aussi été démontré que le test BANA ne peut être corrélé au risque de perte d'attache (Beck JD, Koch GG et al, 1990). Il n'a pas non plus été testé sur la détection à long terme des sites en évolution. On ne peut donc pas tirer de conclusion certaine quant à l'utilité de ce type de test.

Ce test est toutefois bon marché et faisable en cabinet.



Figure 24 : Peu de matériel est nécessaire pour effectuer ce type de test en cabinet (visionplumbing.com/product.asp?product_id=87).

Une étude suggère que ce type de test peut être un outil pour contrôler l'efficacité du traitement mécanique (par surfaçage et curetage). En effet, la diminution de l'intensité de la réaction précédait la diminution des symptômes cliniques : diminution de la profondeur de poche, diminution des saignements au sondage, etc. (Yoshie H, Ohtake T et al, 1995)

Les tests Dentocheck® (Butler/Heico Dent), Perioscan®, et Periocheck® sont disponibles sur le marché.

Le test Dentocheck® n'est plus utilisé.

Le test Perioscan® détecte, comme vu précédemment, une enzyme similaire à la trypsine. Un échantillon de plaque sous gingivale doit être prélevé à l'aide d'une curette stérile, puis transféré sur une bandelette contenant de la BANA. La coloration peut alors apparaître et on peut lire le résultat.

Le test Periocheck® est un test de détection d'activité enzymatique, mais ne détecte pas l'enzyme similaire à la trypsine. Il détecte la présence de protéases neutres au sein du fluide sulculaire. Ces protéases ont été mises en cause dans la lyse du collagène, qui est une composante importante de la maladie parodontale (Eley BM and Cox SW, 1995). Ce test requiert l'isolation et le séchage du site. Puis des bandelettes sont placées dans le sulcus à une profondeur de 1mm pendant 30 secondes. La bandelette est ensuite placée sur un gel de

collagène spécifique. La décomposition de ce collagène par les protéases neutres fait virer la couleur du papier au bleu. La lecture du résultat comporte l'intensité de la couleur associée au niveau (la hauteur) auquel elle est parvenue sur le papier. Cela donne une idée de la concentration de protéases neutres dans l'échantillon de départ.

Une étude a montré que les tests Perioscan® et Periocheck® ne reflètent de façon fiable ni l'évaluation clinique de la maladie parodontale, ni le résultat du traitement suivant le diagnostic : la probabilité que les résultats des tests soient en accord avec le résultat du traitement était de 50,4% pour Periocheck® et 52% pour Perioscan® (Hemmings KW, Griffiths GS et al, 1997).

II.7. Techniques de biologie moléculaire.

Les techniques de biologie moléculaire, au contraire des autres méthodes, ne détectent pas des substances codées par les gènes, mais détectent directement ces derniers.

L'ADN est une molécule hélicoïdale formée de deux chaînes de sucres phosphatés, sur lesquelles s'articulent des bases : adénine, guanine, thymine, et cytosine. Les bases sont liées entre elles par des liaisons hydrogènes. L'adénine interagit avec la thymine de l'autre brin, et de même la guanine interagit avec la cytosine. On dit que les deux brins sont complémentaires. L'ADN peut être dénaturé en deux molécules simple brin (monocaténares) par chauffage ou par traitement à pH alcalin élevé (Charon J and Mouton C, 2003).

Le matériel génétique d'une bactérie est composé d'ADN chromosomique (bicaténaire) et d'ARN ribosomal et messager (monocaténaire). L'ADN chromosomique est dispersé dans la cellule et n'est retenu par aucune enveloppe (Holt SC and Progulskén A, 1988). Les techniques diagnostiques utilisant la biologie moléculaire requièrent des fragments d'ADN spécifiques reconnaissant des séquences complémentaires d'ADN bactérien provenant des microorganismes cibles. Pour développer ces techniques, il est donc essentiel de pouvoir extraire l'ADN bactérien des échantillons de plaque et d'amplifier les séquences ADN spécifiques des pathogènes cibles.

Différentes méthodes sont utilisées pour analyser l'ADN bactérien en qualité et en quantité.

Auparavant, des produits chimiques organiques ou des détergents sont utilisés pour détruire les composants cellulaires (la membrane et les protéines), évitant leur interférence dans les réactions chimiques (Smith GLF, Sansone C et al, 1989; Smith GLF, Socransky SS et al, 1989). Le lysozyme est utilisé pour cliver la membrane bactérienne et la protéinase K pour détruire les composants protéiques de la cellule (Leys EJ, Griffen AL et al, 1994). Des techniques physiques comme l'utilisation de la chaleur entraînent l'éclatement de la cellule et la dénaturation des protéines. La centrifugation et les colonnes chromatographiques permettent ensuite l'extraction et la purification de l'ADN. Pour le diagnostic microbiologique parodontal, la plupart des tests développés utilisent la protéinase K ou l'ébullition suivie de la centrifugation (Ting M and Slots J, 1997; Umeda M, Contreras A et al, 1998).

Une fois que l'ADN a été extrait et purifié, différentes méthodes ont été développées pour détecter voire quantifier les pathogènes cibles.

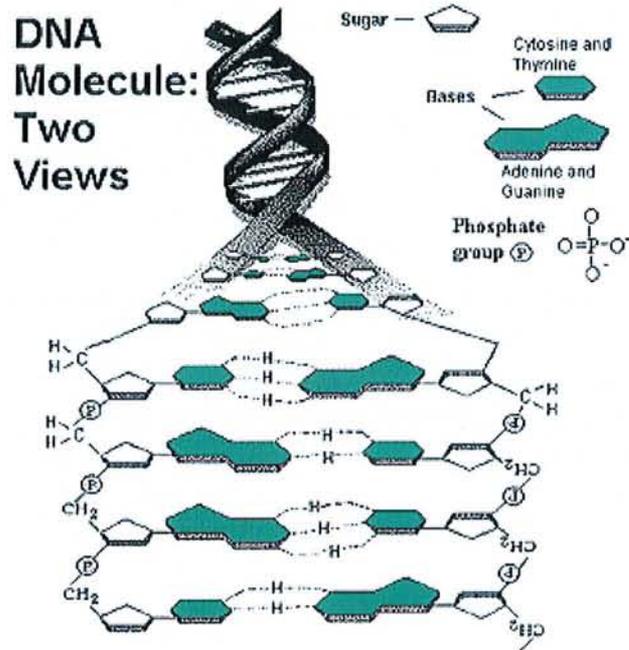


Figure 25 : Structure de la molécule d'ADN

(http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/dna_molecule.html).

II.7.1. Sondes ADN et ARN.

II.7.1.1. Principe.

Une sonde est une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) connue, provenant d'un microorganisme synthétisé artificiellement, et qui est marquée pour pouvoir être détectée après son mélange avec l'échantillon de plaque. La molécule signal ne doit pas interférer avec la réaction d'hybridation.

Les sondes ADN sont des segments d'acide nucléique monobrin, marqués par un enzyme, une molécule fluorescente, ou un radio-isotope, qui peuvent s'hybrider à leur séquence d'acide nucléique complémentaire et ainsi détecter la présence du microorganisme cible. L'hybridation est l'association de deux brins complémentaires d'ADN pour former un ADN double brin. Cette association est très spécifique et ne peut se produire que si les deux séquences sont complémentaires. Toutes les méthodes d'hybridation utilisent des sondes ADN marquées par radioactivité, enzyme, ou fluorescence, qui permettent la visualisation de la séquence cible en se liant à elle (Crockett AO and Wittwer CT, 1998; Dawson MT, Powell R et al, 1996; Lawer G, Lippke J et al, 1990; Loesche WJ, 1992; Nicholl DST, 1994; Tanner ACR, Maiden MF et al, 1998).

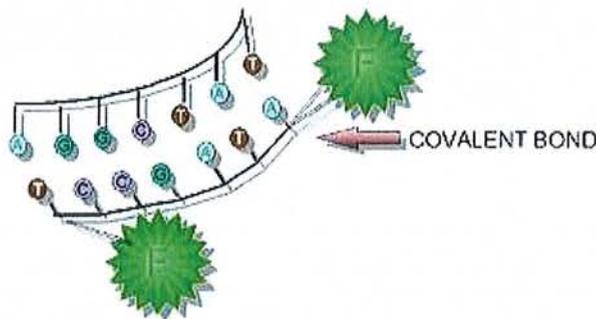


Figure 26 : Exemple d'une sonde marquée par des molécules fluorescentes
(www.urovysion.com/DirectProbes_352.asp).

Les bactéries de l'échantillon sont décomposées, et les doubles brins d'ADN ou d'ARN sont séparés, fragmentés, et fixés à une membrane. Dans le cas des sondes à ARN, les brins d'ARN ribosomal étant présents en milliers d'exemplaires dans chaque bactérie, il n'y a pas besoin d'amplification. Par contre, dans le cas des sondes à ADN, l'ADN bactérien doit parfois d'abord être amplifié par PCR avant de pouvoir être détecté (il n'existe pas

suffisamment d'exemplaires d'une séquence génomique dans un seul échantillon pour permettre une lecture directe).

Les sondes à ADN ou à ARN sont déposées sur la membrane et se fixent aux séquences d'ADN ou d'ARN complémentaires des bactéries par hybridation.

Les résultats sont lus par autoradiographie si les sondes sont radioactives, à la lumière ultraviolette dans le cas des sondes fluorescentes, et sinon à l'aide d'enzymes provoquant une réaction de coloration. Les isotopes radioactifs les plus utilisés sont l'iode 125, le phosphore 32, et le soufre 35 (plus rarement le tritium : ^3H). Dans les marquages froids, la molécule de détection est couramment couplée à la phosphatase alcaline, qui en présence d'un substrat chromogène, le décomposera en résidus colorés.

La technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), utilise des sondes couplées à un agent fluorescent visible à la lumière ultraviolette. Ces sondes peuvent permettre d'identifier des bactéries en s'hybridant à des gènes qui leur sont spécifiques. En outre, cette technique peut permettre de localiser certaines séquences du génome.

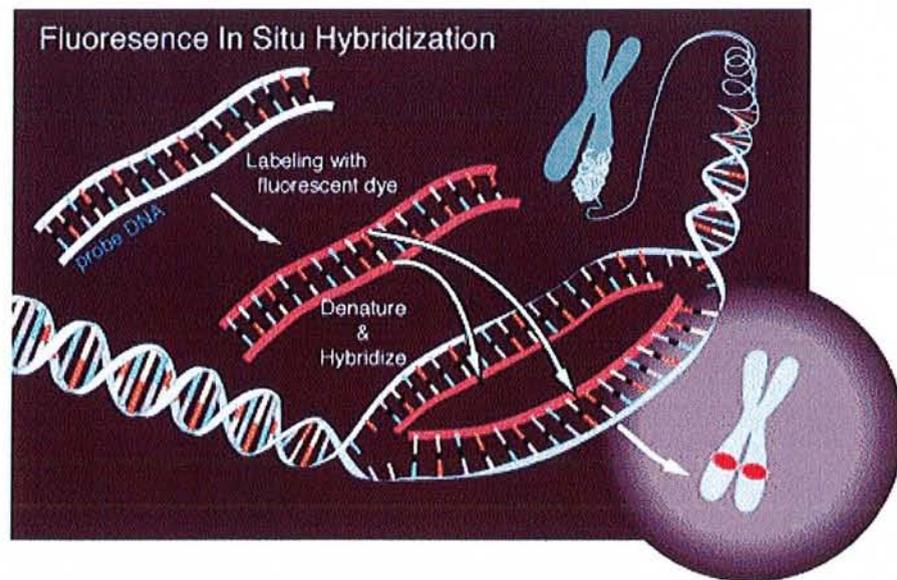


Figure 27 : La technique FISH : elle permet de localiser des séquences génomiques spécifiques
(<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.html>).

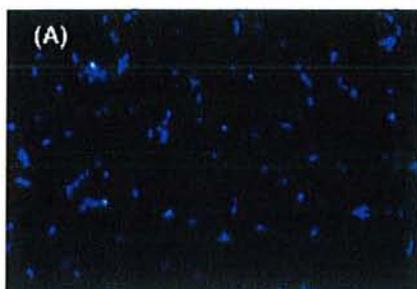


Figure 28 : Détection de bactéries productrices de méthane par la technique FISH
(www.er.ebara.com/research/bio/a1.html).

Les sondes à ADN peuvent cibler un ADN génomique entier ou des gènes individuels. L'ADN génomique entier a plus de risques de réagir avec des microorganismes non ciblés du fait de l'existence de séquences homologues communes à plusieurs espèces bactériennes. En effet, les molécules d'acide nucléique peuvent tolérer un certain nombre de mauvais appariements. Des duplex stables peuvent se former si un nombre important d'autres bases s'apparie correctement. La spécificité des sondes génomiques globales est reconnue comme faible (van Steenbergen TJ, Timmerman MF et al, 1996).

Les sondes les plus couramment utilisées sont donc de 20 à 30 nucléotides (Dawson MT, Powell R, 1996; Nicholl DST, 1994). Ces oligonucléotides sont synthétisés en laboratoire. Leur spécificité est grande si on applique des conditions précises de « stringence » lors des étapes d'hybridation et de lavage.

Des tests utilisant des sondes à ADN sont disponibles dans le commerce (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005):

- PathoTek/DMDx® des laboratoires OmniGene : ce test utilise des sondes d'ADN génomique. Il détecte de façon standard *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, et *P.intermedia*, et peut aussi détecter *T.forsythensis*, *C.rectus*, *T.denticola*, *F.nucleatum*, et *E.corrodens*. Il est surtout employé en Europe et plus particulièrement en Allemagne et en Suisse (Conrads G, 2002).
- Test à l'aide de sondes DNS Meridol 3/8v : cette technique est similaire à la précédente.
- Test MicroDent® : ce test utilise des sondes ADN oligonucléotidiques. Les fragments d'ADN cibles sont ensuite amplifiés par PCR pour pouvoir être identifiés. Ce test détecte principalement *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, *P.intermedia*, et *T.denticola*. Il peut être étendu pour détecter aussi *P.micros*, *F.nucleatum*, *C.rectus*, *E.nodatum*, *E.corrodens*, et les espèces du genre *Capnocytophaga*. Ce test donne des informations semi quantitatives. Différents kits permettent de tester soit un seul, soit plusieurs sites. Ce test a été validé comme étant égal voire supérieur à la culture pour détecter les germes concernés (Eick S and Pfister W, 2002).
- Perio Diagnostics® (Meridol) : Il utilise la même méthode, mais la PCR est effectuée en temps réel, ce qui permet une quantification précise des germes de l'échantillon. Il détecte *A.actinomycescomitans*, *F.nucleatum*, *P.gingivalis*, *P.intermedia* et *T.forsythensis*, et *T.denticola*.
- Test Perio Bac® : il utilise des sondes à ADN et détecte *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, *P.intermedia*, et *T.denticola*.
- IAI Pado Test 4.5® (Institut for Applied Immunology): il utilise des sondes ADN oligonucléotidiques reconnaissant l'ARN ribosomal bactérien. Ce test est donc le seul ne nécessitant pas d'amplification (PCR). Les sondes sont marquées par des isotopes radioactifs. Il détecte *A.actinomycescomitans*, *T.forsythensis*, *P.gingivalis*, et *T.denticola*.

II.7.1.2. Intérêts et limites.

Cette méthode ne nécessite pas que les bactéries soient vivantes, ce qui résout le problème du transport jusqu'au laboratoire. Elle permet la détection de bactéries difficiles à cultiver et à identifier. Elle permet d'atteindre une haute sensibilité grâce à un seuil de détection de l'ordre de 10^3 cellules cibles dans l'échantillon. Par contre, les sondes ne peuvent détecter que des bactéries connues : il faut posséder la sonde correspondant à la bactérie à rechercher. Elles ne permettent pas non plus de détecter la présence de bactéries résistantes aux antibiotiques. Leur utilisation peut tout de même être utile car la culture à partir d'infections polymicrobiennes est difficile. On peut détecter des espèces réputées pour leur résistance grâce aux sondes à ADN et réaliser en deuxième intention une culture et un antibiogramme si nécessaire (Charon J and Mouton C, 2003).

Des sondes d'ADN génomique entier pour la détection de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, et *T.denticola* ont été développées et sont à l'origine de tests diagnostic commercialisés (PatoTek DMDx®). Une étude qui les compare à la culture reporte que ces sondes ont montré une sensibilité et une spécificité respectivement de 96% et 86% pour *A.actinomycetemcomitans*, et de 60% et 82% pour *P.gingivalis* dans des isolats purs de laboratoire (van Steenberghe D, Rosling B et al, 1999). Cependant, lorsqu'elles sont testées sur des échantillons cliniques, la sensibilité et la spécificité sont significativement diminuées, ce qui suggère des réactions « parasites » avec des bactéries inconnues des échantillons de plaque sous gingivale.

Pour éviter ces réactions parasites, des sondes d'oligonucléotides complémentaires des régions variables des gènes bactériens 16S rRNA ont été créées afin de détecter plusieurs pathogènes. Ces gènes 16S rRNA bactériens contiennent deux régions communes à différentes bactéries et de petites séquences de régions variables partagées seulement par des microorganismes spécifiques appartenant à la même espèce ou au même genre (Moncla BJ, Braham P et al, 1990). Leur spécificité est donc meilleure.

Ces sondes sont stables et faciles à préparer grâce à des appareils commercialisés. Cependant, chaque oligonucléotide ne peut être marqué que d'une molécule signal. Leur sensibilité est ainsi moins grande que celle des sondes d'ADN génomique entier qui peuvent être marquées par plusieurs molécules signal (Charon J and Mouton C, 2003).

Ces sondes ont été comparées à la culture à partir d'échantillons cliniques : la sensibilité est de 100% pour la détection de *A.actinomycetemcomitans* et 91% pour *P.gingivalis* quand la concentration est telle quelle pourrait être aussi détectée par la culture (soit plus de 10^3 cellules) (Savitt ED, Strzempko MN et al, 1988). Par contre, les sondes à ADN étaient plus sensibles que la culture pour détecter ces pathogènes dans la population des patients atteints de parodontite. Par exemple, *A.actinomycetemcomitans* a été détecté par sonde à ADN dans 70% des échantillons provenant de cas de parodontite juvénile. Par contre la culture n'a détecté sa présence que dans 10% des cas.

Mais il a été montré que les sondes à ADN sont significativement moins sensibles et moins spécifiques que l'immunofluorescence indirecte pour détecter *P.gingivalis* et *T.forsythus* (Listgarten MA, Wong MY, 1995).

II.7.1.3. *La méthode «DNA-DNA Checkerboard Hybridization» :
une méthode d'identification utilisant les sondes à ADN.*

Décrite pour la première fois en 1994, cette méthode a été développée dans le but de détecter et de déterminer les niveaux de présence de 40 espèces bactériennes communes de la cavité buccale (Socransky SS, Smith C et al, 1994). Cette technique utilise des sondes d'ADN génomique entier marquées à la dioxygénine. Les sondes ADN utilisées sont ordinairement conçues pour détecter chaque espèce à partir d'un seuil de 10^4 cellules, mais peuvent être configurées pour avoir un seuil de détection de 10^3 cellules. Elles sont prévues pour éviter au maximum les réactions croisées avec des espèces, sous-espèces ou variants proches.

L'ADN bactérien est extrait des cellules contenues dans l'échantillon. L'ADN de chaque échantillon est disposé en une ligne spécifique sur la membrane de nylon à l'aide d'un « minislot ». L'ADN est donc fixé sur la membrane en autant de lignes qu'il existe d'échantillons à tester. Les sondes sont alors déposées sur la membrane à l'aide d'un « miniblatter ». Chaque type de sonde (correspondant à une espèce) est déposé selon une colonne, qui croise les lignes d'ADN des échantillons. L'hybridation des sondes à l'ADN de l'échantillon se produit, puis les sondes non hybridées sont éliminées. Le marquage apparaît à chaque intersection de la ligne d'un échantillon où l'espèce est présente avec la colonne de la sonde correspondante.

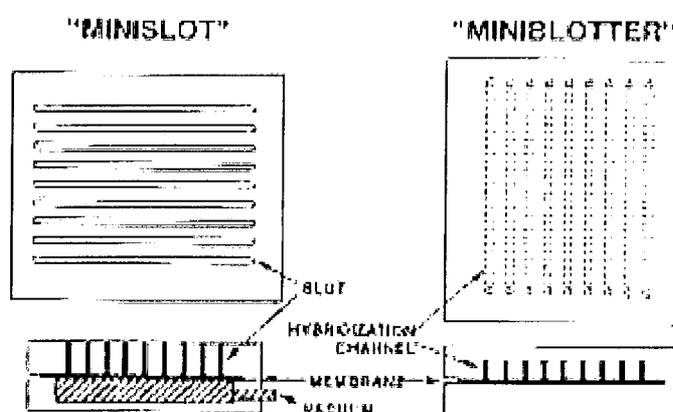


Figure 29 : Principe du DNA-DNA Checkerboard (www.immunetics.com/.../minicheck.html).

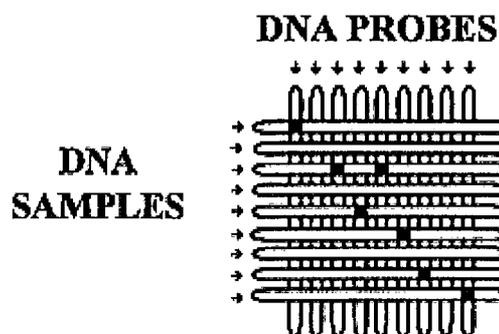


Figure 30 : L'ADN de l'échantillon est disposé horizontalement; les sondes sont déposées verticalement (www.immunetics.com/.../minicheck.html).

