

UNIVERSITE DE STRASBOURG

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE

ANNEE 2016

N°31

THESE

Présentée pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire

le vendredi 16 septembre 2016

par

GINIES Estelle

Née le 04/10/1990 à SAINT PRIEST

**ETUDE *IN VITRO* DE L'EFFICACITE DU STERILDENT OH52 SUR
L'INFECTION A *E. FAECALIS***

Président : Professeur MINOUX Maryline

Assesseurs : Professeur MEYER Florent

Professeur CLAUSS François

Docteur REITZER François

Membre invité : Docteur ETIENNE Olivier

SOMMAIRE :

INTRODUCTION	<i>page 5</i>
Chapitre 1 : GENERALITES	<i>page 6</i>
Microbiologie et Flore bactérienne endodontique	<i>page 6</i>
Le biofilm canalaire : support de la flore endodontique	<i>page 8</i>
Différents types de flores des infections endodontiques	<i>page 9</i>
<i>Flore des infections endodontiques primaires ou initiale</i>	
<i>Flore des infections endodontiques secondaires (avec lésion péri apicale)</i>	
<i>Flore des infections endodontiques dues à des échecs thérapeutiques</i>	
<i>Enterococcus Faecalis</i> : son rôle dans l'infection endodontique	<i>page 13</i>
Localisation et voies de colonisation de la flore endodontique	<i>page 14</i>
<i>Localisation des bactéries</i>	
<i>Dans le système canalaire</i>	
<i>Au-delà du système canalaire</i>	
<i>Voie de colonisation des bactéries</i>	
Place de l'irrigation dans le traitement endodontique	<i>page 18</i>
Principes et objectifs	<i>page 18</i>
Hypochlorite de sodium	<i>page 19</i>
<i>Propriétés et principe physico-chimique</i>	
<i>Modalités d'action</i>	
<i>Action antiseptique</i>	
<i>Action solvante</i>	
<i>Biocompatibilité</i>	

Echecs des traitements endodontiques et l'irrigation	page 22
Stérident-OH52	page 23
Généralités	page 23
Objectifs cliniques	page 23
Utilisation clinique	page 23
Principe d'action : l'ionisation	page 24
<i>Propriétés physico-chimiques et utilisation</i>	
<i>Action antibactérienne des ions hydroxydes OH-</i>	
Résumé du mécanisme d'action	page 25
Chapitre 2 : Etude <i>in vitro</i> de l'efficacité du Sterident OH25 sur l'infection endodontique à <i>E. Faecalis</i>	page 27
MATERIELS ET METHODES	page 27
Matériels	page 27
Souche bactérienne	page 27
Méthodes	page 27
<i>Test de diffusion en gel d'agarose in vitro</i>	page28
<i>Test d'activité sur dent extraite ex vivo</i>	page32
RESULTATS ET DISCUSSION	page 36
Diffusion sur gel d'agarose	page 36
Etude <i>ex vivo</i> de l'efficacité du Stérident	page 41
CONCLUSION	page 46

TABLE DES FIGURES

- (1) Figure n°1 : Composition de la flore endodontique par culture *in vitro*
SIMON Stéphane, MACHTOU Pierre, PERTOT Wilhelm- Joseph. 2012
Endodontie. Collection accréditée Formation continue JPIO. Paris :
Edition CdP Chapitre 7 et 11
- (2) Figure n°2 : Dentine radulaire et tubuli dentinaires contenant des
bactéries *E. Faecalis* au Microscope électronique à balayage *in vitro*
(unité Inserm UMR-S 1121)
- (3) Figure n°3 : CHARDIN H. BARSOTTI O. BONNAURE-MALLET M.
2006. Microbiologie et odonto-stomatologie. Paris : Edition MALOINE
p248 tableau 3.17
- (4) Figure n°4 : CHARDIN H. BARSOTTI O. BONNAURE-MALLET M.
2006. Microbiologie et odonto-stomatologie. Paris : Edition MALOINE
p248 tableau 3.17
- (5) Figure n°5 : CHARDIN H. BARSOTTI O. BONNAURE-MALLET M.
2006. Microbiologie et odonto-stomatologie. Paris : Edition MALOINE
p248 tableau 3.17
- (6) Figure n°6 et n°7 : Dentine radulaire et tubuli dentinaires contenant
des bactéries *E. Faecalis* au Microscope électronique à balayage *in vitro*
(unité Inserm UMR-S 1121)
- (7) Figure n°8 : <http://www.edp-dentaire.fr/clinique/endodontie/995-la-revolution-oh-52> Publié le vendredi 8 août 2014 11:14 Dentoscope Pr P.-E. LAGARDE et Dr R. P. LAGARDE
- (8) Figure n° 9 et n°10 : Stérident OH52- Site officiel- consulté le
13/03/2016 <http://www.sterident.net>
- (9) Figure n°11 : test de diffusion en gel d'agarose pour quatre formulations
d'hydroxyde de calcium et Chlorhexidine (P. Ravishanker, The internet
journal of dental science, 2008 Volume 8 n°1)
- (10) Figure n°12 : Mise en évidence de l'action d'un antiseptique –
Manipulation *in vitro*- <http://www.bio-top.net/Microbio/TP/Antibiot.htm>
consulté le 13/03/2016