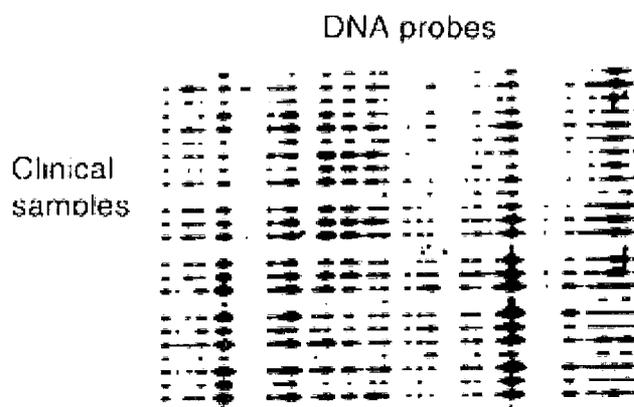


Figure 31 : Exemple d'une feuille de résultat. Un signal (en noir) est émis quand l'ADN de l'échantillon croise la sonde qui lui correspond (<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/full/51/12/1090/FIG1>).

Elle facilite l'analyse de grands nombres d'échantillons de plaque grâce à l'hybridation multiple pour une quarantaine d'espèces bactériennes en un seul test. C'est une technique rapide, avec une bonne sensibilité. Elle permet de surmonter certains inconvénients de la culture : les bactéries n'ont pas besoin d'être vivantes ; on peut détecter certaines espèces difficiles à cultiver ainsi que celles ayant peu de caractères phénotypiques particuliers (qui sont donc difficilement identifiables en culture). Un autre avantage est que l'échantillon entier est utilisé, sans dilution ni amplification (par PCR), si l'échantillon est assez important. Cela évite les problèmes de quantification provoqués par la dilution et l'amplification. Enfin cette méthode fournit des informations quantitatives qui peuvent être utiles (Socransky SS, Haffajee AD et al, 2004).

Cette méthode nécessite des équipements de laboratoire et d'analyse très sophistiqués. Elle ne peut détecter que les espèces recherchées pour lesquelles des sondes ont été préparées.

D'autre part, les sondes sont « spécialisées ». Elles sont optimisées pour fournir de bons résultats dans des échantillons spécifiques (par exemple des échantillons de plaque sous gingivale) et d'une taille déterminée. Elles sont déconseillées pour des échantillons d'un autre type et d'une taille très différente (pour des échantillons beaucoup plus gros par exemple) (Socransky SS, Haffajee AD, 2004).

Cela a empêché la généralisation de ce procédé en tant que méthode diagnostique. Par contre, il est très utile pour les études épidémiologiques et écologiques car il ne nécessite pas de bactéries vivantes, et permet l'analyse de nombreux échantillons de plaque ainsi que l'identification de nombreuses espèces (Haffajee AD, Cugini MA et al, 1997; Haffajee AD and Socransky SS, 2001; Levy RM, Giannobile WV et al, 1999; Papapanou PN, Baelum V, 1997; Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD et al, 2000).

Une étude a comparé cette technique à la culture pour l'identification de la flore sous gingivale. L'utilisation du « DNA-DNA Checkerboard Hybridization » donnait une plus grande prévalence pour la moitié des espèces testées (notamment pour *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *P.nigrescens*, *F.nucleatum*, et *T.forsythensis*) et un comptage significativement plus élevé (au niveau statistique) pour la majorité des espèces. Cependant, les deux techniques étaient relativement concordantes (Papapanou PN, Madianos PN et al, 1997).

II.7.2. Technique de la PCR.

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est la méthode la plus efficace pour amplifier les gènes et l'ARN qui en est transcrit. Développée en 1985, elle est utilisée quasi universellement pour étudier l'ADN et l'ARN obtenus à partir de diverses sources tissulaires.

II.7.2.1. Principe.

Cette technique a pour but de mettre en évidence des séquences d'ADN spécifiques à certaines bactéries. Comme chaque bactérie ne possède qu'un seul exemplaire d'ADN. Les séquences cibles doivent donc être fortement multipliées par la PCR.

Les doubles brins d'ADN bactérien sont tout d'abord séparés. Cette séparation a lieu à 95°C.

On ajoute des amorces marquées (s'hybridant au début de la séquence ADN). Il y en a deux exemplaires, chacun étant complémentaire d'un monobrin. On ajoute également les quatre bases (ou nucléotides) adénine, guanine, thymine et cytosine en excédent, ainsi que de la polymérase Taq. Cette polymérase, isolée pour la première fois en 1988 de l'organisme *Thermus aquaticus*, est thermostable.

L'automatisation de la réaction est rendue possible grâce à l'utilisation de « thermo cycles » (cycles de changement de température).

A 55°C, les amorces marquées peuvent se fixer : c'est la phase d'hybridation. Puis, à 72°C, la polymérase « remplit les espaces vides » : c'est la phase d'extension. Ces deux phases constituent un cycle. Les cycles s'enchaînent jusqu'à épuisement des amorces ou des nucléotides, faisant augmenter de manière exponentielle la quantité d'ADN (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

Le nombre de copies de la séquence cible est obtenu par la formule 2^x , x étant le nombre de cycles de copiage. Ainsi pour une séquence unique à l'origine, on obtient environ un million de copies après vingt cycles de copiage. Par cette technique, même des quantités très faibles d'ADN peuvent donc être mises en évidence après une trentaine de cycles de copiage. Elle permet donc d'obtenir des quantités importantes d'ADN de manière simple et automatisée (Dawson MT, Powell R, 1996; Jankowski JAZ and Polak JM, 1996; Schochetman G, Ou CY et al, 1988; Shibata DK, 1992).

L'ADN séquencé est ensuite visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose et de bromure d'éthidium. On obtient alors un signal qualitatif (Jankowski JAZ and Polak JM, 1996; Neumaier M, Braun A et al, 1998).

POLYMERASE CHAIN REACTION

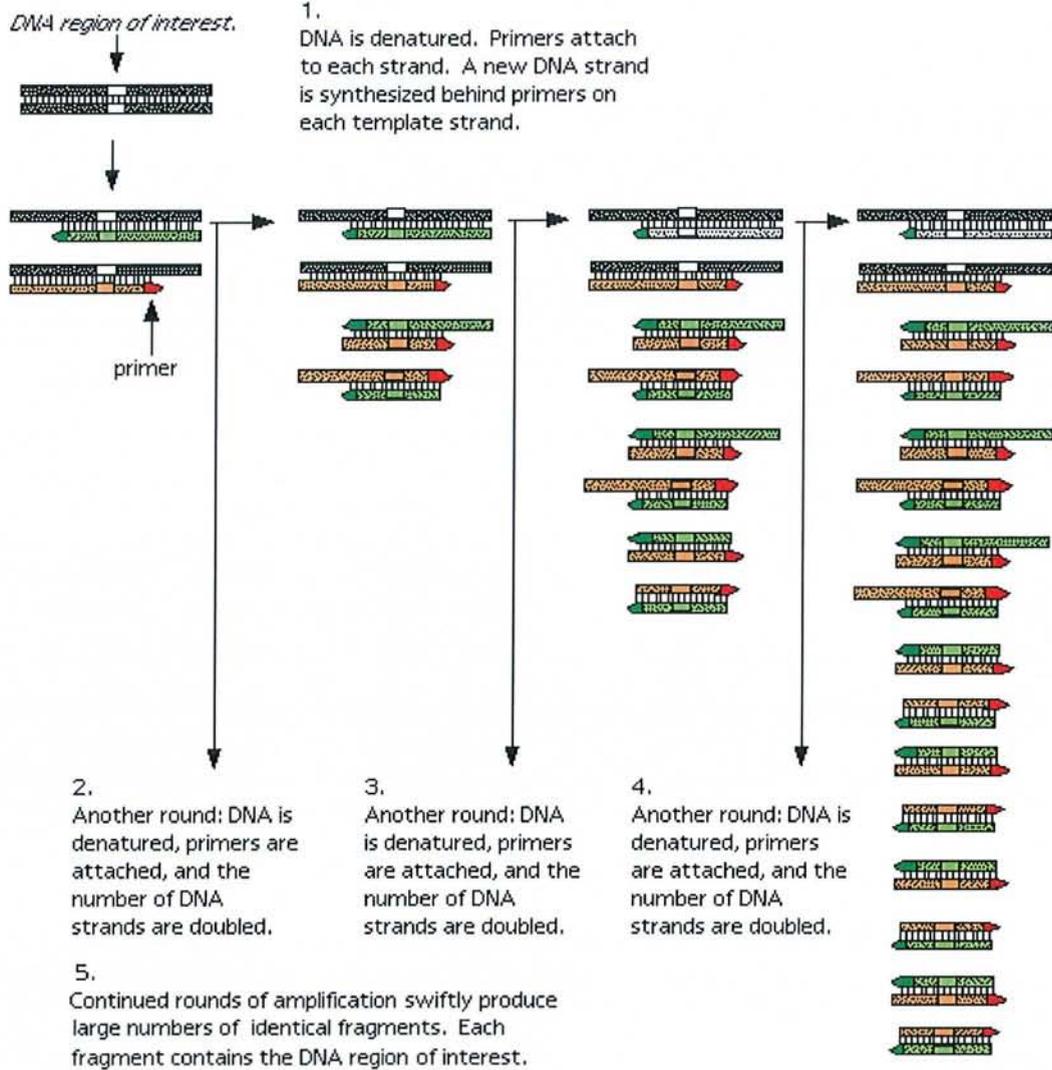


Figure 32 : Principe de la PCR (<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/polymerase.html>).

II.7.2.2. Intérêts et limites.

En amplifiant la molécule recherchée, la PCR est de nature à permettre une sensibilité accrue en abaissant le seuil de détection : 100 cellules cibles dans l'échantillon suffisent pour être détectées (Watanabe K and Frommel TO, 1993).

Bien que la PCR soit une technique très sensible, capable de détecter même une seule copie d'une séquence recherchée (Greenstein G, 1988), ses limitations sont nombreuses.

Des difficultés peuvent survenir lors de l'étude de petites quantités d'ADN, car les ingrédients nécessaires à la réaction (amorces, nucléotides, polymérase Taq) peuvent être épuisés avant que suffisamment de séquences cibles ne soient produites. La spécificité de la réaction dépend de facteurs nombreux, complexes, et liés entre eux : la taille des amorces (en nucléotides), les caractéristiques du thermo cycle, la concentration en sels tampons, etc. Une limite majeure de la PCR est la susceptibilité du processus à la contamination, en particulier quand il s'agit de détecter des séquences rares d'ADN (Gibbs RA, 1990; Neumaier M, Braun A, 1998).

Pour pallier à ces limites, plusieurs types de PCR ont été mis au point. La PCR multiple (ou PCR multiplex) permet l'amplification de plusieurs séquences cibles, en plaçant les amorces nécessaires dans la même réaction (Dangtuan ST and Rudney JD, 1996; Garcia L, Tercero JC et al, 1998; Henegariu O, Heerema NA et al, 1997).

La PCR quantitative permet la quantification des fragments d'ADN détectés par l'utilisation de « témoins » spécifiques représentant une quantité connue (Doungudomdacha S, A. R et al, 2001).

La quantification de l'ADN par la PCR a un intérêt capital dans le diagnostic microbiologique. Elle permet l'analyse de nombreux échantillons assez aisément, permettant une flexibilité interdite par d'autres méthodes conventionnelles qui demandent beaucoup de temps et de travail.

En pratique, beaucoup d'obstacles techniques ont dû être surmontés pour mettre au point une PCR quantitative fiable et reproductible. L'un des principaux obstacles a été la nature même de l'accumulation des produits de la PCR. En effet, la PCR a deux phases. Lors des premiers cycles, les produits s'accumulent de façon exponentielle (phase exponentielle).

Après un moment, la vitesse de formation des produits diminue par épuisement progressif des réactifs (phase de saturation).

Pour obtenir des résultats fiables, la mesure des produits obtenus doit être effectuée pendant la phase exponentielle, car les résultats seraient imprécis en phase de saturation.

A présent, la méthode de choix pour la PCR quantitative est le monitoring constant du taux de produits obtenus à la fin de chaque cycle. Il s'agit de la PCR quantitative en temps réel ou « real time PCR ».

Elle utilise l'activité de la 5'-3'-endonucléase de la polymérase Taq pour détecter les séquences cibles, et une sonde fluorescente est ajoutée au mélange en temps que système de marquage. Pendant la PCR, la sonde se fixe à l'ADN cible, puis la polymérase Taq la clive en fragments plus courts, libérant une fluorescence directement proportionnelle à la quantité de produits générés par la PCR.

Ces mesures constantes en temps réel permettent d'établir des courbes d'augmentation des produits de la PCR et d'effectuer le calcul précis de la quantité d'ADN initial (pour des mesures effectuées lors de la phase exponentielle) (Crockett AO and Wittwer CT, 2001; Meuer S, Wittwer C et al, 2001).

II.7.2.3. Résultats qualitatifs.

Une étude a comparé l'efficacité de la PCR et de la culture pour la détection de *A.actinomycetemcomitans* et *P.gingivalis* dans des échantillons de plaque sous gingivale provenant de patients ayant une parodontite. La PCR était plus précise que les méthodes de culture conventionnelles pour la détection de ces deux pathogènes, et avait une plus grande fréquence de détection de ces deux microorganismes cibles (Riggio MP, Macfarlane TW et al, 1996).

Une PCR utilisant du 16S rARN a aussi été développée pour identifier et déterminer la prévalence de *A.actinomycetemcomitans*, *T.forsythensis*, *C.rectus*, *E.coli*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *P.nigrescens*, et *T.denticola*. Les résultats étaient concordants entre PCR et culture, avec une présence constatée par les deux méthodes, de 28% des échantillons pour *T.forsythensis* à 71% des échantillons pour *A.actinomycetemcomitans*. La plus grande disparité concernait la catégorie des échantillons « PCR positifs » et « culture négatifs ». Cela peut être expliqué par la limite de détection très basse de la PCR, pouvant se situer entre 25 et 100 cellules alors que le seuil de détection de la culture se situe plutôt entre 10^4 et 10^5 cellules de départ (Ashimoto A, Chen C, 1996).

Le test MicroDent®, qui utilise le principe de la PCR multiple pour la détection de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *T.forsythensis* et *T.denticola*, a été comparé avec la culture. Ce test a été capable de détecter *P.gingivalis* et *T.forsythensis* plus fréquemment que la culture. *A.actinomycetemcomitans* a été détecté de manière similaire par les deux méthodes. Les auteurs suggèrent que les techniques utilisant les sondes à ADN et la PCR devraient remplacer la culture en tant que « gold standard » pour le diagnostic microbiologique parodontal (Eick S and Pfister W, 2002).

La plupart des tests utilisant la PCR pour détecter la présence de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, et *T.forsythensis*, utilisent comme amorce des gènes 16S rARN (Avila-Campos MJ and Velasquez-Melendez G, 2002; Choi BK, Park SH, 2000; Darby IB, Hodge PJ et al, 2000; Takamatsu N, Yano K et al, 1999; Takeuchi Y, Umeda M, 2001; Umeda M, Chen C, 1998; Umeda M, Contreras A, 1998). Peu d'analyses par PCR ont utilisé des oligonucléotides dérivés de gènes présents en un seul exemplaire en tant qu'amorce (par exemple, les gènes de la protéine C ou la fimbrilline fimA de *P.gingivalis*, le gène de la leucotoxine lktA de *A.actinomycetemcomitans*, ou encore le gène de la protéase prtH de

T.forsythensis). Les gènes 16S rARN en tant qu'amorces, bien que très spécifiques, ne sont pas appropriés pour une analyse quantitative car il en existe un nombre variable par cellule. Cela empêche donc toute analyse quantitative reproductible. Ces tests par PCR en donnent donc qu'une information qualitative (prévalence) et leur utilisation à des fins diagnostiques et pronostiques est limitée.

II.7.2.4. Résultats quantitatifs.

L'importance de l'analyse quantitative des bactéries cibles a abouti au développement de méthodes de PCR quantitative.

Les premières études utilisaient des PCR « finies » (Doungudomdacha S, A. R, 2001; Fujise O, Hamachi T et al, 1995). Mais cette méthode étudie les produits de la PCR en phase de saturation, sans prendre en compte la phase exponentielle. Ainsi, le taux de produits de la PCR a une faible corrélation avec la quantité d'ADN initiale.

La PCR en temps réel a été développée en réponse à cette limitation.

Cette technique consiste à quantifier les acides nucléiques produits par la réaction de PCR en quantifiant un marqueur fluorescent qui augmente en quantité directement proportionnelle (en phase exponentielle uniquement).

Plusieurs marqueurs fluorescents ont été testés. Le plus simple à utiliser est appelé « SYBR® Green ». Il se lie à l'ADN bicaténaire et la molécule ainsi excitée émet de la lumière. L'inconvénient de ce produit est qu'il se lie à n'importe quel ADN bicaténaire et qu'il peut donc y avoir des réactions parasites aboutissant à une surestimation de la quantité de produits de réaction.

Les sondes à double marquage sont aussi utilisées. Ce sont des oligonucléotides comportant deux molécules : une fluorescente à l'extrémité 5' et une répressive de la fluorescence à l'extrémité 3'. Les sondes seules ne sont pas fluorescentes car la molécule fluorescente transmet son énergie à la molécule répressive et n'émet donc pas de signal. Ces sondes sont conçues pour se lier à une région interne de la séquence amplifiée par la PCR. Lors de la réplication d'un exemplaire de la séquence cible, plus exactement lors de la phase d'extension, la polymérase Taq vient cliver la sonde (par son activité d'exonucléase), libérant la molécule fluorescente. Celle-ci émet alors un signal fluorescent.

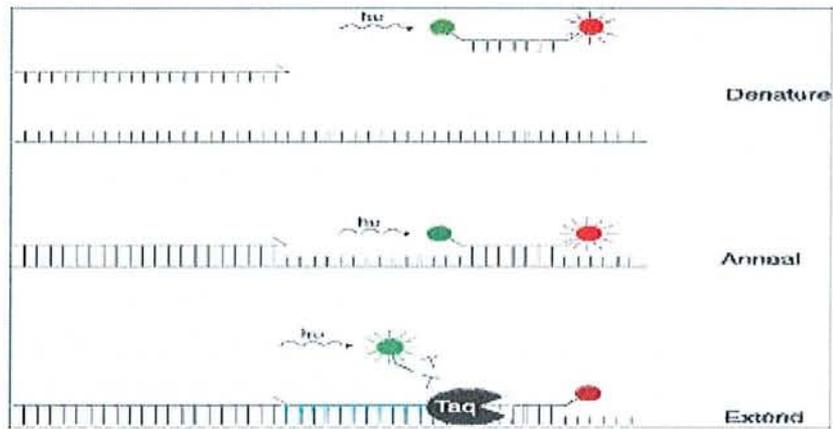


Figure 33 : Au moment de la phase d'extension, chaque sonde à double marquage libère sa molécule fluorescente (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html).

Les « balises moléculaires » peuvent aussi être utilisées. Ce sont des oligonucléotides comprenant eux aussi une molécule fluorescente à une extrémité et une molécule répressive à l'autre extrémité. Ces molécules sont conçues pour adopter une forme de tête d'épingle lorsqu'elles sont libres dans une solution, ceci amenant la molécule fluorescente et son répresseur à proximité. Il n'y a donc pas émission de signal. Ces sondes se lient elles aussi à une région interne de la séquence cible de la PCR. Lorsqu'elles s'hybrident, elles perdent leur structure en tête d'épingle, séparant la molécule fluorescente et son répresseur. Il y a alors émission d'une fluorescence.

Au contraire des sondes à double marquage, ces sondes restent intactes pendant la réplication.

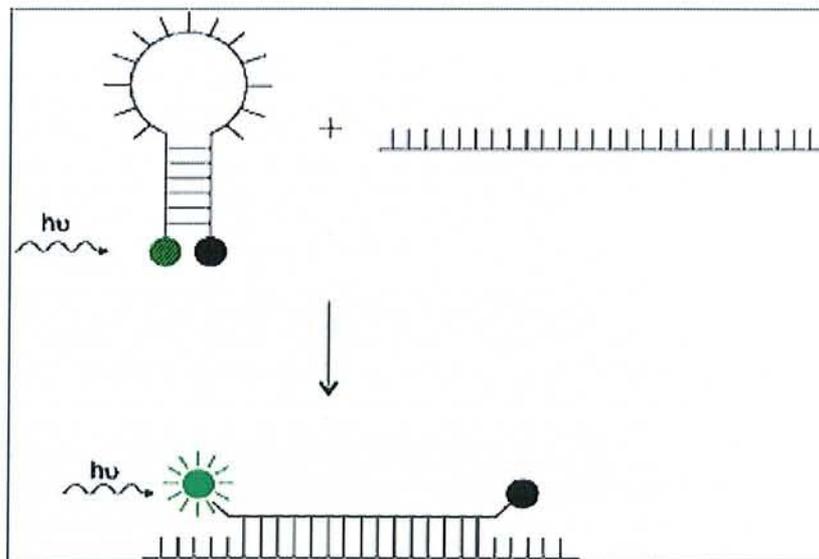


Figure 34 : Les balises moléculaires deviennent fluorescentes une fois hybridées à la séquence cible (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html).

Enfin, il existe des amorces marquées. Elles deviennent fluorescentes uniquement à partir de la phase d'extension. Ces amorces sont de moins en moins utilisées, du fait de la difficulté d'obtenir des amorces avec une spécificité élevée (comme nous l'avons vu précédemment).

La PCR en temps réel peut s'adapter pour devenir une PCR multiple. Il suffit que les molécules signal aient un spectre de fluorescence différent pour chaque type de sonde (une couleur de fluorescence par bactérie cible, par exemple). Grâce à la bonne spécificité des sondes, il y a peu voire aucune réactions parasites.

Avec cette technologie, et en utilisant des gènes présents en un seul exemplaire par cellule, une bonne corrélation entre le signal fluorescent mesuré et le nombre de cellules a été obtenue (Lyons SR, Griffen AL, 2000; Shelbourne CE, Prabhu A et al, 2000). Une étude a tenté de quantifier les pathogènes *A.actinomycetemcomitans* et *P.gingivalis* par une PCR en temps réel ciblant des séquences génomiques présentes en un seul exemplaire par cellule. Cette méthode s'est révélée être d'une spécificité très élevée et parfaitement reproductible pour quantifier ces espèces pathogènes (Morillo JM, Lau L et al, 2003).

Bien que la PCR en temps réel soit une technique ayant une bonne sensibilité, spécificité, et qu'elle soit reproductible, elle requiert du matériel et de la main d'œuvre spécifique, ce qui la rend trop chère pour un diagnostic microbiologique de routine. Elle permet également d'utiliser sans distinction les techniques de prélèvement à l'aide d'une curette ou de pointes de papier (Jervoe-Storm P, AlAhdab H et al, 2006).

La PCR en temps réel devrait jouer un rôle majeur dans le diagnostic microbiologique une fois qu'elle aura été complètement validée par des études et que son coût sera abordable (Sanz M, Lau L, 2004).

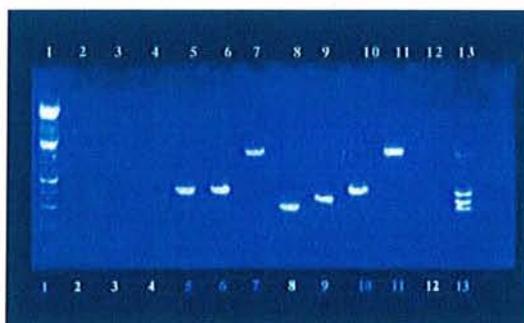


Figure 35 : Résultat d'une procédure de PCR en temps réel (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html).

Partie III

Intérêt clinique et limite du diagnostic microbiologique au cabinet dentaire.

Le diagnostic médical est défini comme le processus (ou le résultat issu de ce processus) d'identification d'une maladie par ses signes, ses symptômes, et le résultat d'examens biologiques. Cependant, ceci n'est pas le seul but du diagnostic médical. Les procédures de diagnostic peuvent aussi être utilisées pour (Mombelli A, 2005) :

- Identifier les personnes susceptibles de développer la maladie (prévention),
- Détecter les stades précoces de la maladie chez des personnes asymptomatiques (diagnostic précoce),
- Classifier la maladie en catégories,
- Prédire la réponse des patients aux traitements (adaptation du traitement),
- Vérifier l'efficacité du traitement et détecter les récurrences (en phase de maintenance).

Le diagnostic microbiologique peut donc en théorie être utile dans toutes les phases du traitement parodontal, de la prévention à la maintenance.

Bien que les études au sujet des différentes applications du diagnostic microbiologique en parodontologie soient encore peu nombreuses, on peut en imaginer différentes applications, tant dans le domaine de la prévention que dans celui du traitement, de la détection, ou de la prévention de la récurrence.

Connaître avec précision l'étiologie de la maladie parodontale est sans conteste un atout pour lutter contre celle-ci. Cela permet de personnaliser la prévention, le traitement, et le suivi, donnant de plus grandes chances de guérison au patient.

Cependant, son utilisation en cabinet par les chirurgiens-dentistes reste encore peu fréquente, sans doute de par son intérêt mal connu et son coût parfois prohibitif. Le prochain chapitre s'efforcera donc de clarifier les avantages offerts par ces techniques diagnostiques ainsi que leurs modalités d'usage.

III.1. Quels types de test, dans quelle situation ?

La culture bactérienne reste la technique de référence pour l'analyse des échantillons prélevés en phase de diagnostic. En effet, seule cette méthode permet d'identifier toutes les bactéries viables présentes et de tester leur sensibilité aux antibiotiques. D'autre part, elle permet une quantification assez précise au dessus du seuil de détection.

Pour vérifier l'efficacité du traitement parodontal, et lors des contrôles de maintenance, la détection par des techniques de biologie moléculaire est préférée. En effet, les bactéries causales sont *a priori* déjà connues. Le but est de contrôler leur diminution ou leur disparition. Ces techniques sont idéales dans ces cas de figures, car on ne contrôle que les bactéries désirées et on obtient une quantification très précise. Cela permet un suivi de bonne qualité.

En phase de maintenance, on peut aussi utiliser des techniques immunologiques pour les tests microbiologiques. Elles permettent de tester les principales bactéries à l'origine des pathologies parodontales, d'obtenir une semi quantification, et ce à un prix plus raisonnable. Cette technique d'identification peut éventuellement représenter une alternative aux techniques de biologie moléculaire lors de la phase de maintenance.

III.2. Intérêt préventif : détection des sujets à risque.

La prévention peut être primaire, secondaire, ou tertiaire.

La prévention primaire consiste à « renforcer la santé ». Il peut s'agir de la vaccination, mais aussi, en odontologie, de l'information, de l'enseignement de l'hygiène buccale, et de mesures prophylactiques. Ces mesures prophylactiques sont soit l'élimination mécanique de la plaque et du tartre, mais aussi l'antibioprophylaxie.

La prévention secondaire consiste à identifier et à traiter de manière précoce des patients déjà malades.

La prévention tertiaire correspond à la guérison et à la prévention de la réapparition d'une maladie déjà traitée et/ou guérie. En parodontologie, il s'agit de la phase de maintenance, qui sera abordée ultérieurement.

III.2.1. Microorganismes endogènes et exogènes.

La plupart des bactéries cultivables présentes chez les sujets atteints de parodontite, font partie de la flore orale normale. Des espèces orales communes peuvent s'accumuler dans la zone sous gingivale et devenir une part importante de la plaque sous gingivale. Ce sont des espèces endogènes. Les parodontites associées avec des bactéries commensales doivent être considérées comme des infections commensales ou opportunistes.

A.actinomycescomitans et *P.gingivalis* ne font pas partie de la flore commensale. Les deux ont les caractéristiques d'espèces exogènes plutôt que d'espèces endogènes (Genco RJ, Zambon JJ et al, 1986). En effet, ces deux espèces ont une faible prévalence chez les sujets avec un parodonte sain.

Ce concept d'espèces exogènes a été renforcé par des études récentes. Une étude utilisant la technique de la PCR a conclu que *P.gingivalis* ne fait pas partie de la flore normale, compte tenu de sa faible prévalence chez les sujets sains (Griffen AL, Becker MR, 1998). Une étude similaire utilisant cette fois des techniques de culture anaérobie, a confirmé la faible occurrence de *P.gingivalis* chez les sujets sains (10,6%) et a mis en évidence son association forte avec les maladies parodontales destructives. De même, *A.actinomycescomitans* n'a été détecté que chez 12,8% des sujets sains. Enfin, une dernière étude utilisant la PCR en temps réel a déterminé la prévalence de ces deux bactéries chez les sujets sains et malades. Elle a montré que la prévalence de *A.actinomycescomitans* et *P.gingivalis* était respectivement de 18 et 10% seulement chez les sujets sains. *A.actinomycescomitans* et *P.gingivalis* peuvent donc être considérés comme de véritables agents infectieux de la cavité orale humaine. Détecter leur présence est donc un enjeu majeur de la prévention de la parodontite. Par contre la présence des espèces endogènes n'a aucun avantage dans la prévention car les parodontites dus à ces germes sont essentiellement le fait de facteurs associés (un système immunitaire déficient par exemple).

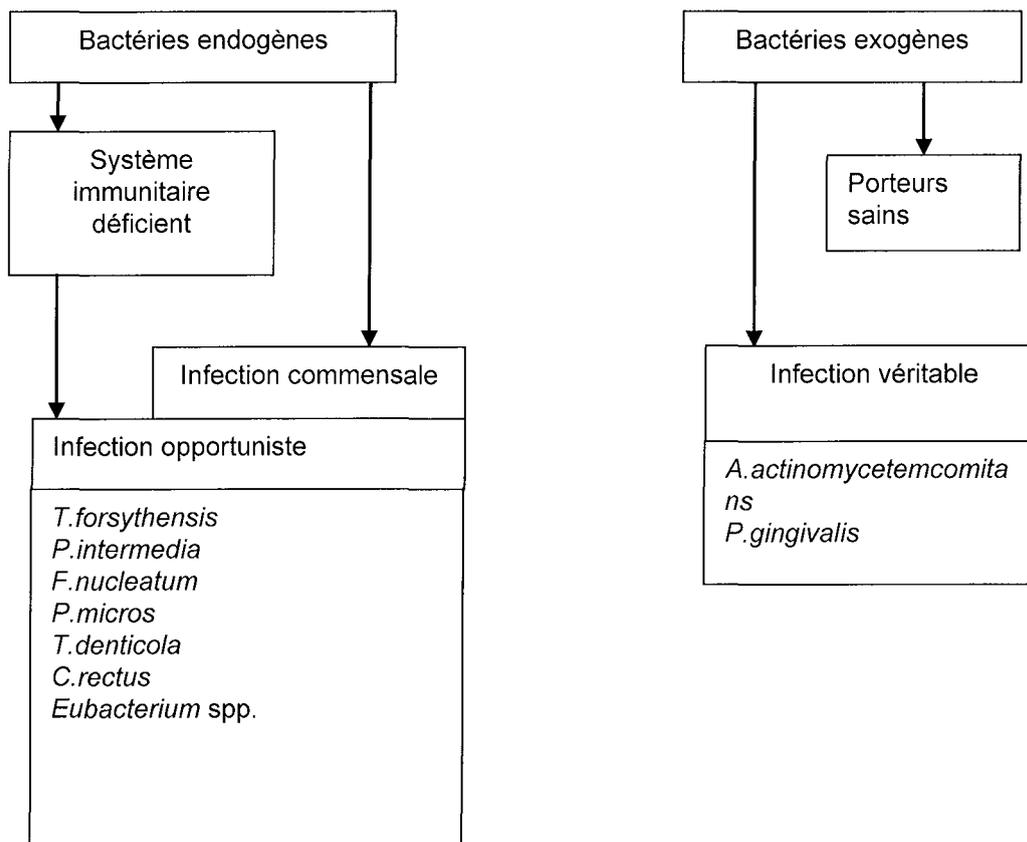


Figure 36 : Différentes infections parodontales sur la base de l'origine des pathogènes (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Il faut noter que les études citées ont été réalisées sur des populations occidentales. Cependant, aucune donnée qui montre que les pathogènes se comportent différemment dans des groupes ethniques différents (Takamatsu N, Yano K, 1999).

Une étude récente réalisée sur des enfants japonais a montré que la présence de *P.gingivalis* ou de la combinaison *P.gingivalis/T.forsythensis* était corrélée à un indice de plaque élevé et à la présence de tartre. La présence de ces bactéries peut donc être un facteur de risque de parodontite agressive.

III.2.2. Les bactéries représentant un facteur de risque.

Comme nous l'avons vu dans la première partie, seules quelques bactéries sont des parodontopathogènes potentiels.

Après un ajustement en fonction de l'âge, de la consommation de tabac, de l'indice de plaque, et des pathologies diabétiques, seuls *P.gingivalis* et *T.forsythus* ont été reconnus en tant que facteurs de risque d'apparition d'une parodontopathie. Ces deux bactéries ont été associées avec un risque augmenté de perte d'attache et de perte d'os alvéolaire (Grossi SG, Genco RJ et al, 1995; Grossi SG, Zambon JJ et al, 1994).

Une étude menée sur des étudiants japonais a montré que la proportion de *T.forsythus* et *C.rectus* était significativement plus haute dans les sites présentant un saignement au sondage et /ou une profondeur de poche supérieure à 3,5 mm. Il en a été conclu que ces deux bactéries pourraient être utilisées comme des marqueurs de risque pour l'apparition d'une parodontite agressive (Suda R, Kobayashi M et al, 2004).

Des études longitudinales ont été menées sur la présence de *A.actinomycescomitans* et la progression et l'initiation d'une parodontite agressive. Lors du World Workshop de 1996, il a été reconnu que la présence de cette bactérie chez les jeunes patients est un facteur de risque de développement d'une maladie parodontale (Offenbacher S and Zambon JJ, 1996).

Par contre, aucune conclusion n'a pu être donnée quant au risque chez les adultes, jusqu'à récemment.

Des études menées sur des adolescents ont montré que la présence sous gingivale de *A.actinomycescomitans* entraîne une progression de la maladie. Mais les patients de ces études n'avaient pas accès aux soins, ce qui rend toute interprétation difficile (Timmerman MF, Van der Weijden GA et al, 2000; Timmerman MF, Van der Weijden GA et al, 2001).

Dans une autre étude réalisée sur des recrues de l'armée, un nombre significatif d'échantillons positifs à cette bactérie ont été prélevés sur des sujets présentant une maladie « active » dans les 12 mois suivants. Cependant, il n'y avait pas de différence statistique au niveau des patients, ce qui a poussé les chercheurs à conclure que la présence de cette bactérie n'est pas un facteur de risque chez l'adulte jeune (Muller HP, Eger T et al, 1997).

Un rapport récent d'une expérience menée sur l'île de Java a apporté un éclairage différent sur le rôle de *A.actinomycescomitans* en tant que facteur de risque. Cette étude a commencé en 1987, par l'examen de tous les sujets âgés de 15 à 20 ans d'un village, ce qui représentait 255 personnes. Ils ont été réexaminés en 1994, puis en 2002 (il ne restait plus que 128 sujets). Les sujets étaient alors âgés de 30 à 35 ans. Cette étude a abouti à la conclusion que *A.actinomycescomitans* est un facteur de risque de l'initiation de la parodontite. Il est intéressant de remarquer que seule sa présence sous-gingivale a une valeur prédictive de l'apparition d'une parodontite, et non sa présence sur les muqueuses (Van der Velden U, Abbas F et al, 2006).

La présence et la quantité de spirochètes a été associée à un risque accru de parodontite (Listgarten MA and Levin S, 1981). Cela doit être tempéré par le fait que les spirochètes sont aussi augmentés quand les patients ont une mauvaise hygiène bucco-dentaire (Dahlén G, Manji F et al, 1992).

On peut se demander si la parodontite est une maladie transmissible. Des études ont montré qu'il existait le plus souvent un seul clone de *A.actinomycescomitans* et/ou de *P.gingivalis* chez un patient atteint de parodontite (Haubek D, Ennibi OK et al, 2002). Mais de nombreux clones différents ont été identifiés dans la population atteinte de maladie parodontale, ce qui laisse à penser que la parodontite ne se propagerait pas à la manière d'une épidémie.

Des études ont montré que *A.actinomycescomitans* et *P.gingivalis* étaient transmissibles horizontalement (par contact), en particulier entre individus d'une même famille (Okada M, Hayashi F et al, 2004). Par contre, il n'existe encore aucune preuve que la transmission entre individus soit ou non un facteur de risque de développer une parodontopathie (Sanz M, Quirynen M et al, 2005).

III.3. Intérêt diagnostic.

Il est rare qu'une gingivite, une parodontite, ou une récession soit uniforme et généralisée. Certaines dents sont plus atteintes que d'autres, voire ne présentent aucun signe de la maladie. Selon la nouvelle classification de parodontopathies de 1999 (Armitage CC, 1999), une pathologie est localisée quand elle atteint jusqu'à 30% de toutes les faces des dents. Une atteinte plus étendue est qualifiée de généralisée. Le diagnostic parodontal doit être réalisé dent par dent, site par site. Ainsi, chaque dent est sondée en six points, pour examiner la profondeur de poche, les atteintes de furcation, l'importance de l'inflammation, etc. Il est donc important de réaliser les tests bactériologiques au niveau des sites les plus atteints pour avoir des résultats pertinents.

III.3.1. Détection des parodontopathies.

Le diagnostic microbiologique n'est pas nécessaire pour diagnostiquer une parodontopathie ou d'une gingivite. Il n'est pas nécessaire de confirmer ce qui est révélé facilement par un simple sondage (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Cependant, il est intéressant de réaliser un test microbiologique à l'étape du diagnostic. En effet, de nombreux microorganismes peuvent faire partie de l'étiologie des pathologies parodontales. L'identification de la flore pathogène permet l'adaptation du futur traitement et donne une idée du pronostic (Sixou M, 2003).

III.3.2. Prédiction du type de parodontopathie.

Une étude relativement récente a essayé de déterminer si la présence ou l'absence de certaines bactéries parodontopathogènes pouvait distinguer les sujets atteints de parodontite agressive de ceux atteints de parodontite chronique (Mombelli A, Casagni F et al, 2002). Ces pathologies étaient anciennement nommées, respectivement, parodontite juvénile et parodontite de l'adulte. Ces dénominations ont été abandonnées étant données les grandes variations d'âge des sujets atteints. La parodontite chronique est caractérisée par une perte lente ou modérée d'attache et d'os. La parodontite agressive est caractérisée par une destruction osseuse et une perte d'attache rapide, ainsi que par une transmission familiale (Lang N, Barthold PM et al, 1999).

Les paramètres microbiologiques n'étaient pas les premiers critères de distinction entre les deux pathologies. Cependant il a été noté que les sujets atteints de parodontite agressive présentaient généralement, mais pas systématiquement, des proportions élevées de *A.actinomycetemcomitans* (et dans certaines populations, également de *P.gingivalis*) dans la plaque sous gingivale (Lang N, Barthold PM, 1999).

Une différence étiologique peut être importante, si une thérapie spécifique peut être dirigée directement contre les agents étiologiques concernés.

Les microorganismes étudiés étaient :

- *A.actinomycetemcomitans* : et plus spécifiquement l'absence ou la présence du gène promoteur de la leucotoxine, et du sérotype b ;
- *P.gingivalis* ;
- *P.intermedia* ;
- *T.forsythensis* ;
- *C.rectus*.

L'étude a déterminé que :

- Les sujets souffrant de parodontite agressive étaient plus souvent positifs pour la présence de *A.actinomycetemcomitans* que négatifs, et inversement pour les sujets atteints de parodontite chronique ;
- Les variants de *A.actinomycetemcomitans* possédant le gène promoteur de la leucotoxine étaient uniquement présents chez les sujets atteints de parodontite agressive (mais pas chez la totalité des sujets) ;
- *A.actinomycetemcomitans* de sérotype b est présent dans la même proportion de sujets dans les deux pathologies ;
- Les sujets atteints de parodontite agressive sont plus souvent positifs que négatifs pour la présence de *P.gingivalis*. Les résultats sont beaucoup plus aléatoires pour les sujets atteints de parodontite chronique.
- *P.intermedia* est présent légèrement plus fréquemment chez les sujets atteints de parodontite agressive que chez ceux atteints de parodontite chronique.
- Les résultats sont contradictoires concernant *T.forsythensis*.
- Les résultats sont aussi contradictoires pour *C.rectus*.

Seul *A.actinomycetemcomitans* semble être potentiellement un facteur d'identification. Cependant, un sujet positif pour la présence de cette bactérie a beaucoup plus de chance de souffrir de parodontite chronique que de parodontite agressive. La présence ou l'absence de bactéries citées précédemment ne peut pas différencier les sujets atteints de l'une ou l'autre des pathologies. Seul le variant d'*A.actinomycetemcomitans* ayant le gène promoteur de la leucotoxine est présent uniquement chez les sujets atteints de parodontite agressive. Par contre, une grande proportion des sujets atteints de cette pathologie est négative pour ce variant (Mombelli A, Casagni F, 2002).

Malgré ces résultats peu encourageants, il faut noter que le diagnostic différentiel entre ces deux pathologies est lui-même difficile. Il existe une grande variabilité de la sensibilité et de la spécificité des paramètres mesurés pour établir le diagnostic (Mombelli A, Casagni F, 2002).

III.3.3. Pronostic.

Il existe des facteurs de pronostic généraux et locaux. Voici une liste non-exhaustive des facteurs influant sur le pronostic parodontal (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

Les facteurs généraux sont :

- L'état de santé général du patient, sa résistance, son statut immunitaire,
- Les risques génétiques, systémiques et acquis,
- Les causes et la forme de progression de la parodontite,
- L'âge en comparaison avec la perte d'attache,
- La régularité du maintien,
- La motivation du patient, sa coopération quant au maintien d'une bonne hygiène bucco-dentaire.

Les facteurs locaux sont :

- La morphologie dentaire et radiculaire, les anomalies de position,
- La quantité et la composition microbienne du biofilm,
- La vitesse de formation de la plaque, indépendamment de la qualité et de la fréquence du brossage,
- La localisation, la profondeur et l'activité des poches,
- Les atteintes de furcation,
- L'étendue de la perte d'attache,
- L'attache résiduelle existante,
- La forme de la perte osseuse (horizontale ou verticale),
- La mobilité dentaire par rapport à la perte osseuse,
- La mobilité dentaire par rapport au traumatisme occlusal.

Bien qu'il soit évident que le pronostic ne puisse être déterminé uniquement d'après les facteurs microbiologiques, quelques tendances ont été répertoriées.

III.3.3.1. Pronostic lié à la présence de *A.actinomycetemcomitans*.

La présence de *A.actinomycetemcomitans* chez les patients atteints de parodontite agressive localisée, a été identifiée comme un facteur de risque de réponse faible voire absente au traitement (Christersson LA, Slots J et al, 1985).

Une mauvaise réponse au traitement de la parodontite chronique a aussi été associée à plusieurs espèces bactériennes. La persistance de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, et *T.forsythensis* après un traitement mécanique a été corrélée avec une amélioration médiocre du saignement au sondage et de la profondeur de poche (Renvert S, Wikström M et al, 1990; Takamatsu N, Yano K, 1999; Winkel EG, Van Winkelhoff AJ et al, 1998), ainsi qu'avec une future perte de hauteur d'os alvéolaire (Chaves ES, Jeffcoat MK, 2000).

III.3.3.2. Pronostic lié à la présence de *T.forsythensis*.

Une étude longitudinale a été réalisée sur 2 à 5 ans, sur des sujets non ou peu atteints par la parodontite. Des examens ont été réalisés au départ, puis tous les ans. Il a été démontré en particulier que les sujets porteurs de niveaux détectables de *T.forsythensis* avaient une perte d'attache augmentée, qu'ils avaient les proportions les plus élevées de sites avec perte, et perdaient en moyenne deux fois plus de dents que les patients négatifs pour cette bactérie (Machtei EE, Hausmann E et al, 1999).

Une autre étude longitudinale a été réalisée sur un temps plus court (un an), et sur des sujets atteints de parodontite établie. En l'absence de traitement, les sujets atteints de parodontite (déjà établie) et positifs pour *T.forsythensis* ont 7 fois plus de risque d'augmentation de profondeur de poche que ceux négatifs pour cette bactérie (Machtei EE, Dunford R et al, 1997).

III.3.3.3. *Pronostic lié à la présence de P.gingivalis.*

Une étude a essayé de déterminer si la persistance de certaines bactéries était associée à une perte osseuse dans le cas de l'ensemble des parodontites réfractaires au traitement. Elle a été réalisée sur des patients atteints de parodontites réfractaires au traitement : ils avaient été traité pour une parodontopathie dans les deux années précédentes et présentaient toujours des profondeurs de sondage importantes.