INTRODUCTION :

L'étude de la littérature scientifique sur l'utilisation de l'électrolyse pour la désinfection montre que cette méthode fonctionne lors de son utilisation en milieu salin (présence de NaCl) sur des bactéries planctoniques et des biofilms. L'utilisation est variée depuis l'industrie agroalimentaire jusqu'à son utilisation dans les protocoles de désinfection des surfaces dans les hôpitaux. La plupart des protocoles mettent en avant l'utilisation de « neutral electrolysed water » (NEW) qui correspond à une préparation d'eau salée qui a été électrolysée et qui présente par la suite une quantité variable mais faible de chlore. L'utilisation de courant continu est également évoquée dans les systèmes de désinfection en utilisation simultanée avec des antibiotiques, mais l'effet synergique observé par certaines équipes est remis en question par d'autres. D'autres auteurs avancent que l'effet de ces courants électriques pourrait provenir de la production d'oxygène gazeux, de peroxyde d'hydrogène, de chlore ou encore de la variation de pH. Les effets du courant électrique sur les bactéries ne sont donc pas encore totalement élucidés. Les industriels ont créé un appareil capable de produire une électrolyse afin d'optimiser notre protocole de désinfection canalaire lors du traitement endodontique : le Stérident OH52. La question du mode de fonctionnement de l'appareil Sterident OH-52 est donc de première importance.

Il se pose deux questions pour l'évaluation de cet appareil : pouvons-nous apporter les preuves scientifiques de son activité dans le cadre de l'utilisation dans la désinfection canalaire et quel est le mode d'action de cette méthode ?

Nous nous proposons, en nous basant sur notre double compétence clinique et scientifique, de mener une étude *in vitro et ex vivo* pour déterminer l'efficacité de ce système de désinfection canalaire.

Après avoir défini le cadre de notre étude, nous déterminerons quels protocoles expérimentaux ont été choisis puis quelles conclusions nous pouvons en tirer.

Chapitre 1 : Généralités

I) Microbiologie et flore bactérienne endodontique

Le canal radiculaire, par ses caractéristiques anatomiques et physiologiques, constitue un microenvironnement adapté à la croissance bactérienne. Cette niche écologique favorise la sélection bactérienne. Dans le cas d'infection endodontique, la flore endodontique ne dépasse jamais une vingtaine d'espèces bactériennes à l'inverse de la flore buccale qui peut atteindre plus de 300 espèces. Sa composition se rapproche de la flore liée aux pathologies parodontales. Elle est composée de bactéries anaérobies strictes et facultatives parmi lesquelles prédominent les bacilles Gram négatifs de type *Bacteroides melaninogenicus* : *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, et les Cocci Gram positifs types *Peptostreptococcus*. (1-3)

Grâce au manque d'oxygène, l'endodonte devient un habitat sélectif pour les bactéries anaérobies strictes et facultatives comme *Enterococcus faecalis*.

Toutes les bactéries qui habitent la cavité buccale ont théoriquement la capacité d'envahir le réseau canalaire au cours d'un processus de nécrose pulpaire et d'induire une infection du canal puis de la zone périapicale. (4) Une nécrose pulpaire devient donc septique quand des bactéries protéolytiques échappent aux défenses immunitaires. Elles détruisent les immunoglobulines, les protéines sériques du complément, et produisent des lipopolysaccharides (LPS) résistants à la phagocytose (1). L'ensemble des bactéries présentes lors d'infection endodontique produit des endotoxines (LPS) qui sont à l'origine des lésions inflammatoires périapicales d'origine endodontique (LIPOE).