La présence de *P.gingivalis*, *P.intermedia*, et *A.actinomycescomitans* a été testée avant et six mois après le traitement. Seule la présence persistante de *P.gingivalis* a été associée clairement avec une perte osseuse progressive après traitement.

III.4. Intérêt thérapeutique : adaptation du traitement en fonction des résultats de tests.

Les concepts d'espèces endogènes et exogènes vus précédemment ont une implication importante dans le but et la stratégie du traitement parodontal. Les pathogènes endogènes doivent être réduits au sein des sites sous gingivaux, mais les pathogènes exogènes peuvent et doivent être éliminés totalement chez les sujets infectés (Van Winkelhoff AJ, Rams TE et al, 1996).

Le traitement de base de la parodontite est toujours le même quoi qu'il arrive. Il s'agit d'une élimination mécanique du biofilm bactérien, d'une part par le praticien qui va effectuer un nettoyage professionnel des surfaces dentaires, éventuellement un curetage de l'épithélium de poches, et d'autre part par le patient, qui par l'apprentissage de techniques efficaces d'hygiène bucco-dentaire, va éviter la recolonisation bactérienne.

La thérapie parodontale comprend donc plusieurs étapes (toutes ne sont pas forcément nécessaires) (American Academy of Periodontology, 2000):

- Information du patient et formation à l'hygiène bucco-dentaire quotidienne, qui aboutit à une modification de son comportement,
- Détartrage et surfaçage efficaces, dans le but d'éliminer les dépôts microbiens et les imperfections radiculaires pouvant servir de réservoir de pathogènes,
- Utilisation d'antibiotiques topiques et /ou systémiques,
- Élimination ou correction des restaurations défectueuses et des autres facteurs locaux qui pourraient interférer avec les actes d'hygiène bucco-dentaire ou être des sites de rétention de plaque,
- Chirurgie parodontale,
- Avulsion des dents sévèrement atteintes,
- Corrections occlusales,
- Maintenance parodontale et réévaluation régulière.

P.gingivalis, *T.forsythusensis*, et *T.denticola* sont les bactéries les plus affectées par le traitement mécanique. Elles ont en général un niveau indétectable après traitement (Ramseier CA, 2005). Or il s'agit des principaux microorganismes pathogènes responsables des parodontites. Le traitement mécanique, ainsi que la coopération du patient dans son hygiène quotidienne, est donc à la base de tout traitement parodontal.

Cependant, il est difficile de déterminer dans quels cas les autres composantes du traitement doivent être utilisées. Le diagnostic microbiologique pourrait en cela être une aide, en particulier pour ce qui est de déterminer la nécessité et les modalités d'une antibiothérapie.

III.4.1. Objectif du traitement.

Il est différent selon que l'infection est due à des microorganismes endogènes ou exogènes. Les bactéries exogènes doivent être éliminées alors que les bactéries endogènes doivent être réduites en nombre.

La conséquence thérapeutique est que les microorganismes exogènes sont certainement facilement éliminables de la flore, ce qui permettrait une amélioration de l'état clinique plus importante et fiable, par rapport à la réduction de microorganismes endogènes (Teles RP, Haffajee AD et al, 2006).

Dans le cas d'une pathologie causée par des microorganismes endogènes, le but n'est donc pas d'éliminer toutes les bactéries, mais de diminuer leur niveau pour qu'il s'approche le plus possible de niveaux et de proportions retrouvés dans l'état de santé parodontal.

Des études ont été réalisées sur des patients infectés par *A.actinomycescomitans*. La thérapie consistait dans chaque cas en un traitement mécanique associé à une antibiothérapie adjuvante (à base d'une association d'amoxicilline et de métronidazole). Ces études, réalisées par le même groupe de chercheurs, ont montré que cette thérapie entraînait l'élimination de ce pathogène. De même l'élimination de *A.actinomycescomitans* provoquait une grande amélioration de l'état clinique. Très peu de patients ont été re-contaminés dans les deux années suivantes et leur état clinique était stabilisé (Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ et al, 1994; Van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP et al, 1989; van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, 1992).

Une étude a analysé l'efficacité d'une thérapie combinée pour éliminer *P.gingivalis* chez les sujets ayant une parodontite réfractaire au traitement. La thérapie consistait en une antibiothérapie systémique (amoxicilline/acide clavulanique : Augmentin®), une administration intrasulculaire de povidone iodine et des bains de bouche à la chlorhexidine deux fois par jour. Il faut remarquer que les patients avaient tous reçu auparavant un traitement mécanique. *P.gingivalis* n'était ensuite plus détectable chez 10 des 11 patients initialement positifs de l'expérience. Cette absence de détection était associée à un gain d'attache significatif. Chez trois patients, *P.gingivalis* ou d'autres *Bacteroides* à pigmentation noire étaient toujours présents après la thérapie et ne présentaient aucune amélioration clinique (Collins JG, Offenbacher S et al, 1993).

Malgré le fait que *T.forsythensis* et *P.intermedia* appartiennent à la flore endogène, l'élimination de ces espèces a aussi été étudiée. Six mois après une thérapie consistant en un

traitement mécanique et une administration systématique de métronidazole, *T.forsythensis* était indétectable chez 17 sujets sur 27 initialement. De même *P.intermedia* était indétectable chez 14 sujets sur 21 initialement. Après la thérapie, 6 patients étaient négatifs pour *T.forsythensis*, *P.gingivalis*, et *P.intermedia*, et présentaient la plus grande réduction de profondeur de poche, ainsi que le plus grand gain d'attache (Winkel EG, Van Winkelhoff AJ et al, 1997).

Une autre étude reporte qu'après un traitement avec une combinaison d'amoxicilline et de métronidazole, 14 patients sur 22 avaient des niveaux indétectables de *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, et *A.actinomycetemcomitans*, et un niveau de *P.intermedia* inférieur à 5% des bactéries viables. Les 8 autres patients présentaient les poches les plus profondes, un mauvais niveau d'attache, et un mauvais indice de plaque et de saignement (Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, 1998).

Cependant, une étude récente n'a pas réussi à prouver que l'élimination complète des microorganismes, qu'ils soient endogènes ou exogènes, apportait une plus grande amélioration clinique que leur diminution. Il faut tout de même noter que les analyses ont été effectuées d'après 28 sites par sujet, par la technique « DNA-DNA checkerboard hybridization ». Cette technique étant très sensible, les résultats avaient plus de chance d'être positifs. De même, la multiplicité des sites testés augmentait les chances d'avoir un résultat positif pour un individu. Cela peut éventuellement expliquer la discordance de cette étude avec celles citées précédemment (Haffajee AD, Teles RP et al, 2006).

Plus concrètement, les tests microbiologiques permettent de contrôler l'efficacité de la thérapie en vérifiant l'élimination ou la diminution de la flore pathogène, selon le but souhaité.

III.4.2. Le besoin de traitement.

Du point de vue microbiologique, le but du traitement parodontal est de supprimer l'infection par les bactéries pathogènes ou exogènes, et de diminuer la colonisation par les bactéries endogènes.

Le procédé est-il toujours identique pour parvenir à ce but ? Le besoin de soin est-il le même pour tous les patients ?

Du fait même que certains patients réagissent plus ou moins bien à la thérapie classique (détartrage/surfaçage), on peut supposer que leurs besoins en antibiothérapie, ou chirurgie, seront différents.

Une étude a montré que les soins nécessaires pour atteindre le but microbiologique fixé varient beaucoup selon les individus (Dahlén G, Wikström M et al, 1996). Le but du traitement mis en place était de supprimer la présence de *A.actinomycescomitans* et de *P.gingivalis*, et de diminuer la proportion de *P.intermedia* à moins de 5% des bactéries vivantes des échantillons.

L'étude a été effectuée sur seize patients atteints de parodontite, présentant au moins trois sites avec une profondeur de poche supérieure ou égale à 6mm.

Le traitement parodontal a été découpé en trois phases. La première phase consiste en un détartrage, un surfaçage, et un curetage du tissu de granulation des poches. La deuxième phase consiste à répéter ce traitement ou à effectuer une chirurgie parodontale. La troisième étape est une chirurgie parodontale combinée à une antibiothérapie systémique (par tétracycline).

Un test microbiologique est effectué après chaque phase pour voir si le but a été atteint. S'il ne l'a pas été, on passe à la phase suivante. Il n'est donc pas obligatoire de réaliser toutes les phases du traitement. Si les bactéries cibles ont été éliminées après la première phase, il est inutile de réaliser les suivantes. Utilisés de cette façon, les tests microbiologiques peuvent éviter à la fois le sous- et le surtraitement.

Cette étude a montré que le besoin de soins est très différent selon les individus, et qu'il ne dépend pas des bactéries présentes initialement.

III.4.3. L'antibiothérapie.

L'antibiothérapie a pour but de renforcer le traitement parodontal mécanique, et d'aider les défenses de l'hôte à se défendre contre l'infection en tuant les microorganismes qui persistent dans les poches après ce traitement.

En effet, les pathogènes peuvent échapper au traitement mécanique de par leur capacité à envahir les tissus parodontaux et des structures dentaires (telles que les tubulis et le cément) se rendant ainsi inaccessibles à l'instrumentation, ou du fait d'un défaut des défenses de l'hôte.

L'échec de certains traitements antibiotiques, à cause de la présence ou du développement de souches résistantes est un problème émergent (Haffajee AD, Socransky SS et al, 2003; Van Winkelhoff AJ, Herrera GD et al, 2000).

III.4.3.1. Les molécules antibiotiques utilisées.

Les tests réalisés avant antibiothérapie identifient les espèces pathogènes (surtout la présence de *A.actinomycetemcomitans* et *P.gingivalis*) et donnent des indications pour le choix d'un antibiotique. Voici une liste non exhaustive des molécules les plus couramment prescrites pour l'antibiothérapie adjuvante en parodontologie (Wolf HF, Rateitschak EM, 2005) :

- Tétracyclines (bactériostatiques) : tétracycline HCl, doxycycline HCl, minocycline HCl.
- Pénicillines (bactéricides) : amoxicilline, amoxicilline et acide clavulanique (Augmentin®).
- Nitroimidazoles (bactéricides) : métronidazole, ornidazole.
- Macrolides (bactéricides) : azithromycine, spiramycine, spiramycine et métronidazole (Rodogyl®)
- Lincosamides (bactériostatiques/bactéricides) : clindamycine
- Quinolones (bactéricides) : ciprofloxacine, oxofloxacine

A.actinomycetemcomitans n'est pas sensible au métronidazole si celui-ci est utilisé en monothérapie. De même, la clindamycine est souvent inefficace contre ce microorganisme (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005). Et les patients présentant un fort taux de bactéries productrices de β -lactamase ne seront pas soumis à un traitement uniquement à base de pénicillines.

L'antibiotique utilisé doit donc être choisi en fonction du résultat des tests microbiologiques effectués. Voici un tableau décrivant les molécules antibiotiques à utiliser en fonction des microorganismes présents et des caractéristiques du patient.

Tableau 3 : antibiothérapie en fonction des microorganismes présents (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Indication	Thérapie antibiotique
<i>P.gingivalis</i>	Métronidazole
<i>T.forsythisis</i>	Métronidazole
Espèces de <i>Treponema</i>	Métronidazole
Anaérobies à gram négatif, absence de <i>A.actinomycetemcomitans</i>	Clindamycine
Infection non spécifique	Doxycycline ou spiramycine
<i>A.actinomycetemcomitans</i> ou <i>P.gingivalis</i> avec un nombre élevé de pathogènes à gram positif	Métronidazole + amoxicilline
<i>A.actinomycetemcomitans</i> , hypersensibilité à l'amoxicilline	Métronidazole + céfuroximaxétille
<i>A.actinomycetemcomitans</i> , hypersensibilité aux β -lactamines, présence de bactéries entériques susceptibles	Métronidazole + ciprofloxacine

Le dosage des antibiotiques dépend d'autres facteurs (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005):

- La susceptibilité des pathogènes (antibiogrammes),
- La sévérité de l'infection,
- La masse corporelle du patient (les doses standard doivent être ajustées chez les patients en surpoids ou très maigres),
- Les autres médicaments du patient.

Il faut remarquer que l'efficacité du traitement antibiotique ne dépend pas uniquement de l'efficacité de la molécule sur les microorganismes cibles. Il dépend également :

- De la liaison de la molécule aux tissus,
- De la liaison, consommation, ou dégradation de la molécule par des microorganismes non ciblés,
- De la protection des microorganismes cibles par le « phénomène de biofilm » (interactions bactériennes) de la plaque dentaire,
- Et de l'efficacité des défenses de l'hôte.

III.4.3.2. Etudes cliniques.

Il existe beaucoup d'études montrant que le traitement antibiotique par voie générale améliore le résultat du traitement des parodontites, s'il est utilisé en complément du traitement mécanique (Berglundh T, Krok L et al, 1998; Slots J and Ting M, 2002; Winkel EG, Van Winkelhoff AJ et al, 2001; Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, 1997). Mais toutes les études réalisées ne choisissent pas l'antibiotique utilisé en fonction des bactéries détectées. Cela peut diminuer l'impact du traitement antibiotique.

Une étude a montré que l'antibiothérapie systémique à base de métronidazole et d'amoxicilline, en complément du traitement mécanique, n'est efficace que chez les patients porteurs de *A.actinomycetemcomitans*. Les patients non porteurs de cette bactérie n'ont montré aucun bénéfice clinique par rapport à ceux ayant eu un traitement mécanique seul. La sélection des patients par des critères microbiologiques permet donc ainsi d'éviter le surtraitement (Flemmig TF, Milian E et al, 1998).

Une autre étude, réalisée en double aveugle, n'a donc pas pu utiliser d'antibiotique précis en fonction de la flore présente chez les sujets. Une association d'amoxicilline et de métronidazole a été administrée à tous les sujets. Il a été montré que l'amélioration des signes cliniques était plus fréquente chez les patients traités par antibiothérapie adjuvante que chez ceux traités par placebo. Cependant, une analyse plus poussée a mis en évidence que l'amélioration des signes cliniques en terme de diminution de la profondeur de poche et du nombre de poches supérieures à 5mm, était uniquement localisée chez les sujets porteurs de *P.gingivalis* à des niveaux détectables. Les sujets traités par antibiothérapie et non porteurs de *P.gingivalis* ne présentaient pas plus d'amélioration que ceux traités par placebo (Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, 2001).

Peu d'études ont été réalisées ne prenant en compte que l'antibiotique utilisé devrait être choisi en fonction de la flore mise en évidence par des tests microbiologiques. De plus les doses à prescrire ne sont pas clairement établies (Pallasch TJ, 1996), car les modalités du traitement sont développées empiriquement, et non par une recherche systématique (Ellen RP and McCulloch CAG, 1996).

L'antibiotique doit cibler les microorganismes pathogènes et on préfère utiliser une molécule bactéricide.

La prescription d'un antibiotique inapproprié peut conduire à une multiplication des pathogènes et une mauvaise réponse clinique (Helovuo H, Hakkarainen K, 1993).

Les tétracyclines sont indiquées dans le cas où *A.actinomycetemcomitans* est le pathogène prédominant. Cependant, dans les infections mixtes, cette molécule peut ne pas diminuer assez la concentration des pathogènes sous gingivaux pour stopper la progression de la maladie (Haffajee AD, Dibart S et al, 1995; Haffajee AD, Dzink JL, 1988; Van Winkelhoff AJ, Rams TE, 1996). La concentration moyenne de tétracycline dans le fluide gingival est moindre que dans le plasma, et varie beaucoup selon les individus. Cela pourrait expliquer la variabilité des résultats cliniques observés (Sakellari D, Goodson JM et al, 2000). Les tétracyclines ont aussi le possible avantage d'inhiber les collagénases gingivales (Ryan ME and Golub LM, 2000). La doxycycline a la plus grande capacité de liaison aux protéines et la demi-vie la plus longue ; la minocycline a la meilleure absorption et pénétration dans les tissus. Toutes les tétracyclines ont des effets secondaires notoires sur les os et les dents. Elles sont contre-indiquées pendant la grossesse et chez les enfants de moins de huit ans (American Academy of Periodontology, 2004).

Le métronidazole peut stopper la pathologie chez des patients présentant des infections à *P.gingivalis* et/ou *P.intermedia*, avec peu ou pas d'autres pathogènes potentiels (Loesche WJ, Giordano JR et al, 1992). Cette molécule peut atteindre des taux réellement antibactériens dans les tissus parodontaux et le fluide gingival (Britt MR and Pohlod DJ, 1986).

La clindamycine est efficace dans les parodontites réfractaires, et sa prescription doit être envisagée dans les cas d'infection par des *Peptostreptococcus*, des streptocoques β -hémolytiques, et d'autres bâtonnets anaérobies à gram négatif. *Eikenella corrodens* est résistante à la clindamycine. Cette molécule doit être cependant prescrite avec précaution compte tenu de ses possibles effets secondaires néfastes sur le système digestif (Walker C and Gordon J, 1990).

L'association d'amoxicilline et d'acide clavulanique est une alternative à la clindamycine. Elle est recommandée dans les mêmes circonstances (Magnusson I, Low SB et al, 1994).

La ciprofloxacine (qui est une fluoroquinolone) est efficace contre les bâtonnets entériques, les *pseudomonas*, les staphylocoques, *A.actinomycetemcomitans*, et d'autres pathogènes parodontaux (Slots J, Feik D et al, 1990). Les fluoroquinolones pénètrent facilement

dans les tissus parodontaux enflammés et dans le fluide gingival. Il peut y atteindre des concentrations plus importantes que dans le sérum (Conway TB, Beck FM et al, 2000). La ciprofloxacine peut être combinée à du métronidazole ou à une β -lactamine pour le traitement des infections parodontales mixtes à anaérobies (Slots J and Van Winkelhoff AJ, 1993). Les associations métronidazole/amoxicilline et métronidazole/ciprofloxacine agissent de façon synergique contre *A.actinomycetemcomitans* et les autres pathogènes parodontaux majeurs (Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ et al, 1992).

L'azithromycine pénètre facilement dans les tissus parodontaux enflammés ou non (Blandizzi C, Malizia T et al, 1999). Elle est très active sur beaucoup de pathogènes parodontaux (Sefton AM, Maskell JP et al, 1996), bien que certaines souches de *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* et de *Peptostraptococcus* soient résistantes (Goldstein EJ, Citron DM et al, 2000).

L'association de métronidazole et d'amoxicilline élimine de manière assez sûre *A.actinomycetemcomitans* et *P.gingivalis* dans le cas des parodontites précoces et des parodontites réfractaires de l'adulte (Kornman KS, Newman MG et al, 1994; Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ, 1992; van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ, 1992). La ciprofloxacine peut être substituée à l'amoxicilline chez les sujets allergiques aux β -lactamines de plus de 18 ans.

Certains antibiotiques sont antagonistes et de leur association résulte une diminution de l'activité antimicrobienne. Il existe un antagonisme, par exemple, entre les tétracyclines bactériostatiques et les β -lactamines bactéricides (Eliopoulos GM, 1989).

III.4.3.3. Antibiothérapie systémique ou topique : avantages et inconvénients.

L'antibiothérapie systémique permet d'atteindre, via le sérum, les microorganismes situés au plus profond des poches parodontales, dans les furcations, et à l'intérieur de l'épithélium de poche et du tissu conjonctif. Elle permet aussi de cibler les pathogènes parodontaux localisés dans d'autres sites buccaux ou extra buccaux (Muller HP, Eickholz P et al, 1995). La possibilité d'éliminer totalement ces pathogènes de la cavité buccale permet de réduire le risque de recolonisation des poches et donc de récurrence. De plus, l'antibiothérapie systémique a un coût relativement modeste pour le patient.

Par contre, en comparaison à l'antibiothérapie topique, elle ne permet pas d'atteindre de fortes concentrations dans le fluide gingival. Elle peut aussi avoir des effets indésirables et provoquer des résistances de la part des microorganismes. La coopération du patient n'est pas assurée non plus (American Academy of Periodontology, 1996).

Une étude comparant la différence des effets de l'antibiothérapie topique et systémique, a montré que les deux méthodes d'administration des antibiotiques avaient le même résultat clinique (Purucker P, Mertes H et al, 2001).

S'il on est assuré de la coopération du patient, et dans le cas où il n'existe pas de surinfection, l'antibiothérapie systémique présente des avantages non négligeables par rapport à une application topique.

Une autre étude suggère que l'utilisation de l'antibiothérapie topique n'a d'intérêt que dans le cas des parodontites réfractaires et dans les cas de récurrences localisées en phase de maintenance (Etienne D, 2003).

III.4.3.4. Conclusion.

Le traitement parodontal doit être un traitement mécanique (détartrage/surfaçage) avec, si nécessaire, un accès chirurgical.

Les antibiotiques doivent être prescrits sur la base d'un besoin clinique de soins supplémentaires, des résultats des tests microbiologiques, et des conditions de santé ainsi que du traitement du patient. Il existe des résultats suggérant que l'antibiothérapie pourrait aussi améliorer les résultats du traitement des parodontites chroniques. Cependant, l'indication de cette thérapie est discutable (American Academy of Periodontology, 2004).

Certaines situations cliniques ne nécessitent pas un antibiogramme, car la susceptibilité des agents infectieux aux antibiotiques est prévisible. Par exemple, *P.gingivalis* et *C.rectus* sont sensibles à beaucoup d'antibiotiques (American Academy of Periodontology, 2004).

Le résultat clinique et microbiologique doit être évalué un à trois mois après la fin du traitement mécanique. En particulier, dans le cas où la pathologie continue de progresser, ou si l'inflammation n'a pas diminué, un test microbiologique peut déterminer la présence et la quantité des pathogènes parodontaux persistants.

S'il y a eu traitement antibiotique, un test microbiologique doit être effectué un à trois mois après, pour vérifier l'élimination des pathogènes en cause, et l'absence de surinfection par d'autres microorganismes (American Academy of Periodontology, 1996).

En effet, le prélèvement pour l'analyse microbiologique ne doit pas être effectué dans une zone ayant récemment reçu un traitement mécanique, car il faut quatre à huit semaines pour que la poche soit recolonisée à des niveaux équivalents à ceux précédant le traitement (American Academy of Periodontology, 2004).

III.4.4. Le cas particulier des parodontites réfractaires.

La parodontite réfractaire n'est pas une pathologie à part entière. Ce terme désigne des parodontites touchant des patients qui souffrent d'une perte d'attache persistante et continue, et ce malgré une thérapie classique bien conduite et une élimination quotidienne efficace de la plaque dentaire. Cette non-réponse au traitement peut intervenir dans des situations où la thérapie conventionnelle n'a pas pu éliminer tous les réservoirs de bactéries pathogènes, ou être le résultat d'une surinfection par des pathogènes opportunistes. Elle pourrait aussi être le résultat d'une inefficacité des défenses de l'hôte, mais ces mécanismes sont encore mal connus. Les parodontites réfractaires sont donc définies comme des parodontites qui répondent mal au traitement. Cette définition étant imprécise, il est difficile d'évaluer sa prévalence (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Cependant, certaines bactéries ont été associées au caractère réfractaire. En effet, la persistance après traitement mécanique de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, et *T.forsythensis*, a été associée à une amélioration faible du saignement au sondage, de la profondeur de poche (Renvert S, Wikström M, 1990; Takamatsu N, Yano K, 1999; Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, 1998), et à une persistance de perte osseuse progressive (Chaves ES, Jeffcoat MK, 2000).

Les patients souffrant de parodontite réfractaire peuvent donc trouver un intérêt à bénéficier d'un diagnostic microbiologique et d'une antibiothérapie adaptée subséquente (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Une étude bibliographique récente avait pour objet de déterminer l'intérêt de l'identification bactérienne dans la prise en charge des parodontites. Elle a déterminé qu'il n'existait pas de preuve forte du bénéfice de cette identification. Cependant, elle concluait que le diagnostic microbiologique pouvait être intéressant dans la prise en charge des parodontites ne répondant pas à un traitement mécanique standard (Listgarten MA and Loomer PM, 2003).

Un rapport officiel a déterminé la conduite à tenir face à une parodontite réfractaire. Une fois que le diagnostic a été fait, plusieurs démarches doivent être effectuées (American Academy of Periodontology, 2000) :

- Prélèvement d'échantillons sous-gingivaux à partir de sites sélectionnés afin d'identifier les pathogènes et éventuellement de réaliser un antibiogramme,
- Choix et administration d'une antibiothérapie appropriée,
- Traitement parodontal classique (mécanique) en association avec l'antibiothérapie,
- Identification et contrôle (si possible) des facteurs de risque,
- Réévaluation et nouveau diagnostic microbiologique à la fin du traitement (1 à 3 mois après traitement),
- Maintenance intensifiée (délais plus courts entre les séances).

III.4.5. En pratique, quand utiliser les tests microbiologiques dans la phase de traitement?

Les tests microbiologiques sont utiles principalement pour vérifier l'efficacité du traitement, pour déterminer l'indication d'une antibiothérapie, et pour déterminer quel antibiotique utiliser.

III.4.5.1. Indication et modalités de l'antibiothérapie.

Les patients candidats à l'antibiothérapie doivent en effet être sélectionnés. Pour éviter l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques, il faut choisir les patients à qui ce traitement apportera un réel bénéfice clinique. Il s'agit de plusieurs catégories de patients (American Academy of Periodontology, 1996) :

- Les patients qui subissent une perte d'attache persistante malgré un traitement mécanique adapté (parodontite réfractaire),
- Les patients atteints de parodontite agressive localisée ou d'autres types de parodontites intervenant avant ou pendant l'adolescence (car celles-ci sont fortement associées à la présence de *A.actinomycetemcomitans*),
- Les patients ayant une pathologie ou un traitement prédisposant à la parodontite,
- Les patients souffrant d'une infection parodontale aiguë ou sévère.

Les patients présentant une gingivite ou une parodontite chronique de l'adulte répondent en général favorablement au traitement mécanique et par conséquent tirent peu de bénéfices d'une antibiothérapie adjuvante. Cependant, il existe des preuves que l'antibiothérapie systémique dans le traitement de la parodontite chronique entraîne un gain d'attache. La question de l'indication de cette thérapie reste sans réponse (Haffajee AD, Socransky SS, 2003).

Les tests microbiologiques permettent ainsi de définir l'indication d'une antibiothérapie. En effet, un traitement antibiotique est nécessaire pour les patients atteints de parodontite agressive. Sans traitement antibiotique, on obtient dans le meilleur des cas seulement une réduction de *A.actinomycetemcomitans* (Sixou M, 2003). D'autre part, une parodontite de l'adulte associée à une flore peu agressive (*E.corrodens*, *C.ochracea*, ...) ne

nécessite pas de traitement antibiotique. Une thérapie associant un nettoyage professionnel, l'utilisation d'antiseptiques locaux (bains de bouche) , et une bonne hygiène bucco-dentaire au quotidien, donne d'excellents résultats (Sixou M, 2003).

Dans le cas où l'antibiothérapie est nécessaire, la réalisation d'un antibiogramme est recommandée, excepté dans les cas vus précédemment où les germes en cause ont un spectre de sensibilité bien connu (*P.gingivalis* par exemple).

III.4.5.2. *Contrôle de l'efficacité du traitement.*

Les tests microbiologiques peuvent être effectués après le traitement mécanique pour évaluer la nécessité ou non de soins supplémentaires (antibiothérapie, chirurgie, ...). On réévalue la flore microbienne par des tests microbiologiques un à trois mois après la fin de tous les traitements. On vérifie ainsi la suppression ou la diminution marquée des pathogènes en cause, et éventuellement l'absence de microorganismes capables de créer une surinfection (bactéries entériques, levures, *pseudomonas*, etc.) (American Academy of Periodontology, 1996).

Après un traitement chirurgical et/ou non chirurgical, il est intéressant d'effectuer des tests microbiologiques, tant en cas de succès que d'échec flagrant de la thérapie. En cas de réussite du traitement, des tests effectués régulièrement permettent de contrôler qu'il n'y a pas de recolonisation des poches, et donc pas de risque de récurrence. En cas d'échec du traitement ou de récurrence, un test microbiologique peut permettre d'identifier les germes en cause et de mettre en place une antibiothérapie. Un test de contrôle peut être effectué après l'antibiothérapie pour vérifier que les germes visés ont bien été éliminés. De mauvais résultats des tests bactériologiques peuvent faire envisager au praticien, selon le cas, une reprise du traitement mécanique et /ou une nouvelle antibiothérapie.

Les patients souffrant de parodontite agressive peuvent faire l'objet de tests microbiologiques avant le traitement mécanique. Cette pathologie implique souvent plusieurs pathogènes ayant la capacité d'envahir les tissus parodontaux (American Academy of Periodontology, 2004). Cette démarche est pleinement justifiée, car l'administration d'un antibiotique adapté par voie générale permet d'éviter au patient une perte d'attache continue, voire accrue après le traitement (Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, 2001).

Ces tests peuvent se faire de manière regroupée (tous les prélèvements sont réunis en un seul), ou poche par poche (pour des sites ayant subi une activité de la pathologie récemment). Un test regroupé suffit pour l'administration d'un antibiotique systémique. Il donne une bonne représentation des pathogènes parodontaux qui doivent être ciblés. Par contre, un test poche par poche est plus approprié dans les parodontites localisées si on souhaite utiliser un antibiotique local.

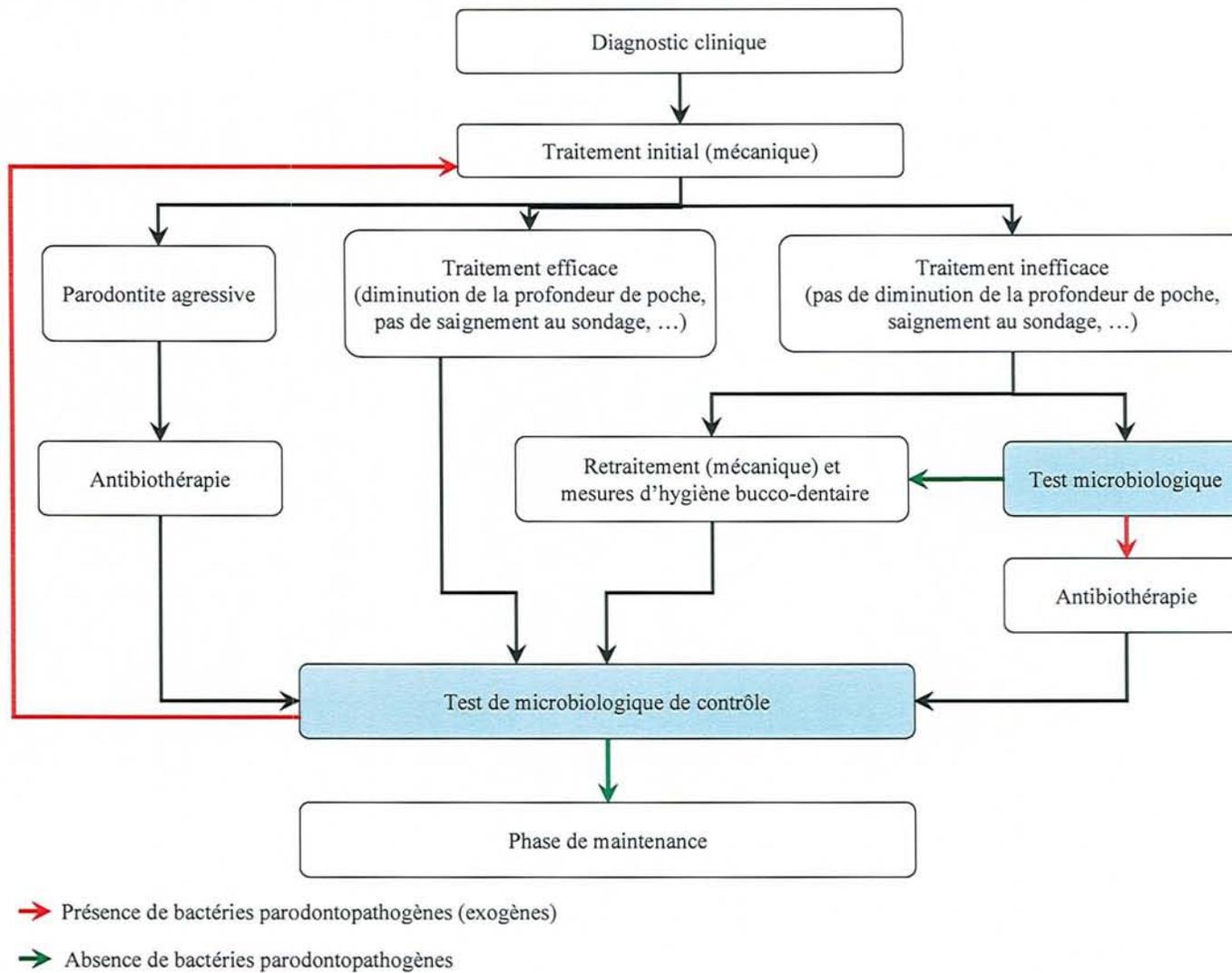


Figure 37 : Utilisation des tests microbiologiques en phase de traitement parodontal (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005; Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

III.5. Intérêt en phase de maintenance : détection des signes de guérison et de signes indiquant les risques de récurrence.

La phase de maintenance commence après la fin du traitement actif, et continue à intervalles variables toute la « vie » de la dentition ou des implants qui la remplace. La maintenance parodontale est supervisée par le chirurgien-dentiste et inclue une mise à jour de l'état de santé médical et dentaire du patient, des radiographies, l'examen des tissus mous extra et intra oraux, un examen parodontal, l'évaluation du contrôle de plaque du patient, l'élimination de la plaque située dans le sulcus ou les poches, un détartrage et surfaçage si nécessaire, ainsi que les polissage des surfaces dentaires (American Academy of Periodontology, 2000). Durant cette phase, les conditions parodontales et la pathologie sont contrôlées ; les facteurs étiologiques sont supprimés ou réduits.

La thérapie active et la maintenance sont deux entités distinctes mais indissociables. Le patient passe de la phase de traitement actif à la phase de maintenance, puis de nouveau à la phase de traitement actif en cas de récurrence.

Les buts de la maintenance sont :

- De minimiser la récurrence et la progression de la pathologie parodontale chez les patients qui ont déjà bénéficié d'un traitement actif,
- De réduire la perte de dents par le contrôle de la dentition ou de toute restaurations prothétique remplaçant une dent naturelle,
- D'augmenter la probabilité de détecter et de traiter le plus tôt possible une récurrence ou une autre pathologie de la cavité buccale.

III.5.1. Recolonisation ou persistance bactérienne et récurrence de la pathologie.

Le but d'une maintenance régulière est de prévenir la recolonisation des sites sous-gingivaux par des bactéries potentiellement parodontopathogènes. En effet, la recolonisation ou la persistance de certaines bactéries est associée à la récurrence de la pathologie.

Chez les patients atteints de parodontite agressive localisée, la présence de *A.actinomycescomitans* est associée à la récurrence de la pathologie (Christersson LA, Slots J, 1985).

Une perte d'attache persistante chez les patients en phase de maintenance a été reliée à la présence récurrente notamment de *P.gingivalis*, *P.intermedia*, et *A.actinomycescomitans* (Dahlén G, Wikström M, 1996; Wennström JL, Dahlén G et al, 1987).

Selon une étude effectuée sur cinq ans, seules les poches parodontales avec un niveau indétectable après traitement de *A.actinomycescomitans*, *P.gingivalis*, et moins de 5% de *P.intermedia* sont restées stables. En revanche, 67% des sites positifs pour une ou plusieurs de ces espèces ont perdu de l'attache (Dahlén G, Wikström M, 1996).

La suppression des pathogènes parodontaux est associée avec la stabilité parodontale (Berglundh T, Krok L, 1998; Chaves ES, Jeffcoat MK, 2000; Dahlén G, Wikström M, 1996). Les tests microbiologiques peuvent donc être utiles pour déterminer la « fin » du traitement parodontal et l'espace entre les visites de maintenance. Des tests de contrôle peuvent être particulièrement opportuns chez les patients qui doivent bénéficier d'une pose d'implants, afin de s'assurer que les pathogènes parodontaux ont été éradiqués et/ou que la flore commensale a été suffisamment diminuée (Van Winkelhoff AJ, Goene RJ et al, 2000).

Il semble en particulier que l'absence de *A.actinomycescomitans*, *P.intermedia* et *P.gingivalis* soit un indicateur de santé parodontale, plutôt que leur présence détermine un risque de récurrence (Listgarten MA, Slots J et al, 1991).

La réapparition de bactéries pathogènes dans des sites où elles avaient été éradiquées peut être due à différents facteurs (Dahlén G, Wikström M, 1996):

- Ces bactéries étaient toujours présentes dans la poche et l'échantillon testé, mais en nombre insuffisant pour être détectées (niveau inférieur au seuil de détection),
- Elles étaient toujours présentes dans les poches sous gingivales, mais dans des zones inaccessibles au prélèvement : comme vu précédemment, *A.actinomycescomitans* et *P.gingivalis* peuvent pénétrer dans l'épithélium de poche ; on sait aussi que les bactéries parodontales peuvent de loger dans les tubulis dentinaires et le ciment (Adriaens PA, de Boever JA et al, 1988).
- Elles avaient été éliminées des poches testées mais étaient restées présentes à un autre endroit de la cavité buccale ; des études ont montré que les bactéries parodontopathogènes peuvent être présentes sur la langue, les amygdales, et la muqueuse de la cavité buccale (Dahlén G, Manji F, 1992; Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U et al, 1988),
- Elles avaient été éliminées de la cavité buccale mais ont été retransmises par une personne de l'entourage proche du patient.

Une étude semble indiquer que la récurrence de la parodontite serait favorisée par une profondeur de poche supérieure à la normale à la fin du traitement, et par la recolonisation par certaines bactéries. Il semblerait que ce ne soit pas la simple présence de ces bactéries qui prédisposent à la récurrence, mais le fait que leur proportion sous-gingivale soit supérieure ou égale à un certain seuil. Dans l'étude citée, ces seuils étaient de 0,01% pour *A.actinomycescomitans*, 0,1% pour *P.gingivalis*, 2,5% pour *P.intermedia*, 2% pour *C.rectus*, et 3% pour *P.micros* (Rams TE, Listgarten MA et al, 1996).

III.5.2. Quand utiliser les tests microbiologiques en phase de maintenance ?

En pratique, les tests microbiologiques interviennent en début de phase de maintenance (ou fin du traitement), puis en cas de récurrence de la maladie. Les patients en récurrence doivent bénéficier à nouveau d'un traitement « initial » classique (c'est-à-dire une amélioration ou vérification de l'hygiène bucco-dentaire, un détartrage/surfaçage, éventuellement des chirurgies parodontales ...). Si les tests indiquent qu'ils sont porteurs de *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, ou *T.forsythensis*, ils peuvent bénéficier également d'un traitement antibiotique (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005).

Il n'existe pas de données sur la fréquence souhaitée des tests microbiologiques. Cependant, on peut supposer que détecter une recolonisation par des bactéries parodontopathogènes avant l'apparition de signes cliniques pourrait permettre un retraitement rapide et éviter de nouvelles pertes d'attache.

Lors de la visite de maintenance, une mise à jour des conditions médicales et dentaires du patient doit être effectuée (American Academy of Periodontology, 2000). Si un diagnostic microbiologique a été effectué avant ou pendant le traitement actif, on peut considérer qu'un contrôle de l'évolution de la flore bactérienne fait partie de ces mises à jour. Cela permet de contrôler l'élimination ou la réduction des pathogènes en cause, puis la stabilité de la composition de la nouvelle flore au fil du temps.

L'intervalle entre deux visites de maintenance conseillé par l' *American Academy of Periodontology* est de 3 mois, sachant que cet intervalle peut varier en fonction de l'état parodontal du patient.

La question de la faisabilité de ces tests tous les trois mois se pose. En effet, le surcoût représenté est-il acceptable par les patients, sachant qu'il n'existe à ce jour pas de preuve de l'intérêt clinique de ces tests en phase de maintenance ?

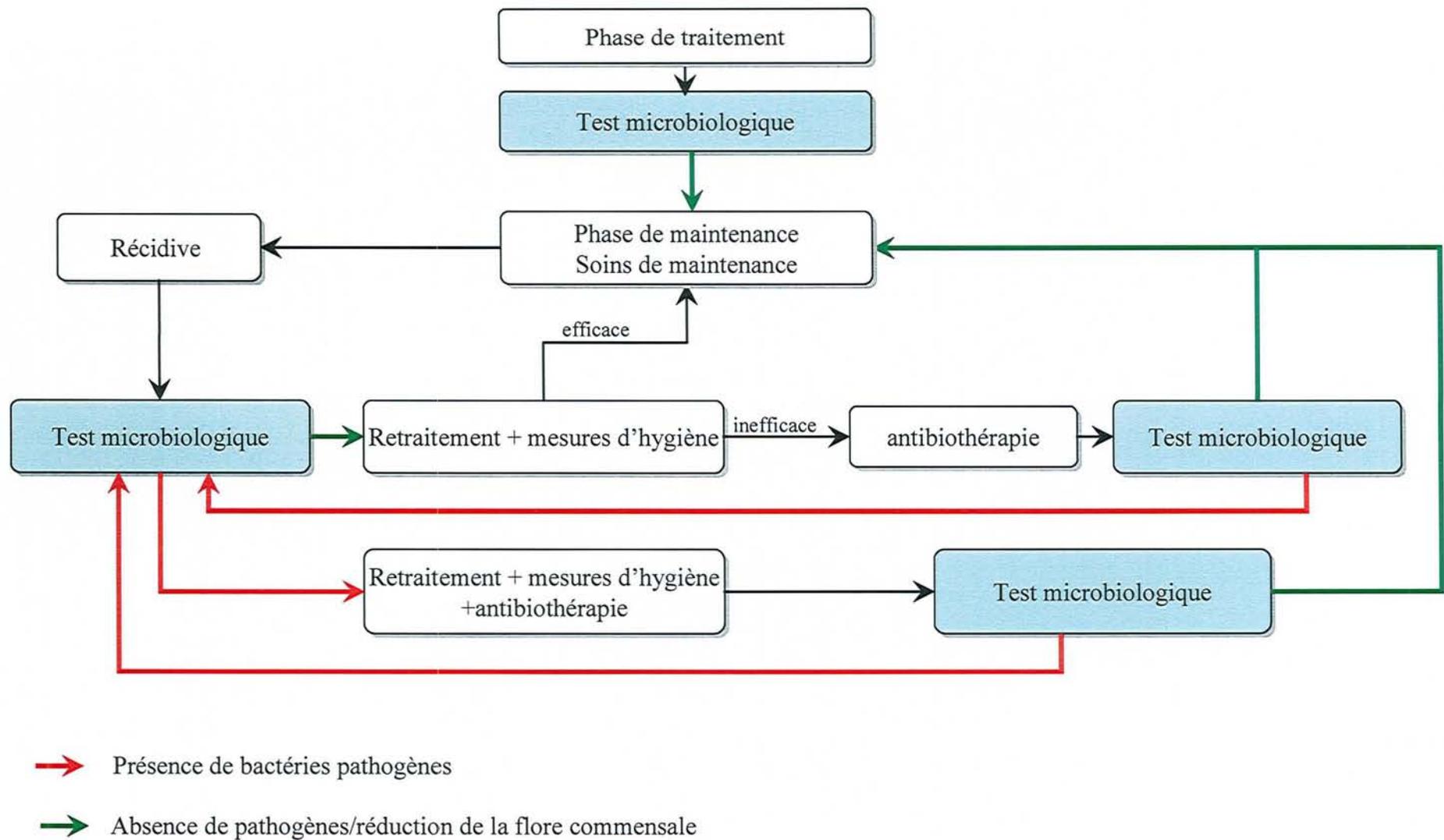


Figure 38 : utilisation des tests microbiologiques en phase de maintenance (van winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005; Wolf HF, Rateitschak EM, 2005).

Partie IV

Annexe : Les différentes classifications des maladies parodontales.