La régulation du type de bactéries présentes dans le canal au cours d'une infection de l'endodonte dépend des facteurs locaux et de facteurs bactériens. Les bactériocines produites par certaines bactéries Gram + et Gram -, lors d'une nécrose pulpaire, empêchent l'implantation de nouvelles colonies bactériennes. (1) La compétition entre les bactéries intracanales dépend de la quantité de nutriment disponible (tissu pulpaire nécrosé résiduel) et de la surface non colonisée du canal

radiculaire. (1) La sélection et la croissance des germes anaérobies stricts spécifiques de l'infection endodontiques (*P. endodontalis*) sont favorisées par les germes anaérobies facultatifs qui consomment l'oxygène résiduel. Le tissu pulpaire nécrotique stérile n'est pas suffisamment immunogène pour induire à lui seul une lésion péri apicale durable, mais il constitue un excellent substrat pour la croissance bactérienne. (1)

Le déséquilibre entre les bactéries de la flore présente dans les tubuli dentinaires et les moyens immunitaires mis en place par l'organisme provoque une infection endodontique. (4)

Dans le tableau ci-dessous (Figure n°1), nous retrouvons les principales bactéries présentes dans la flore endodontique qui s'organisent ensuite en biofilm.

	GENRES ANAEROBIES	GENRES AEROBIES
Bacilles à Gram négatifs	<i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Campylobacter</i> <i>Treponema</i> <i>Wolinella</i>	<i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella</i>
Bacilles à Gram positifs	<i>Actinomyces</i> <i>Arachia propionica</i> <i>Eubacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Pseudoramibacter</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Lactobacillus</i>
Cocci à Gram négatifs	<i>Veillonella</i>	<i>Neisseria</i>
Cocci à Gram positifs	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>

Figure n°1 : Composition de la flore endodontique par culture *in vitro*. Les spirochètes (*Treponema*) sont à ajouter à cette classification. (1)

a. Le biofilm canalaire : support de la flore endodontique

Un biofilm est une communauté structurée de bactéries, enrobées dans une matrice extracellulaire constituée de polymères de sucre qu'elles produisent, adhérant à une surface biologique ou non. Un biofilm est composé en volume d'environ 15% de bactéries et 85% de matrice. Il est généralement multi-espèces, d'épaisseur et de composition variable et peut se minéraliser. Il isole les bactéries de l'oxygène et de l'immunité de l'hôte.

Un biofilm endodontique se crée au niveau de la paroi canalaire, des tubuli dentinaires et à l'extrémité radiculaire. (3) La phase initiale de colonisation et d'adhésion du biofilm dépend des interactions réversibles ou irréversibles et non spécifiques entre les bactéries et les surfaces. (5) Les bactéries forment des agrégations homotypiques ou hétérotypiques. Le biofilm se développe alors en épaisseur avec une multiplication des bactéries et une communauté de plus en plus complexe et sélective. Nous parlons alors de maturation du biofilm. (5)(Figure n°2)

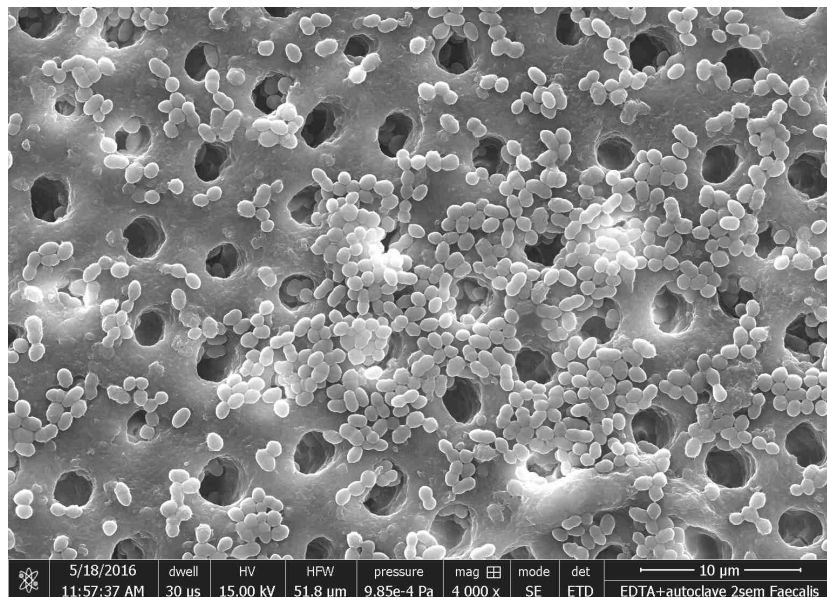


Figure n°2 : Biofilm canalaire contenant des bactéries *E. Faecalis* vu au Microscope électronique à balayage *in vitro*