Dans les études antérieures à 1999, l'ancienne classification des maladies parodontales est utilisée. Ici, les termes de l'ancienne terminologie ont été remplacés par ceux de la classification de 1999 pour la clarté de l'exposé. Voici un rappel succinct de ces deux classifications des maladies parodontales.

Tableau 4 : classification des maladies parodontales de 1989 (Caton JftAAoP, 1989).

Type de maladie parodontale	Caractéristiques
Pathologies gingivales	Pathologie sans perte d'attache
Parodontite de l'adulte	Peut apparaître dès 35 ans Progression lente Pas de défaut des défenses de l'hôte
Parodontite précoce (prépubertaire, ou juvénile)	Apparaît avant 35 ans Progression rapide Défaut de défense de l'hôte
Parodontite associée à une maladie systémique	La parodontite est une manifestation de la maladie systémique
Parodontite ulcéro-nécrotique	Elle est similaire à la gingivite ulcéro-nécrotique, mais il y a perte d'attache
Parodontite réfractaire	Parodontite récurrente qui ne répond pas au traitement

Tableau 5 : Nouvelle classification des maladies parodontales (Armitage CC, 1999).

Type I	Gingivopathies : A Maladies gingivales induites par la plaque B Lésions gingivales non induites par la plaque
Type II	Parodontite chronique : A Localisée B Généralisée
Type III	Parodontite agressive : A Localisée B Généralisée
Type IV	Parodontite en tant que manifestation d'une maladie systémique : A Associée à des dysfonctionnements hématologiques B Associée à des maladies génétiques C Associée à d'autres maladies systémiques
Type V	Maladies parodontales nécrosantes aiguës : A Gingivite ulcéro-nécrotique B Parodontite ulcéro-nécrotique
Type VI	Abcès : A Gingival B Parodontal C Périconnaire
Type VII	Lésions endo-parodontales
Type VIII	Malformations ou déformations et conditions acquises : A Facteurs favorisants d'origine dentaire B Problèmes muco-gingivaux des zones dentées C Problèmes muco-gingivaux des zones édentées D Traumatisme occlusal

Conclusion

L'étiologie de la maladie parodontale est bactérienne, et plus précisément **polybactérienne**. Ces bactéries sont regroupées au sein de la plaque dentaire ou biofilm, qui est une partie intégrante de l'**écosystème** parodontal. La parodontite résulte d'un déséquilibre de cet écosystème.

Les bactéries du biofilm sont associées en **complexes** dont la présence est plus ou moins corrélée à la santé ou à la maladie. Les bactéries les plus associées à la parodontite sont celles du **complexe rouge**, c'est-à-dire *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, et *T.denticola*. Il faut également citer le cas particulier de *A.actinomycetemcomitans* qui n'appartient pas à un complexe précis, mais qui est fortement associée aux formes de parodontite juvénile. Ce microorganisme, et surtout son sérotype b, possède de nombreux facteurs de virulence. C'est également le cas des bactéries du complexe rouge.

L'étude de la flore parodontale des patients atteints peut se faire de plusieurs manières. En effet, de nombreuses méthodes d'identification et de comptage des bactéries ont été mises au point au fil du temps. La méthode de prélèvement et d'étude doit être adaptée à chaque cas.

L'examen direct n'a que peu d'intérêt, hormis celui de l'information et de la prise de conscience du patient.

La **culture** reste une méthode de référence. Elle permet d'identifier de nombreuses bactéries différentes, de réaliser leur **antibiogramme**, et de les compter assez précisément. Par contre elle ne peut détecter que les espèces viables, ce qui pose un problème pour le transport des échantillons et la détection des bactéries difficilement cultivables.

La culture est aujourd'hui concurrencée par de nouvelles techniques de biologie moléculaire. La technique « **DNA-DNA Checkerboard Hybridization** » est très utilisée pour les études écologiques, car elles permettent d'analyser un grand nombre d'échantillons rapidement et de tester la présence de nombreuses espèces bactériennes. Par contre, c'est plutôt la **PCR en temps réel** qui est utilisée pour étudier la composition de la flore d'un seul patient. Cette technique permet un **comptage très précis** des bactéries, avec un seuil de détection très bas. En revanche, on ne peut détecter que les espèces qu'on recherche (il faut

posséder les sondes à ADN voulues) et on ne peut réaliser d'antibiogramme. Les délais d'attente des résultats sont beaucoup moins longs que pour la culture.

Les connaissances étiologiques et l'identification de la flore des patients atteints de parodontite, ou **diagnostic microbiologique**, peuvent conduire le chirurgien-dentiste à prendre une série de mesures cliniques.

Dans un cadre préventif, la détection en particulier de *A.actinomycetemcomitans* chez des sujets jeunes doit inciter à une surveillance accrue et des mesures d'hygiène bucco-dentaire. En effet, la présence de cette bactérie est un facteur de risque de parodontite juvénile.

Le diagnostic microbiologique à lui seul ne permet pas d'établir la présence d'une parodontite, mais constitue une aide au **pronostic**. La présence d'une ou plusieurs bactéries du complexe rouge et de *A.actinomycetemcomitans*, leur nombre et leur proportion par rapport aux autres espèces influent sur le pronostic.

Le diagnostic microbiologique peut avoir une influence sur le choix des moyens de traitement. S'il s'agit de bactéries opportunistes, aucune **antibiothérapie** ne sera nécessaire. Dans le cas contraire, il permettra de choisir la **molécule appropriée** et de réaliser un **antibiogramme** si nécessaire.

Il permet de contrôler la **disparition des bactéries pathogènes** ou la **régulation du nombre des bactéries opportunistes**, c'est-à-dire l'efficacité du traitement et la « guérison ».

De même, le diagnostic microbiologique permet de détecter les **récidives** de la pathologie au niveau bactérien et donc de mettre en œuvre les traitement mécaniques, chirurgicaux, et/ou antibiotiques nécessaires.

Il apparaît que le diagnostic microbiologique est particulièrement utile dans le cas des **parodontites agressives précoces** (chez les adolescents et adultes jeunes), car l'amélioration des conditions cliniques est fortement liée à la disparition de *A.actinomycetemcomitans*.

Il est également très utiles dans les cas de **parodontites réfractaires au traitement**. Il permet d'avoir une meilleure connaissance du facteur bactérien, de mieux pouvoir contrôler son évolution au fil du traitement, et de choisir les molécules antibiotiques adaptées si nécessaires.

L'utilisation du diagnostic microbiologique est encore limitée du fait de son coût et dans certain cas du manque de recul sur ses intérêts cliniques. Cependant, son utilisation est recommandée dans les cas suivants :

- Les cas de parodontite sévère,
- Echech du traitement,
- Récidive de la pathologie,
- Parodontite associée à une maladie générale,
- Parodontite chez les enfants, adolescents, et adultes jeunes,
- Cas complexes (désaccord entre l'inflammation des tissus et la sévérité des lésions).

A l'heure actuelle, nous avons peu de recul et nous manquons encore de données, en particulier, sur les intérêts cliniques du diagnostic microbiologique dans la prévention et dans la phase de maintenance. Mais c'est une technique d'avenir qui trouvera sans aucun doute sa place dans toutes les étapes du traitement parodontal.



Table des figures



Figure 1: la plaque dentaire (www.scharfphoto.com).....	6
Figure 2 : Les complexes bactériens de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).	10
Figure 3 : Succession des complexes bactériens au sein de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).....	12
Figure 4 : Formation de la plaque dentaire (Socransky SS and Haffajee AD, 2005). .	13
Figure 5 : Localisation des complexes bactériens au sein de la plaque sous gingivale (Socransky SS and Haffajee AD, 2005).....	14
Figure 6 : Une colonie d' <i>A.actinomycetemcomitans</i> sur un milieu de culture (www.dgk.org).....	16
Figure 7 : Une bactérie de l'espèce <i>Porphyromonas gingivalis</i> vue à fort grossissement (www.microbewiki.kenyon.edu).	22
Figure 8 : Des colonies de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (www.alunos.crb.ucp.pt).....	25
Figure 9 : Une cellule de l'espèce <i>Tannerella forsythensis</i> (anciennement <i>B.forsythus</i>) vue à fort grossissement (www.acsu.buffalo.edu).	33
Figure 10 : La bactérie <i>Prevotella intermedia</i> vue à fort grossissement (www.mmsimages.cardiff.ac.uk).....	36
Figure 11 : <i>Fusobacterium nucleatum</i> vu à fort grossissement (www.zuova.cz).	37
Figure 12 : Une bactérie du genre <i>Eubacterium</i> à fort grossissement (www.zuova.cz).	38
Figure 13 : Un spirochète vu à fort grossissement (www.nescb.org).	43
Figure 14 : Des bactéries de l'espèce <i>Treponema denticola</i> (complexe rouge) vues à fort grossissement (http://www.biltek.tubitak.gov.tr/canlilar/img/treponema_denticola.png).	45
Figure 15 : <i>Candida albicans</i> vu à fort grossissement (www.academics.hamilton.edu).	50

Figure 16 : Le site doit être séché et isolé. Les instruments de prélèvements ne doivent pas toucher la muqueuse jugale (http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/polymerase.html).....	54
Figure 17 : Les prélèvements sont effectués en plusieurs sites, puis sont séparés et étiquetés.	55
Figure 18 : Coloration de gram d' <i>Actinomyces</i> (http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=Actinomyces.jpg&album=2).....	60
Figure 19 : Colonies de <i>P.melaninogenica</i> sur une gélose au sang (http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=Prmelaboite.jpg&album=7).....	62
Figure 20 : Antibiogramme de <i>B.fragilis</i> (http://pharmacie.univ-lille2.fr/recherche/labos/Bacteriologie/photos/show.php?start=0&file=B_frag_ATB.jpg&album=16).....	65
Figure 21 : Principe de l'immunofluorescence indirecte (www.theses.ulaval.ca/2005/22895/ch02.html).....	68
Figure 22 : Détection de fibroblastes par immunofluorescence : à gauche la fluorescence verte est due à la fluorescéine, et à droite la fluorescence rouge est due à la rhodamine (www.img.cas.cz/dbc/gallery.html).....	68
Figure 23 : Principe de la technique ELISA (www.biosystemdevelopment.com/technology.html).	71
Figure 24 : Peu de matériel est nécessaire pour effectuer ce type de test en cabinet (visionplumbing.com/product.asp?product_id=87).....	74
Figure 25 : Structure de la molécule d'ADN (http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/dna_molecule.html).....	77
Figure 26 : Exemple d'une sonde marquée par des molécules fluorescentes (www.urovysion.com/DirectProbes_352.asp).....	78
Figure 27 : La technique FISH : elle permet de localiser des séquences génomiques spécifiques (http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/fish.html).....	79

Figure 28 : Détection de bactéries productrices de méthane par la technique FISH (www.er.ebara.com/research/bio/a1.html)..... 80

Figure 29 : Principe du DNA-DNA Checkerboard (www.immunetics.com/.../minicheck.html). 84

Figure 30 : L'ADN de l'échantillon est disposé horizontalement; les sondes sont déposées verticalement (www.immunetics.com/.../minicheck.html). 85

Figure 31 : Exemple d'une feuille de résultat. Un signal (en noir) est émis quand l'ADN de l'échantillon croise la sonde qui lui correspond (<http://jmm.sgmjournals.org/cgi/content/full/51/12/1090/FIG1>)..... 85

Figure 32 : Principe de la PCR (<http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/polymerase.html>)..... 88

Figure 33 : Au moment de la phase d'extension, chaque sonde à double marquage libère sa molécule fluorescente (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html)..... 94

Figure 34 : Les balises moléculaires deviennent fluorescentes une fois hybridées à la séquence cible (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html)..... 94

Figure 35 : Résultat d'une procédure de PCR en temps réel (http://www.clinical-virology.org/pages/cvn/vir_all/cvn_gp_how.html)..... 95

Figure 36 : Différentes infections parodontales sur la base de l'origine des pathogènes (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005). 100

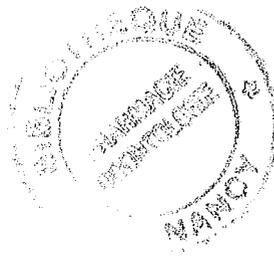
Figure 37 : Utilisation des tests microbiologiques en phase de traitement parodontal (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005; Wolf HF, Rateitschak EM, 2005). 127

Figure 38 : utilisation des tests microbiologiques en phase de maintenance (van Winkelhoff AJ and Winkel EG, 2005; Wolf HF, Rateitschak EM, 2005). 132



Partie V

Bibliographie



Adriaens PA, de Boever JA & Loesche WJ. Bacterial invasion in root cementum and radicular dentin of periodontally diseased teeth in humans. A reservoir of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 59, 222-230 (1988).

Aimetti M, Romano F, Torta I, Cirillo D, Capopsio P & Romagnoli R. Debridement and local application of tetracycline-loaded fibres in the management of persistent periodontitis : results after 12 months. *J Clin Periodontol* 31, 166-172 (2004).

Albandar JM, Brown LJ & Loe H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *J Periodontol* 68, 973-981 (1997).

Altman LC, Page RC, Ebersole JL & Vandesteen EG. Assessment of host defenses and serum antibodies to suspected periodontal pathogens in patients with various types of periodontitis. *J Periodont Res* 17, 495-497 (1982).

Amano A, Sharma A, Lee JY, Sojar H, Raj P & Genco R. Structural domains of Porphyromonas gingivalis recombinant fimbriin that mediate binding to salivary prolin-rich protein and statherin. *Infect Immun* 64, 1631-1637 (1996).

American Academy of Periodontology. Position Paper. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 67, 831-838 (1996).

American Academy of Periodontology. Parameter on "refractory" periodontitis. *J Periodontol* 71(suppl 5), 859-860 (2000).

American Academy of Periodontology. Parameter on periodontal maintenance. *J Periodontol* 71(suppl 5) (2000).

American Academy of Periodontology. Position Paper. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 75, 1553-1565 (2004).

Arakawa S, Nakajima T, Ishikura H, Ichinose S, Ishikawa I & Tsuchida N. Novel apoptosis-inducin activity in *Bacteroides forsythus* : a comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 68, 4611-4615 (2000).

Armitage CC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 4(1), 1-6 (1999).

Ashimoto A, Chen C, Bakker I & Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 11, 266-273 (1996).

Asikainen S & Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000 20, 65-81 (1999).

Asikainen S, Chen C & Slots J. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* genotypes in relation to serotypes and periodontal status. *Oral Microbiol Immunol* 10, 65-68 (1995).

Asikainen S, Chen C & Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 11, 387-394 (1996).

Avila-Campos MJ & Velasquez-Melendez G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in Sao Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44, 1-5 (2002).

Baehni P, Tsai CC, McArthur WP, Hammond BF & Taichman NS. Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of plaque-derived gram-negative microorganism. *Infect Immun* 24, 233-243 (1979).

Baker PJ, Butler R & Wikesjö UME. Bacterial sampling by absorbant paper points. An *in vitro* study. *J Periodontol* 62, 142-146 (1991).

Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E & Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 16(5), 306-310 (2001).

Baron S, Poast J, Richardson CJ, Nguyen D & Cloyd M. Oral transmission of Human Immunodeficiency Virus by infected seminal fluid and milk : a novel mechanism. *J Infect Dis* 181, 498-504 (2000).

Barrett M. The protozoa of the mouth in relation to pyorrhea alveolaris. *Dent Cosmos* 56, 948-953 (1914).

Beck JD, Koch GG, Rozier RG & Tudor GE. Prevalence and risk indicator for periodontal attachment loss in a population of older community-dwelling blacks and whites. *J Periodontol* 61, 521-528 (1990).

Beikler T, Abdeen G, Schnitzer S, Salzer S, Ehmke B, Heinecke A & Flemmig TF. Microbiological shifts in intra- and extraoral habitats following mechanical periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 31, 777-783 (2001).

Berglundh T, Krok L, Liljenberg B, Westfelt E, Serino G & Lindhe J. The use of metronidazole and amoxicillin in the treatment of advanced periodontal disease. A prospective, controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 25, 354-362 (1998).

Bernal LA, Guillot E, Paquet C & Mouton C. Beta-lactamase producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 13, 36-40 (1998).

Blandizzi C, Malizia T, Lupetti A & et al. Periodontal tissue disposition of azithromycin in patients affected by chronic inflammatory periodontal diseases. *J Periodontol* 70, 960-966 (1999).

Bogert M, Berthold P, Brightman V & al. e. Longitudinal study of LJP families-two years of surveillance. *J Dent Res* 68, 312 (abstr 1042) (1989).

Boyer BP, Ryerson CC, Reynolds HS, Zambon JJ, Genco RJ & Snyder B. Colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in adult periodontitis patients as detected by the antibody-based Evalusite Test. *J Clin Periodontol* 23(5), 477-484 (1996).

Bragd L, Dahlén G, Wikström M & Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. *J Clin Periodontol* 14, 95-99 (1987).

Britt MR & Pohlod DJ. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol* 57, 104-107 (1986).

Burdon KL. *Bacterium melaninogenicum* from normal and pathologic tissues. *J Infect Dis* 42, 161-171 (1928).

Butz-Jørgensen E & Lombardi T. Antifungal therapy in the oral cavity. *Periodontology* 2000 10, 89-106 (1996).

Carranza FA, Saglie R, Newman MG & Valentin PL. Scanning and transmission electron microscopic study of tissue-invading microorganisms in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 54, 598-617 (1983).

Caton JftAAoP. Periodontal diagnosis and diagnostic aids: consensus report. In: *Proceedings of the World Workshop in Clinical Periodontics* (1989).

Chan ECS & McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Microbiol Immunol* 15, 1-9 (2000).

Chandad F, Guillot E & Mouton C. Detection of *Bacteroides forsythus* by immunomagnetic capture and PCR-DNA probe assay. *Oral Microbiol Immunol* 12, 311-317 (1997).

Chandad F & Mouton C. Antigenic, structural, and functional relationships between fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 63, 4755-4763 (1995).

Charon J & Mouton C. Parodontie médicale (ed. CdP E) (2003).

Chaves ES, Jeffcoat MK, Ryerson CC & Snyder B. Persistent bacterial colonization of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *actinobacillus actinomycetemcomitans* in periodontitis and its association with alveolar bone loss after 6 months of therapy. *J Clin Periodontol* 27, 897-903 (2000).

Chen CK, Dunford R, Reynolds H & Zambon J. *Eikenella corrodens* in the human oral cavity. *J Periodontol* 60, 611-616 (1989).

Choi BK, Park SH, Yoo YJ, Choi SH, Chai JK, Cho KS & Kim CK. Detection of major putative periodontopathogens in Korean advanced periodontitis patients using a nucleic acid-based approach. *J Periodontol* 71, 1387-1394 (2000).

Choi I, Nakagawa S, Yamada S, Takazoe I & Okuda K. Clinical, microbiological and immunological studies on recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* 17, 529-539 (1990).

Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjo UM & Genco RJ. Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies. *J Periodontol* 58, 529-539 (1998).

Christersson LA, Slots J & Rosling Genco RJ. Microbiological and clinical effects of surgical treatment of localized juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 12, 465-476 (1985).

Chromarat M, Dubreuil L, Fosse T, Le Goff A, Mouton C, Roques C, Sedallian A & Sixou M. Bactériologie pratique des anaérobies buccodentaires (ed. 2m2) (2m2, Paris, 1999).

Collins JG, Offenbacher S & Arnold RR. Effects of a combination therapy to eliminate *Porphyromonas gingivalis* in refractory periodontitis. *J Periodontol* 64, 998-1007 (1993).

Conrads G. DNA probes and primers in dental practice. *Clinical Infectious Diseases* 35(1), 72-77 (2002).

Contreras A, Falker W, Enwonwu C, Idigbe E, Savage K, Afolabi M & al. e. Human Herpesviridae in acute necrotizing ulcerative gingivitis in children in Nigeria. *Oral Microbiol Immunol* 12, 259-265 (1997).

Contreras A, Nowzari H & Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol* 15, 15-18 (2000).

Contreras A & Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodont Res* 35, 3-16 (2000).

Contreras A, Umeda M, Chen C, Bakker I, Morrison JL & Slots J. Relationship between herpesviruses and adult periodontitis and periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 70, 478-484 (1999).

Contreras A, Zadeh HH, Nowzari H & Slots J. Herpesvirus infections of inflammatory cells in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 14, 206-212 (1999).

Conway TB, Beck FM & Walters JD. Gingival fluid ciprofloxacin levels at healthy and inflamed periodontal sites. *J Periodontol* 71, 1448-1452 (2000).

Crockett AO & Wittwer CT. Fluorescein-labelled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical Biochemistry* 290, 89-97 (1998).

Crockett AO & Wittwer CT. Fluorescein-labeled oligonucleotides for real-time PCR: using the inherent quenching of deoxyguanosine nucleotides. *Analytical Biochemistry* 290, 89-97 (2001).

Dahlén G, Manji F, Baelum V & Fejerskov O. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. *J Clin Periodontol* 19, 35-42 (1992).

Dahlén G, Wikström M & Renvert S. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. A 5-year follow-up on individual patterns. *J Periodontol* 67, 879-887 (1996).

Dahlén G & Wikström M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 10, 42-46 (1995).

Dangtuan ST & Rudney JD. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 34, 2674-2678 (1996).

Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP & Kinane DF. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. *J Clin Periodontol* 27, 417-424 (2000).

Dawson MT, Powell R & Gannon F. Gene Technology. *Oxford: BIOS Scientific Publishers* (1996).

Dewhirst F, Tamer M, Ericson R, Lau C, Levanos V, Boches S & al. e. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. *Oral Microbiol Immunol* 15, 196-202 (2000).

Di Murro C, Paolantonio M, Pedrazzoli V, Lopatin DE & Cattabriga M. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J Periodontol* 68, 18-23 (1997).

Dibart S, Skobe Z, Snapp K, Socransky SS & Smith CM. Detection of subgingival species on or in epithelial cells. *J Dent Res* 73, 161(abstr 475) (1994).

Dickinson DP, Kubinieć MA, Yoshimura F & Genco RJ. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* 170, 1658-1665 (1988).