La vie en communauté dans un biofilm présente un certain nombre d'avantages. Le biofilm possède des mécanismes de résistance grâce une matrice extracellulaire (MEC) qui limite la diffusion des antibactériens. Il représente une barrière contre les agressions extérieures. Les bactéries organisées en biofilm sont 200 à 1000 fois plus résistantes aux agents antibactériens que leur forme planctonique (4). (5)

Le métabolisme du biofilm peut aussi dégrader les molécules de l'hôte par le contorsium des bactéries présentes. Ainsi la consommation d'oxygène des bactéries aérobies augmente la virulence du biofilm en créant des conditions favorables à la croissance des espèces anaérobies. (3)(4) (5)

En endodontie, le biofilm canalaire évolue et s'adapte à l'environnement imposé ou non par le traitement canalaire. (3) Ces amas peuvent contenir différentes formes de micro-organismes tels que des levures (4).

Les biofilms dentaires sont des écosystèmes multi-espèces excessivement complexes où les bactéries buccales peuvent agir de manière synergique ou antagoniste. Malgré les études à notre disposition, la connaissance des biofilms et en particulier le biofilm canalaire reste limitée. (4)

b. Les différents types de flore des infections endodontiques

i. Flore des infections endodontiques primaires ou initiales (5)

La nécrose pulpaire est une infection endodontique initiale sans lésion péri apicale. La flore est poly microbienne (4 à 7 espèces par canal) mixte à prédominance anaérobie et sans pathogénicité spécifique. (3) Elle varie en fonction de la localisation endo-canalaire et du temps.

S'il existe une communication entre le réseau canalaire et le milieu buccal au niveau de la pulpe, la flore endodontique va évoluer. Elle sera alors composée de bactéries aérobies et d'anaérobies facultatives dont majoritairement des Streptocoques oraux (60%). (Figure n°2). A l'inverse, si la pulpe reste fermée, la flore est moins riche et composée en majorité d'anaérobie stricte (80%). (Figure n°3)

Notons que dans le cas de lésions endo-parodontales, la flore endodontique sera essentiellement composée des bactéries parodontopathiques.

	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram +	Anaérobies stricts à Gram +	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram -	Anaérobies stricts à Gram -
Nécrose avec une pulpe ouverte	<i>Actinomyces</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Preptococcus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Treponema</i> <i>Veillonella</i>
Nécrose avec une pulpe fermée		<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Micromonas</i> <i>Preptococcus</i>	<i>Campylobacter</i> <i>Capnocytophaga</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Treponema</i>
Nécrose liée à une lésion endo-parodontale		<i>Preptococcus</i> <i>Peptococcus</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>

Figure n°3 : Principaux genres bactériens isolés à partir d'une nécrose pulpaire. Les spirochètes (*Treponema*) sont inclus dans les bacilles anaérobies stricts à Gram négatif. (3)

ii. Flore des infections endodontiques avec des lésions périapicales (5)

En cas d'absence de traitement d'une dent nécrosée, nous observons la formation d'un granulome péri-apical, la flore endodontique présente alors environ 90% de germes anaérobies stricts. (1). L'envahissement bactérien de l'ensemble du canal et surtout du tiers apical est responsable du développement des granulomes (1).

Cette infection endodontique secondaire indique un phénomène réactionnel : un équilibre entre les bactéries intra canalaire et les réactions de défense de l'hôte au niveau du parodonte (péri apex). Il s'agit d'une réaction inflammatoire dans la région péri-apicale. Elle est liée à la production d'endotoxines par les bactéries proliférant dans le système endocanalinaire qui diffusent au-delà de la dent. (5)

Cette réaction inflammatoire est mise en évidence par une symptomatologie type avec une douleur spontanée et/ou provoquée par le contact dentaire. La flore est plus variée lors d'une pathologie chronique par rapport à une symptomatologie aiguë qui montre une prédominance de bactéries anaérobies gram négatifs. (4) En effet, les bactéries Gram – contiennent des endotoxines qui stimulent la production d'un médiateur de la douleur : la bradikinine. (5)

Par la suite, les parodontites apicales ou granulomes péri-apicales peuvent évoluer vers l'abcès voire une fistulisation de la lésion. Les parodontites apicales aiguës ou l'abcès apical aigu présentent une augmentation de la population bactérienne intra canalaire et une prédominance des bactéries anaérobies : *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas*, *Enterococcus faecalis*.

Nous observons donc deux flores endodontiques qui évoluent de manière concomitante, l'une dans le canal radiculaire et la seconde dans la lésion péri-apicale. L'ensemble des genres bactériens sont répertoriés dans le tableau ci-dessous. (Figure n°4)

	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram +	Anaérobies stricts à Gram +	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram -	Anaérobies stricts à Gram -
Canal radiculaire	<i>Actinomyces</i> <i>Gemella</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Micromonas</i> <i>Preptococcus</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i> <i>Treponema</i> <i>Veillonella</i>
Lésions péri apicales	<i>Actinomyces</i> <i>Sthaphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Micromonas</i> <i>Preptococcus</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Selenomonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Treponema</i>

Figure n°4 : Principaux genres bactériens isolés à partir d'une infection secondaire. Les spirochètes (*Treponema*) sont inclus dans les bacilles anaérobies stricts à Gram négatif. (4)

iii. Flore des infections endodontiques dues à des échecs thérapeutiques (5)

En cas d'échec du traitement endodontique, la flore bactérienne n'est pas identique à la celle des pulpes nécrosées non traitées. (3) Elle est causée par des micro-organismes qui n'étaient pas présents dans l'infection initiale et qui ont pénétré le système canalaire soit lors du traitement, soit entre les séances ou après la fin du traitement endodontique (3).

La microflore présente alors des résistances au traitement canalaire mis en place. Les raisons de ce type d'échecs peuvent être imputées aux vides entre l'obturation et les parois canalaires ainsi que les zones non obturées qui constituent des réservoirs nutritifs bactériens. Elle présente une sélection bactérienne importante au sein du canal où l'on retrouve uniquement 1 à 3 espèces dans les derniers millimètres apicaux avec en général *E. faecalis* qui représente 70% de la flore. (3)

L'évolution des nécroses septiques ou des échecs des traitements endodontiques mènent à une infection bactérienne induites par les germes les plus résistants. Au niveau des dents obturées, nous observons une fréquence plus élevée de streptocoques et entérocoques ainsi que lactobacille et candida. (Figure n°4) *Aggregatibacter* et *E. Faecalis* sont souvent associés aux lésions réfractaires. La flore endodontique varie en fonction de la symptomatologie. (Figure n°5)

	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram +	Anaérobies stricts à Gram +	Aérobies et Anaérobies facultatives à Gram -	Anaérobies stricts à Gram -
Asymptomatique	<i>Actinomyces</i> <i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i>			
Symptomatique	<i>Enterococcus</i> <i>Sthaphylococcus</i>	<i>Actinomyces</i> <i>Eubacterium</i> <i>Micromonas</i> <i>Preptococcus</i> <i>Propionibacterium</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Escherichia</i>	<i>Fusobacterium</i> <i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i>

Figure n°5 : Principaux genres bactériens isolés à partir d'une infection due à un échec endodontique. Les spirochètes (*Treponema*) sont inclus dans les bacilles anaérobies stricts à Gram négatif. (5)

c. *Enterococcus Faecalis* et son rôle dans l'infection endodontique

E. faecalis est une bactérie entérique du type Cocci Gram positif anaérobie facultative, élément de la flore commensale orale. (3) Cette bactérie existe également dans la flore intestinale. Il s'agit d'une des bactéries les plus résistantes de la cavité buccale. (4)

Bactérie phare de la microbiologie endodontique, elle est la bactérie responsable de nombreuses pathologies endodontiques : nécrose, parodontite apicale aigüe et chronique, abcès apical aigu et cellulite. (4)

Résistante à la phagocytose, elle est retrouvée lors des infections endodontiques persistantes.

Elle résiste au défaut du traitement chimio-mécanique canalaire et elle peut se développer à partir d'une petite souche suite à une obturation imparfaite ou en l'absence de la mise en place d'une digue ou encore d'une faute d'asepsie. Elle est apte à survivre dans un canal nécrosé ou présentant une obturation canalaire insuffisante avec un apport nutritif limité. (1) Elle croît et survit à des températures allant de 10 à 60 degrés et à une large gamme de pH (notamment alcalins). Cela explique pourquoi elle reste résistante au médication temporaire tel que l'hydroxyde de calcium qui reste inefficace à cause de son pH alcalin (4). Elle représente jusqu'à 60% de la flore avant un retraitement alors que les anaérobies représentent moins de 40% de la flore. *E. faecalis* est ainsi une des bactéries les plus résistantes de la cavité buccale (3).