Ding Y, Uitto VJ, Haapasalo M, Lounatmaa K, Kontinen YT, Salo T, Grenier D & Sorsa T. Membrane components of *Treponema denticola* trigger proteinase release from human polymorphonuclear leukocytes. *J Dent Res* 75, 1986-1993 (1996).

DiRienzo JM, Slots J, Sizou M, Sol MA, Harmon R & McKay TL. Specific genetic variants of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. *Infect Immun* 62, 3058-3065 (1994).

Doungudomdacha S, A. R, Walsh TF & Douglas CW. Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* at adult periodontitis sites. *J Clin Periodontol* 28, 437-445 (2001).

Du L, Pellen-Mussi P, Chandad F, Mouton C & Bonnaure-Mallet M. Fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 mediate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells. *Infect Immun* 65, 3875-3881 (1997).

Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z & Xie H. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 61, 2260-2265 (1993).

Dzink J, Socransky SS & Haffajee A. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15, 316-323 (1988).

Ebersole JL, Taubman MA & Smith DJ. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. II. Distribution and specificity of local antibody responses. *J Periodont Res* 20, 349-356 (1985).

Eick S & Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *J Clin Periodontol* 29(7), 638-644 (2002).

Eley BM & Cox SW. Bacterial proteases in gingival crevicular fluid before and after periodontal treatment. *British Dental Journal* 178, 133-139 (1995).

Eliopoulos GM. Synergism and antagonism. *Infect Dis Clin North Am* 3, 399-406 (1989).

Ellen RP & Galimanas VB. Spirochetes at the forefront of periodontal infections. *Periodontology 2000* 38, 13-32 (2005).

Ellen RP & McCulloch CAG. Evidence versus empiricism: rational use of systemic antimicrobials for treatment of periodontitis. *Periodontology 2000* 10, 29-44 (1996).

Etienne D. Locally delivered antimicrobials for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Diseases* 9(suppl 1), 45-50 (2003).

Evans RT, Klausen B, Sojar HT & al. e. Immunization with *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriae protects against periodontal destruction. *Infect Immun* 60, 2926-2935 (1992).

Ezzo PJ & Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology 2000* 32, 24-35 (2003).

Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Steffen MJ & Holt SC. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in a murine lesion model : potential synergistic effects on virulence. *Infect Immun* 64, 2095-2100 (1997).

Fives-Taylor P, Hutchins Meyer D, Mintz K & Brissette C. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology 2000* 20, 136-167 (1999).

Flemmig TF, Milian E, Kopp C, Karch H & Klaiber B. Differential effects of systemic metronidazole and amoxicillin on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in intraoral habitats. *J Clin Periodontol* 25, 1-10 (1998).

Fletcher HM, Schenkein HA, Morgan RM, Bailey KA, Berry CR & Macrina FL. Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W8 mutant deficient in the prtH gene. *Infect Immun* 63, 1521-1528 (1995).

- Fujise O, Hamachi T, Hirofugi T & Maeda K. Colorimetric microtiter plate based assay for detection and quantification of amplified *Actinobacillus actinomycetemcomitans* DNA. *Oral Microbiol Immunol* 10, 372-377 (1995).
- Gajardo M, Silva N, Gomez L, Leon R, Parra B, Contreras A & Gamonal J. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol* 76(2), 289-294 (2005).
- Garcia L, Tercero JC, Legido B, Ramos JA, Alemany J & Sanz M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodont Res* 33, 59-64 (1998).
- Genco CA, Cutler CW, Kapczynski D, Malone K & Arnold RR. A novel mouse model to study the virulence of and host response to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Infect Immun* 59, 1255 (1991).
- Genco RJ, Zambon JJ & Christersson LA. Use and interpretation of microbiological assays in periodontal diseases. *Oral Microbiol Immunol* 1, 73-79 (1986).
- Gibbs RA. DNA amplification by the polymerase chain reaction. *Analytical Chemistry* 62, 1202-1214 (1990).
- Gillespie J, De Nardin E, Radel S, Kuracina J, Smutko J & Zambon J. Production of an extracellular toxin by the oral pathogen *Camphylobacter rectus*. *Microb Pathog* 12, 69-77 (1992).
- Gmür R & Guggenheim B. Interdental supragingival plaque : a natural habitat of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Camphylobacter rectus*, and *Prevotella nigrescens*. *J Dent Res* 73, 1421-1428 (1994).
- Gmür R & Guggenheim B. Periodontal microbial diagnosis. The methods and limits of periodontal microbial diagnosis. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 104(9), 1096-108. (1994).
- Gmur R, Strub JR & Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *J Periodont Res* 24, 113-120 (1989).

Gmur R & Thurnheer T. Direct quantitative differentiation between *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in clinical specimens. *Microbiology* 148, 1379-1387 (2002).

Goldstein EJ, Citron DM, Merriam CV, Warren Y & Tyrell K. Comparative in vitro activities of ABT-773 against aerobic and anaerobic pathogens isolated from skin and soft-tissue animal and human bite wound infections. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2525-2529 (2000).

Greenstein G. Microbiologic assessments to enhance periodontal diagnosis. *J Periodontol* 59, 508-515 (1988).

Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML & Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status. *J Clin Microbiol* 36, 3239-3242 (1998).

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE & et al. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol* 66, 23-29 (1995).

Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW & et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 65, 260-267 (1994).

Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RLJ & Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 24, 324-334 (1997).

Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RLJ & Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 25(5), 346-353 (1998).

Haffajee AD, Dibart S, Kent RLJ & Socransky SS. Clinical and microbiological changes associated with the use of 4 adjunctively administered agents in the treatment of periodontal infections. *J Clin Periodontol* 22, 618-627 (1995).

Haffajee AD, Dzink JL & Socransky SS. Effect of modified Widman flap surgery and systemic tetracycline on the subgingival microbiota of periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 15, 390-398 (1988).

Haffajee AD & Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5, 78-111 (1994).

Haffajee AD & Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota. *J Clin Periodontol* 28, 377-388 (2001).

Haffajee AD, Socransky SS, Feres M & Ximenez-Fyvie LA. Plaque microbiology in health and disease. In : Newman HS, Wilson M (eds). *Dental plaque revisited : oral biofilms in health and diseases*. Cardiff : Cardiff School of Biosciences/Cardiff University., 255-282 (1999).

Haffajee AD, Socransky SS & Gunsolley JC. Systemic anti-infective periodontal therapy. A systematic review. *Ann Periodontol* 8, 115-181 (2003).

Haffajee AD, Teles RP & Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontology* 2000 42, 219-258 (2006).

Halebian S, Harris B & Finegold S. Rapid method that aids in distinguish Gram-positive and Gram-negative anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 13, 444-446 (1981).

Haubek D, Dirienzo JM, Tinoco EM, Wetergaard J, Lopez NJ, Chung CP, Poulsen K & Kilian M. Racial tropism of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated with juvenile periodontitis. *J Clin Periodontol* 35, 3037-3042 (1996).

Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N & Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 29, 657-660 (2002).

Haubek D, Poulsen K, Asikainen S & Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 33, 395-401 (1995).

Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dalhèn G & Kilian M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol* 34, 576-578 (1996).

Helgeland K & Nordby O. Cell cycle-specific growth inhibitory effect on human gingival fibroblasts of a toxin isolated from the culture medium of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodont Res* 28, 161-165 (1993).

Helovuo H, Hakkarainen K & Paunio K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeast after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microbiol Immunol* 8, 75-79 (1993).

Hemmings KW, Griffiths GS & Bulman JS. Detection of neutral protease (Periocheck) and BANA hydrolase (Perioscan) compared with traditional clinical methods of diagnosis and monitoring of chronic inflammatory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 24(2), 110-114 (1997).

Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GH & Vogt PH. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques* 23, 504-511 (1997).

Hillman JD, Socransky SS & Shivers M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. *Arch Oral Biol* 30, 791-795 (1985).

Hirschfeld M, Weis JJ, Toshchakov V, Salkowski CA, Cody MJ, Ward DC, Qureshi N, Michalek SM & Vogel SN. Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69, 1477-1482 (2001).

Holt SC & Progulskan A. General microbiology, metabolism and genetics. In: *Oral Microbiology and Immunology*, eds. Newman MG & Nisengard R., 55-125. Philadelphia: WB Saunders Co. (1988).

Huart-Delcourt A, Ménard C, Du L, Pellen-Mussi P, Tricot- Doleux S & Bonnaure-Mallet M. Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells : analysis y flow cytometry. *Eur J Oral Sci* 106, 938-944 (1998).

Isogai E, Sogal H, Tkagi S, Ishii N, Fujii N, Kimura K, Harashi M & Yoshimura F. Fimbriae-specific immune response in various inbred mice inoculated with *Porphyromonas gingivalis* 381. *Oral Microbiol Immunol* 9, 118-122 (1994).

Izutsu KT, Belton CM, Chan A, Fatherazi S, Kanter JP, Park Y & al. e. Involvement of calcium in interaction between gingival epithelial cells and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 144, 145-150 (1996).

Jankowski JAZ & Polak JM. Clinical Gene Analysis and Manipulation. *Cambridge: Cambridge University Press* (1996).

Jervoe-Storm P, AlAhdab H, Fimmers R & et al. Evaluation of sampling methods for subgingival bacteria by real-time PCR. *J Clin Periodontol* 33(suppl 7), 80 (2006).

Johansson A, Sandström G, Claesson R, Hänström L & Kalfas S. Anaerobic neutrophil-dependent killing of *Acinobacillus actinomycetemcomitans* in relation to the bacterial leukotoxicity. *Eur J Oral Sci* 108, 136-146 (2000).

Johnson PW, Ng W & Tonzetich J. Modulation of human gingival fibroblast cell metabolism by methyl mercaptan. *J Periodont Res* 27, 476-483 (1992).

Jotwani R, Palucka AK, Al-Quotub M, Kim J, Bell D, Banchereau J & Cutler CW. Dendritic cells infiltrate T-cell rich region of oral mucosa in chronic periodontitis : *in situ*, *in vivo* and *in vitro* studies. *J Immunol* 167, 4693-4700 (2001).

Kawada M, Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Saito T, Oho T & Koga T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by realtime PCR. *Oral Microbiol Immunol* 19, 289-292 (2004).

Kesavalu L, Holt LC & Ebersole JL. Virulence of a polymicrobial complex, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*, in amuine model. *Oral Microbiol Immunol* 13, 373-377 (1988).

Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K & Okuda K. Distribution of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. *J Periodont Res* 30, 332-341 (1995).

Kiley P & Host SC. Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect Immun* 30, 862-873 (1980).

Kinder S, Holt S & Kornman K. Penicilin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. *J Clin Microbiol* 23, 1127-1133 (1986).

Klein MI & Gonclaves RB. Detection of *Tannerella forsythensis* (*Bacteroides forsythus*) and *Porphyromonas gingivalis* by polymerase chain reaction in subjects with different periodontal status. *J Periodontol* 74, 798-802 (2003).

Ko KSC, Lo CM, Ferrier J, Hannam P, Tamura M, McBride BC & Ellen RP. Cell-substrate impedance analysis of epithelial cell shape and micomotion upon challenge

with bacterial proteins that perturb extracellular matrix and cytoskeleton. *J Microbiol Methods* 34, 125-132 (1998).

Kolenbrander PE, Andersen RN, Clemans DL, Whittaker CJ & Klier CM. Potential role of functionally similar coaggregation mediators in bacterial succession. In : Newman HS, Wilson M (eds). *Dental plaque revisited : oral biofilms*. Cardiff : Cardiff school of Biosciences/Cardiff University, 171-186 (1999).

Kolenbrander PE, Ganeshkumar N, Cassels FJ & Hugues CV. Coaggregation : specific adherence among human oral plaque bacteria. *FASEB J* 7, 406-413 (1993).

Kolenbrander PE & London J. Adhere today, here tomorrow : oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 175, 3247-3252 (1993).

Kontani M, Ono H, Shibata H, Okamura Y, Tanaka T, Fujiwara T & al. e. Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infect Immun* 64, 756-762 (1996).

Kornman KS, Newman MG, Moore DJ & Singer RE. The influence of supragingival plaque control on clinical and microbial outcomes following the use of antibiotics for the treatment of periodontitis. *J Periodontol* 65, 848-864 (1994).

Kornman KS & Robertson PB. Clinical and microbiological evaluation of therapy for juvenile periodontitis. *J Periodontol* 56, 443-446 (1985).

Korostoff J, Wang JF, Kieba I, Miller M, Shenker BJ & Lally ET. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. *Infect Immun* 66, 4474-4483 (1998).

Kremer BH, Loos BG, van der Velden U, van Winkelhoff AJ, Craandijk J, Bultuis HM, Hutter J, Varoufaki AS & van Steenberghe TJ. *Peptostreptococcus micros* smooth and rough genotypes in periodontitis and gingivitis. *J Periodontol* 71(2), 209-218 (2000).

Kumar PS, Griffen AL, Barton JA, Paster BJ, Moeschberger ML & Leys EJ. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res* 82, 338-344 (2003).

Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML & Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *J Clin Microbiol* 43(8), 3944-3955 (2005).

Lai CH, Listgarten MA, Shirakawa M & Slots J. *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Microbiol Immunol* 13, 152-157 (1987).

Laine ML, Appelmek BJ & van Winkelhoff AJ. Prevalence and distribution of six capsular serotypes of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis patients. *J Dent Res* 76, 1840-1844 (1997).

Lally ET, Golub EE, Kieba IR, Taichman NS, Rosenbloom J, Rosenbloom JC, Gibson CW & Demuth DR. Analysis of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. Delineation of unique features and comparison to monologous toxins. *J Biol Chem* 264, 15451-15456 (1989).

Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D & Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 63, 3878-3885 (1995).

Lamont RJ & Jenkinson HF. Life below the gum line : pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1244-1263 (1998).

Lamster IB, Celenti RS, Jans HH, Fine JB & Grbic JT. Current status of tests for periodontal disease. *Advance in Dental Research* 7, 182-190 (1993).

Lang N, Barthold PM, Cullinan M, Jeffcoat MK, Mombelli A, Murakami S, Page RC, Papapanou P, Tonetti M & Van Dyke T. Consensus Report: Aggressive periodontitis. *Ann Periodontol* 4, 53 (1999).

Lawer G, Lippke J, Frey G, Theodoras A & Keyville M. Isolation of a DNA probe for tetracycline resistance from *B.intermedius*. *J Dent Res* 69, 376 (1990).

Lee JY, Sojar HT, Bedi GS & Genco RJ. *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* fimbriillin : size, amino-terminal sequence, and antigenic heterogeneity. *Infect Immun* 59, 383-389 (1991).

Lembariti BS, Mikx FH & van Palenstein Helderman WH. Microscopic spirochete counts in untreated subjects with and without periodontal tissur destruction. *J Clin Periodontol* 22, 235-239 (1995).

Lépine G & Progulske-Fox A. Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 11, 65-78 (1996).

Levy RM, Giannobile WV, Feres M, Haffajee AD, Smith C & Socransky SS. The short-term effect of apically repositioned flap surgery on the composition of the subgingival microbiota. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry* 19, 555-567 (1999).

Leys EJ, Griffen AL, Strong SJ & Fuerst PA. Detection and strain identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by nested PCR. *J Clin Microbiol* 32, 1288-1294 (1994).

Leys EJ, Lyons SR, Moeschberger ML, Rumpf RW & Griffen AL. Association of *Bacteroides forsythus* and a novel *Bacteroides* phylotype with periodontitis. *J Clin Microbiol* 40, 821-825 (2002).

Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *J Periodontol* 47, 1-18 (1976).

Listgarten MA, Lai CH & Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 64, 155-161 (1993).

Listgarten MA & Levin S. Positive correlation between the proportions of subgingival spirochetes and motile bacteria and susceptibility of human subjects to periodontal deterioration. *J Clin Periodontol* 8, 122-138 (1981).

Listgarten MA & Loomer PM. Microbial identification in the management of periodontal diseases. A systematic review. *Ann Periodontol* 8(1), 182-192 (2003).

Listgarten MA, Slots J, Nowotny AH & et al. Incidence of periodontitis recurrence in treated patients with and without cultivable *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis*. A prospective study. *J Periodontol* 62, 377-386 (1991).

Listgarten MA, Wong MY & Lai CH. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycetemcomitans*-positive patient population. *J Periodontol* 66, 158-164 (1995).

Loe H, Theilade E & Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol* 36, 177-187 (1965).

Loesche W. The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv Dent Res* 2, 275-283 (1988).

Loesche W, Syed S, Laughon B & Stoll J. The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis. *J Periodontol* 2, 223-230 (1982).

Loesche WJ. DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J Periodontol* 63, 1102-1109 (1992).

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J & Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 19, 103-112 (1992).

Loesche WJ, Grossman N & Giordano J. Metronidazole in periodontitis (IV). The effect of patient compliance on treatment parameters. *J Clin Periodontol* 20, 96-104 (1993).

Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G & Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 30, 427-433 (1992).

Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 34, 49-56 (2004).

Loos B, Dyer D, Genco R, Selander R & Dickinson D. Natural history and epidemiology of *Porphyromonas gingivalis*. In : Shah HN, Mayrand D, Genco RJ (eds). *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. Boca Raton : CRC Press. (1993).

Lyons SR, Griffen AL & Leys EJ. Quantative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol* 38, 2362-2365 (2000).

Macdonald JB, Socransky SS & Gibbons RJ. Aspects of the pathogenesis of mixed anaerobic infections of mucous membranes. *J Dent Res* 42, 529-544 (1963).

Machtei EE, Dunford R, Hausmann E, Grossi S, Powell J, Cummins D, Zambon JJ & Genco RJ. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 24(2), 102-109 (1997).

Machtei EE, Hausmann E, Dunford R, Grossi S, Ho A, Davis G, Chandler J, Zambon J & Genco RJ. Longitudinal study of predictive factors for periodontal disease and tooth loss. *J Clin Periodontol* 26(6), 374-380 (1999).

Madinier I, Doglio A, Cagnon L, Lefebvre JC & Monteil RA. Southern blot detection of human papillomaviruses (HPVs) DNA sequences in gingival tissues. *J Periodontol* 63, 667-673 (1992).

Magnusson I, Low SB, McArthur WP & et al. Treatment of subjects with refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 21, 628-637 (1994).

Mahanonda R, Seymour GJ, Powell LW, Good MF & Halliday JW. Effect of initial treatment of chronic inflammatory periodontal disease on the frequency of peripheral blood T-lymphocytes specific to periodontopathic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 6, 221-227 (1991).

Malek RJ, Fisher JG, Caleca A, Stinson M, Van Oss CJ, Lee JY, Cho MI, Genco RJ, Evans RT & Dyer DW. Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats. *J Bacteriol* 176, 1052-1059 (1994).

Mandell RL, Tripodi LS, Savitt E, Goodson JM & Socransky SS. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 57, 94-99 (1986).

Marchal N, Bourdon JL & Richard C. Les milieux de culture. *Paris : Doin.* (1991).

Mättö J, Saarela M, von Troil-Lindén B, Könönen E, Jousimies-Somer H, Torkko H & al. e. Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 11, 96-102 (1996).

Mayanagi G, Sato T, Shimauchi H & Takahashi N. Detection frequency of periodontitis-associated bacteria by polymerase chain reaction in subgingival and supragingival plaque of periodontitis and healthy subjects. *Oral Microbiol Immunol* 18, 379-385 (2004).

Mayrand D & Grenier D. Biological activities of outer membranes vesicles. *Can J Microbiol* 35, 607-613 (1989).

Mayrand D & Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 52, 134-152 (1988).

Ménard C & Mouton C. Clonal diversity of the taxon *Porphyromonas gingivalis* assessed by random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Infect Immun* 63, 2522-2531 (1995).

Meuer S, Wittwer C & Nakagawara K. Rapid cycle Real-time PCR. *Methods and Applications*. Berlin: Springer-Verlag. (2001).

Meyer DH, Sreenivasan PK & Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 59, 2719-2726 (1991).

Mombelli A. Critical issues in periodontal diagnosis. *Periodontology 2000* 39, 9-12 (2005).

Mombelli A, Casagni F & Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. *J Clin Periodontol* 29(suppl 3), 10-21 (2002).

Mombelli A, Gmür R, Frey J, Meyer J, Zee K, Tam J & al. e. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in young Chinese adults. *Oral Microbiol Immunol* 13, 231-237 (1998).

Moncla BJ, Braham P, Dix K, Watanabe S & Schwartz D. Use of synthetic oligonucleotide DNA probes for the identification of *Bacteroides gingivalis*. *J Clin Microbiol* 28, 324-327 (1990).

Moncla BJ, Braham P, Rabe LK & Hillier SL. Rapid presumptive identification of black-pigmented gram-negative anaerobic bacteria using 4-methylumbelliferone derivatives. *J Clin Periodontol* 29, 1955-1958 (1991).

Moore L, Moore W, Cato E, Smibert R, Burmeister J, Best A & al. e. Bacteriology of human gingivitis. *J Dent Res* 66, 989-995 (1987).

Moore L, Moore W, Cato E, Smibert R, Burmeister J, Palcanis K & al. e. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect Immun* 48, 507-519 (1985).

- Moore W. Microbiology of periodontal disease. *J Periodont Res* 22, 335-341 (1987).
- Moore W & Moore L. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 5, 66-77 (1994).
- Morillo JM, Lau L, Sanz M, Herrera D & Silva A. Quantitative real-time PCR based on single copy gene sequence for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 38, 518-524 (2003).
- Moter AC, Hoenig BK, Choi BK, Riep B & Göbel UB. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. *J Clin Microbiol* 36, 1399-1403 (1998).
- Mousques T, Listgarten MA & Phillips RW. Effect of scaling and root planing on the composition of the human subgingival microbial flora. *J Periodont Res* 15, 144-151 (1980).
- Mouton C & Chandad F. Hemagglutination and hemagglutinins. In : Shah HN, Mayrand D, Genco RJ (eds). *Biology of the species Porphyromonas gingivalis*. Boca Raton : CRC Press, 119-217 (1993).
- Muller HP, Eger T, Lobinsky D, Hoffman S & Zoller LA. Longitudinal study of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in army recruits. *J Clin Periodont Res* 32, 69-78 (1997).
- Muller HP, Eickholz P, Heinecke A, Pohl S, Muller RF & Lange DE. Simultaneous isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from subgingival and extracrevicular locations of the mouth. *J Clin Periodontol* 22, 413-419 (1995).
- Nakamura T, Fujimura S, Obata N & Yamazaki N. Bacteriocin-like substance (melaninocin) from oral *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect Immun* 31, 28-32 (1981).
- Nakayama K, Kadawi T, Okamoto K & Yanamoto K. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) -deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence. *J Biol Chem* 270, 2319-23626 (1995).
- Netuschil L, Brex M, Vohrer KG & Riethe P. Vital fluorescence to assess in vitro and in vivo the antibacterial effects of amalgams. *Acta Stomatol Belg* 93(3), 129-134 (1996).

Neumaier M, Braun A & S. W. Fundamentals of quality assessment of molecular amplification methods in clinical diagnostics (for the International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division Committee on Molecular and Biology Techniques). *Clinical Chemistry* 44, 12-26 (1998).

Nicholl DST. An Introduction to Genetic Engineering. *Cambridge: Cambridge University Press* (1994).

Noiri Y & Ebisu S. Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". *J Periodontol* 71, 1319-1326 (2000).

Noiri Y, Ozaki K, Nakae H, Matsuo T & Ebisu S. An immunohistochemical study on the localization of *Porphyromonas gingivalis*, *Camphylobacter rectus* and *Actinomyces viscosus* in human periodontal pockets. *J Periodont Res* 32, 598-607 (1997).

Offenbacher S & Zambon JJ. Consensus report for periodontal diseases : pathogenesis and microbial factors. *Ann periodontol* 1, 926-932 (1996).

Ogawa T. Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *Eur J Immunol* 219, 737-742 (1994).

Ogawa T & Hamada S. Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segment of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 62, 3305-3310 (1994).

Ogawa T, Uchida H & Hamada S. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and their synthetic peptides induce proinflammatory cytokines in human peripheral blood monocyte cultures. *FEMS Microbiol Lett* 116, 237-242 (1999).

Okada M, Hayashi F, Soda Y, Zhong X, Miura K & Kozai K. Intra-familial distribution of nine putative periodontopathogens in dental plaque samples analyzed by PCR. *Journal of Oral Science* 46, 149-156 (2004).

Olsen I & Socransky SS. Comparison of three anaerobic culture techniques and media for viable recovery of subgingival plaque bacteria. *Scand J Dent Res* 89(2), 165-174 (1981).

Pallasch TJ. Pharmacokinetic principles of antimicrobial therapy. *Periodontology* 2000 10, 5-11 (1996).

Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O & Dahlen G. Subgingival microbiota in adult Chinese : prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 68, 651-666 (1997).

Papapanou PN, Madianos PN, Dahlén G & Sandros J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *European Journal of Oral Sciences* 105, 389-396 (1997).

Park Y & McBride BC. Characterization of the tpr gene product and isolation of a specific protease-deficient mutant of *Porphyromonas gingivalis* W83. *Infect Immun* 61, 4139-4146 (1993).

Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ & De Graaff J. In vitro susceptibilities of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to a number of antimicrobial combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 36, 2634-2638 (1992).

Pavicic MJAMP, Van Winkelhoff AJ, Douque NH, Steures RWR & De Graaff J. Microbiological and clinical effects of metronidazole plus amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *J Clin Periodontol* 21, 107-112 (1994).

Persson R, Weinberg A, Brunsvold M & al. e. Humoral immunity to *P.gingivalis* and periodontitis in *M.fascicularis*. III. Clinical results. *J Dent Res* 72, 358 (1993).

Pike R, McGraw W, Potempa J & Travis J. Lysozyme and arginine-specific proteases from *Porphyromonas gingivalis* : Isolation and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. *J Biol Chem* 269, 406-411 (1994).

Potempa J, Pike R & Travis J. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* 63, 1176-1182 (1995).

Pulendran B, Kumar P, Cutler CW, Mohamadzadeh M, Van Dyke T & Banchereau J. Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses *in vivo*. *J Immunol* 167, 5067-5076 (2001).

Purucker P, Mertes H, Goodson JM & Bernimoulin JP. Local versus systemic adjunctive antibiotic therapy in 28 patients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 72(9), 1241-1245 (2001).

Rams T, Feik D, Listgarten M & Slots J. *Micromonas micros* (*Peptostreptococcus micros*) in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 7, 1-6 (1992).

Rams T, Feik D & Slots J. *Camphylobacter rectus* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 8, 230-235 (1993).

Rams TE, Listgarten MA & Slots J. Utility of 5 major putative pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. *J Clin Periodontol* 23, 346-354 (1996).

Ramseier CA. Potential impact of subject-based risk factor control on periodontitis. *J Clin Periodontol* 32(suppl 6), 283-290 (2005).

Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J & Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 17, 345-350 (1990).

Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I & Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 28(9), 860-864 (2001).

Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ & Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *J Periodont Res* 31, 496-501 (1996).

Riviere GR, Elliot K, Adams D, Simonson L, Forgas L, Nlius A & al. e. Relative proportions of pathogen-related oral spirochetes (PROS) and *Treponema denticola* in supragingival and subgingival plaque from patients with periodontitis. *J Periodontol* 63, 131-136 (1992).

Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA & Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *J Periodontol* 67, 109-115 (1996).

Riviere GR, Weisz KS, Simonson LG & Lukehart SA. Pathogen-related spirochetes identified within gingival tissue from patients with acute necrotizing ulcerative gingivitis. *Infect Immun* 59, 2653-2657 (1991).

Rodenburg JP, van Vinkelhoff AJ, Winkel EG, Goene RJ, Abbas F & deGraff J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *J Clin Periodontol* 17, 392-399 (1990).

Rudney JD & Chen R. Intracellular *Bacteroides forsythus* in buccal epithelial cells. *J Dent Res* Annual meeting of AADR 2001, Abstract 799 (2001).

Ryan ME & Golub LM. Modulation of matrix metalloproteinase activities in periodontitis as a treatment strategy. *Periodontology* 2000 24, 226-238 (2000).

Saglia FR, Carranza FAJ & Newman MG. The presence of bacteria within the oral epithelium in periodontal disease. I. Scanning and transmission electron microscopic study. *J Periodontol* 56, 618-624 (1985).

Saglia FR, Simon K, Merrill J & Koeffler HP. Lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* stimulates macrophages to produce interleukin-1 and tumor necrosis factor mRNA and protein. *Oral Microbiol Immunol* 5, 256-262 (1990).

Sakamoto M, Huang Y, Ohnishi M, Umeda M, Ishikawa I & Benno Y. Changes in oral microbial profiles after periodontal treatment as determined by molecular analysis of 16S rRNA genes. *J Med Microbiol* 53, 653-671 (2004).

Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I & Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen.nov., comb.nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 3), 841-849 (2002).

Sakellari D, Goodson JM, Kolokotronis A & Konstantinidis A. Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva. *J Clin Periodontol* 27, 53-60 (2000).

Salari MH & Kadkhoda Z. Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *J Oral Sci* 46(3), 157-161 (2004).

Sandros J, Madianos PN & Papapanou PN. Cellular events concurrent with *Porphyromonas gingivalis* invasion of oral epithelium in vitro. *Eur J Oral Sci* 104, 363-371 (1996).

Sandros J, Papapanou P & Dahlén G. *Porphyromonas gingivalis* invades oral epithelial cells in vitro. *J Periodont Res* 28, 219-226 (1993).

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM & Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques : a review. *J Clin Periodontol* 31(12), 1034-1047 (2004).

Sanz M, Quirynen M & on behalf of the European Workshop of Periodontology group A. Advances in the aetiology of periodontitis consensus report of the 5th European workshop in periodontology. *J Clin Periodontol* 32(suppl 6), 54-56 (2005).

Savitt ED, Strzempko MN, Vaccaro KK, Peros WJ & French CK. Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius* in subgingival plaque samples. *J Periodontol* 59, 431-438 (1988).

Schochetman G, Ou CY & Jones WK. Polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases* 158, 1154-1157 (1988).

Sefton AM, Maskell JP, Beighton D & et al. Azithromycin in the treatment of periodontal disease. Effect on microbial flora. *J Clin Periodontol* 23, 998-1003 (1996).

Shah HN & Gharbia SE. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. *Intern J System Bacteriol* 42, 542-546 (1992).

Shelbourne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH & Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque. Comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *Journal of Microbiology* 39, 97-107 (2000).

Shibata DK. The polymerase chain reaction and the molecular genetic analysis of tissue biopsies. In: *Diagnosis Molecular Pathology*, eds. Herrington CS & McGee JO, Oxford: Oxford University Press 2, 85-112 (1992).

Shiloah J, Patters MR, Dean JW, Bland P & Toledo G. The prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Bacteroides forsythus* in humans 1 year after 4 randomized treatment modalities. *J Periodontol* 69, 1364-1372 (1998).

Shivers M, Hillman JD & Socransky SS. *In vivo* interactions between *Streptococcus sanguis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Dent Res* 66, 195-198 (1987).

Simonson LG, Goodman C, Bial J & Morton H. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. *Infect Immun* 56, 726-728 (1987).

Simonson LG, Goodman CH & Morton HE. Quantitative immunoassay of *Treponema denticola* serovar C in adult periodontitis. *J Clin Microbiol* 28, 1493-1496 (1990).

Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Diseases* 9(suppl 1), 54-62 (2003).

Sixou M, Duffaut-Lagarrigue D & Lodter JP. Comparaison entre quatre techniques de prélèvements bactériologiques sous-gingivaux. *J Biol Bucc* 19, 16-21 (1991).

Slots J. Comparison of five growth media and two anaerobic techniques for isolating bacteria from dental plaque. *Scand J Dent Res* 83(5), 274-278 (1975).

Slots J. Update on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease. *J Intern Acad Periodontol* 4, 121-126 (1999).

Slots J. Herpesviruses, the missing link between gingivitis and periodontitis? *J Int Acad Periodontol* 6(4), 113-119 (2004).

Slots J, Feik D & Rams T. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 5, 149-154 (1990).

Slots J, Feik D & Rams TE. *In vitro* antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonas from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 5, 298-301 (1990).

Slots J, Reynolds HS & Genco RJ. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 29, 1013-1020 (1980).

Slots J & Schonfeld S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. In : Hamada S, Holt SC, McGhee JR (eds). *Periodontal disease pathogens and host immune responses*. Tokyo : Quintessence Books, 53-64 (1991).

Slots J & Taubman Me. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. St. Louis : Mosby-Year Book, 428p (1992).

Slots J & Ting M. *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease : occurrence and treatment. *Periodontology* 2000 20, 82-121 (1999).

Slots J & Ting M. Systemic antibiotic in the treatment of periodontal disease. *Periodontology* 2000 28, 106-176 (2002).

Slots J & Van Winkelhoff AJ. Antimicrobial therapy in periodontics. *J Calif Dent Assoc* 21((Nov)), 51-56 (1993).

Smith DJ, Gadalla LM, Ebersole JL & Taubman MA. Gingival crevicular fluid antibody to oral microorganisms. III. Association of gingival homogenate and gingival crevicular fluid antibody levels. *J Periodont Res* 20, 357-367 (1985).

Smith GLF, Sansone C & Socransky SS. Comparison of two methods for the small-scale extraction of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 4, 135-140 (1989).

Smith GLF, Socransky SS & Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 4, 47-51 (1989).

Socransky SS & Haffajee AD. Evidence of bacterial etiology : a historical perspective. *Periodontology* 2000 5(7-25) (1994).

Socransky SS & Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000 38, 135-187 (2005).

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C & Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25, 134-144 (1998).

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG & Goodson JM. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol* 19(6), 352-362 (2004).

Socransky SS, Haffajee AD, Smith GLF & Dzink JL. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 14, 588-593 (1987).

Socransky SS, Smith C & Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 29, 260-268 (2002).

Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE & Levin AE. Checkerboard DNA-DNA hybridization. *Biotechniques* 17, 788-792 (1994).

Spitznagel J, Kraig E & Kolodubretz D. Regulation of leukotoxin in leukotoxic and nonleukotoxic strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 59, 1394-1401 (1991).

Stevens RH, Lilard SE & Hammond BF. Purification and biochemical properties of a bacteriocin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 55, 692-697 (1987).

Suda R, Kobayashi M, Nanba R, Iwamaru M, Hayashi Y, Lai CH & Hasegawa K. Possible periodontal pathogens associated with clinical symptoms of periodontal disease in Japanese high school students. *J Periodontol* 75(8), 1084-1089 (2004).

Syed SA & Loesche WJ. Efficiency of various growth media in recovering oral bacterial flora from human dental plaque. *Appl Microbiol* 26(4), 459-465 (1973).

Takamatsu N, Yano K, He T, Umeda M & Ishikawa I. Effect of initial periodontal therapy on the frequency of detecting *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol* 70, 574-580 (1999).

Takeuchi Y, Umeda M, Sakamoto M, Benno Y, Huang Y & Ishikawa I. *Treponema socranskii*, *Treponema denticola*, and *Porphyromonas gingivalis* are associated with severity of periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 72, 1354-1363 (2001).

Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL & Kent RLJ. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 25(2), 85-98 (1998).

Tanner ACR, Maiden MF, Zambon JJ, Thoren GS & Kent RLJ. Rapid chair-side DNA probe assay of *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res* 33, 105-117 (1998).

Taubman MA, Haffajee AD, Socransky SS, Smith DJ & Ebersole JL. Longitudinal monitoring of humoral antibody in subjects with destructive periodontal diseases. *J Periodont Res* 27, 511-521 (1992).

Teles RP, Haffajee AD & Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology* 2000 42, 180-218 (2006).

Tezel A, Yucel O, Orbak R, Kara C, Kavrut F, Yagiz H & Sahin T. The gingival crevicular fluid ciprofloxacin level in subjects with gingivitis and periodontitis, and its effects on clinical parameters. *J Periodont Res* 40(5), 395-400 (2005).

Theilade E, Wright WH, Jensen SB & Loe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodont Res* 1, 1-13 (1966).

Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, Arief EM, Armand S, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ & Van der Velden U. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents : Longitudinal clinical data and prospective clinical and microbiological risk assessment. *J Clin Periodontol* 27, 932-942 (2000).

Timmerman MF, Van der Weijden GA, Arief EM, Armand S, Abbas F, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ & Van der Velden U. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents : Subgingival microbiota in relation to experienced progression of periodontitis. *J Clin Periodontol* 28, 617-627 (2001).

Ting M & Slots J. Microbiological diagnostics in periodontics. *Compendium* 18, 861-876 (1997).

Umeda M, Chen C, Bakker I, Contreras A, Morrison JL & Slots J. Risk indicators for harbouring periodontal pathogens. *J Periodontol* 69, 1112-1119 (1998).

Umeda M, Contreras A, Chen C, Bakker I & Slots J. The utility of whole saliva to detect the oral presence of periodontopathic bacteria. *J Periodontol* 69, 828-833 (1998).

Umeda M, Tominaga Y, He T, Yano K, Watanabe H & Ishikawa I. Microbial flora in the acute phase of periodontitis and the effect of the local administration of minocycline. *J Periodontol* 69, 422-427 (1996).

Van der Velden U, Abbas F, Armand S, Loos B, Timmerman M, Van der Weijden G, Van Winkelhoff A & Winkel EG. Java project on periodontal diseases. The natural development of periodontitis: risk factors, risk predictors and risk determinants. *J Clin Periodontol* 33(8), 540-548 (2006).

Van der Weijden G, Timmerman M, Reijerse E, Wolffe G, van Winkelhoff A & van der Velden U. The prevalence of *A.actinomycetemcomitans*, *P.gingivalis*, and *P.intermedia* in selected subjects with periodontitis. *J Clin Periodontol* 21, 583-588 (1994).

van Steenberghe TJ, Timmerman MF, Mikx FH, de Quincey G, van der Weijden GA, van der Velden U & de Graaff J. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. *J Clin Periodontol* 23(10), 955-959 (1996).

van Steenberghe D, Rosling B, Soder PO, Landry RG, van der Velden U, Timmerman MF, McCarthy EF, Vandenhoven G, Wouters C, Wilson M, Matthews J & Newman HN. A 15-month evaluation of the effects of repeated subgingival minocycline in chronic adult periodontitis. *J Periodontol* 70, 657-667 (1999).

Van Winkelhoff AJ, Goene RJ, Benschop C & Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Implants Res* 11, 511-520 (2000).

Van Winkelhoff AJ, Herrera GD, Winkel EG, Delleijn-Kippuw N, Vandembroucke-Grauls CM & Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 27, 79-86 (2000).

Van Winkelhoff AJ, Rams TE & Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontology* 2000 10, 45-78 (1996).

Van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goene RJ, Abbas F, Winkel EG & De Graaff J. Metronidazole plus amoxicillin in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol* 16, 128-131 (1989).

van Winkelhoff AJ, Tjihof CJ & de Graaff J. Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *J Periodontol* 63, 52-57 (1992).

Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U, Clement M & De Graaff J. Intra-oral distribution of black-pigmented *Bacteroides* species in periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 3, 83-85 (1988).

van winkelhoff AJ & Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology* 2000 39, 40-52 (2005).

Walker C & Gordon J. The effect of clindamycin on the microbiota associated with refractory periodontitis. *J Periodontol* 61, 692-698 (1990).

Watanabe K & Frommel TO. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. *J Dent Res* 72(6), 1040-1044 (1993).

Weinberg A, Belton CM, Park Y & Lamot RJ. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 65, 313-316 (1997).

Wennström JL, Dahlén G, Svensson J & Nyman S. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides intermedius*: predictors of attachment loss? *Oral Microbiol Immunol* 2, 158-162 (1987).

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U & Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 28, 296-305 (2001).

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Vangsted T & Van der Velden U. Effects of metronidazole in patients with "refractory" periodontitis associated with *Bacteroides forsythus*. *J Clin Periodontol* 24, 573-579 (1997).

Winkel EG, Van Winkelhoff AJ & Van der Velden U. Additional clinical and microbiological effects of amoxicillin and metronidazole after initial periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 25, 857-864 (1998).

Wolf HF, Rateitschak EM & KH. R. Parodontologie. Diagnostic microbien - Méthodes de test (2005).

Xie H, Cai S & Lamont RJ. Environmental expression of fimbrial gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 65, 2265-2271 (1997).

Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD & Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 27, 722-732 (2000).

Yamamoto S, Mogi M, Kinpara K, Ishihara Y, Ueda N, Amano K & al. e. Anti-proliferative capsular-like polysaccharide antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptotic cell death in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Dent Res* 78, 1230-1237 (1999).

Yang HW, Huang YF & Chou MY. Occurrence of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontally diseased and healthy subjects. *J Periodontol* 75, 1077-1083 (2004).

Yoshie H, Ohtake T, Hasegawa K & Hara K. Detection of peptidase activity from *Treponema denticola*, *Porphyromonas forsythus*, and *Bacteroides forsythus* as a means of periodontal therapy evaluation. *Periodontal Clin Investig* 17(1), 23-28 (1995).

Zambon J, Christersson LA & Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *J Periodontol* 54, 707-711 (1983).

Zambon JJ, Bochacki V & Genco RJ. Immunological assays for putative periodontal pathogens. *Oral Microbiology and Immunology*. 1, 39 (1986).

Zambon JJ, Reynolds HS, Chen P & Genco RJ. Rapid identification of periodontal pathogens in subgingival dental plaque : comparison of indirect immunofluorescence microscopy with bacterial culture for detection of *Bacteroides gingivalis*. *J Periodontol* 56(suppl 11), 32 (1985).



FACULTE D'ODONTOLOGIE

Jury : Président : C. STRAZIELLE – Professeur des Universités
 Juges : P. AMBROSINI – Maître de Conférences des Universités
 N. MILLER – Maître de Conférences des Universités
 C. BOUTELLIEZ-BISSON – Maître de Conférences des Universités

Thèse pour obtenir le diplôme D'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

présentée par: **Mademoiselle CRITON Marie, Alain, Dominique**

né(e) à: **LAXOU (Meurthe-et-Moselle)**

le **02 décembre 1982**

et ayant pour titre : **«Diagnostic microbiologique en parodontologie : méthodes et intérêts cliniques»**

Le Président du jury,



C. STRAZIELLE



Autorise à soutenir et imprimer la thèse

2717.

NANCY, le 2 MAR. 2007

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy-1



CRITON (Marie). Diagnostic microbiologique en parodontologie : méthodes et intérêts cliniques

Th. : Chir-Dent. : NANCY-1 : 2007

MOTS CLES : Parodontite--Diagnostic
Test microbiologique
Bactéries pathogènes--Identification

CRITON (Marie). Diagnostic microbiologique en parodontologie :
méthodes et intérêts cliniques.

Th. : Chir-Dent. : NANCY-1 : 2007

L'étiologie bactérienne des parodontites a depuis longtemps été mise en évidence. Cependant, les nouvelles connaissances à propos de l'écosystème que représente la plaque dentaire ont permis de corréler la présence des bactéries du complexe rouge avec la pathologie. Les bactéries de ce complexe sont : *T.denticola*, *P.gingivalis*, et *T.forsythensis*. La présence de *A.actinomycetemcomitans* a également été reliée à la parodontite agressive. Les méthodes les plus appropriées pour détecter ces bactéries au sein de la plaque sont la culture et la PCR en temps réel, qui permet un comptage très précis des bactéries. Malgré le manque de recul concernant les intérêts cliniques du diagnostic microbiologique, son utilité a déjà été démontrée dans certains cas. Lors d'un échec du traitement, de récurrence de la pathologie, et chez les patients atteints de parodontite agressive, le diagnostic microbiologique permet d'identifier les bactéries à cibler, puis de s'assurer de leur diminution ou élimination. Il permet donc d'évaluer le besoin de soins et d'adapter les traitements, en particulier en ce qui concerne l'antibiothérapie adjuvante.

JURY :

Présidente	Madame C. STRAZIELLE	Professeur des Universités
Juge	<u>Monsieur P. AMBROSINI</u>	Maître de Conférences des Universités
Juge	Monsieur N. MILLER	Maître de Conférences des Universités
Juge	Madame C. BISSON- BOUTELLIEZ	Maître de Conférences des Universités

CRITON Marie

Adresse de l'auteur : 47 rue Marius Jacotot
92800 PUTEAUX