Pourtant, sa présence n'est pas obligatoire dans les infections endodontiques initiales. Elle peut pénétrer dans le canal et survivre au sein des canalicules dentinaires au moins un an sans apport nutritionnel et résister aux agents antibactériens et persister après l'obturation. (3) (4) Ainsi, elle est souvent à l'origine d'échec des traitements canalaires. Elle peut provoquer dans un second temps une infection au niveau du péri apex. Mais pour le moment aucune étude n'a montré l'implication nécessaire des entérocoques lors des échecs endodontiques (4)

d. Localisation et voies de colonisation de la flore endodontique (1)(6)

Selon un consensus général, on considère que l'infection endodontique est une infection intra radiculaire. (1) L'ensemble des bactéries sont retrouvées dans le réseau canalaire. Comme un biofilm, elles forment des plaques palissadiques de colonies auto-agrégées et adhèrent aux parois canalaire. Grâce aux débris nécrotiques issus de la pulpe dentaire, les bactéries bénéficient d'une réserve de substrat organique nécessaire à leur métabolisme et restent isolées des tissus péri-apicaux via un accès limité par le foramen apical. La diffusion des bactéries au-delà de l'apex reste donc faible. Cependant, elles colonisent l'ensemble des canalicules dentinaires, les canaux secondaires et/ou accessoires, les deltas apicaux et les cryptes cémentaires apicales. Le foramen apical constitue la dernière barrière fibroconjonctive qui reste perméable aux cellules phagocytaires. (1)

i. Localisation de la flore endodontique

a. Dans le système canalaire (Figure n°6)

Les bactéries sont retrouvées dans l'ensemble du système canalaire : sur les restes de tissu nécrosé, le long des parois canalaire où elles adhèrent les unes aux autres sur plusieurs couches pour former le biofilm, dans les canaux accessoires et les deltas apicaux, les tubuli dentinaires et dans le premier tiers de la dentine péri-canalaire si le ciment est intact.

La localisation principale des micro-organismes à l'origine de la parodontite apicale est le tissu nécrosé des pulpes non vitales. (4)

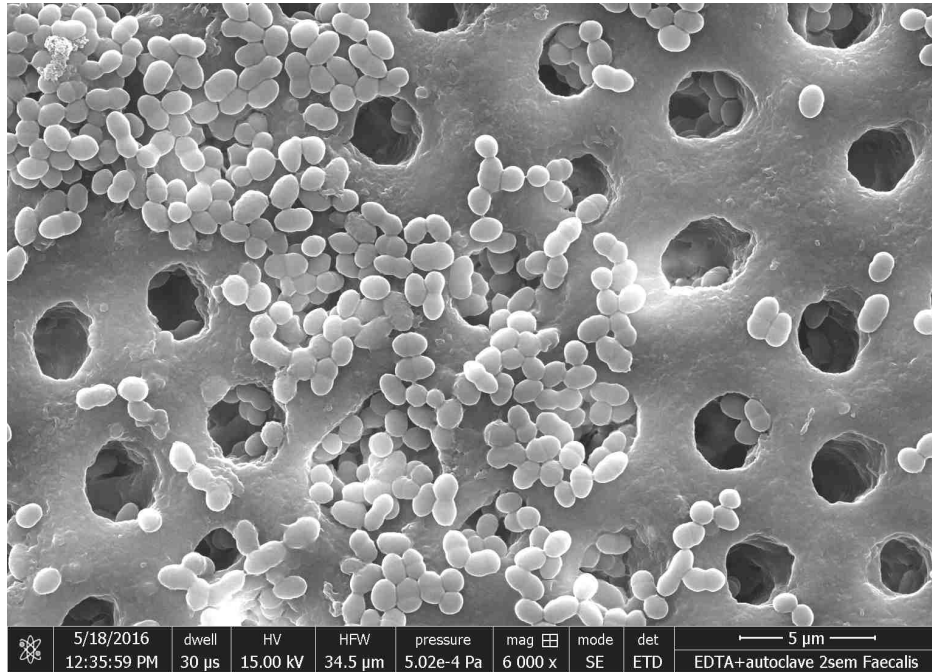


Figure n°6 : Dentine radiculaire et tubuli dentinaires contenant des bactéries *E. Faecalis* au Microscope électronique à balayage *in vitro*

b. Au-delà du système canalaire

Un consensus de 1939 considère que la présence de bactéries dans les tissus péri-apicaux est possible lors de LIPOE mais qu'elles sont vouées à la destruction sauf s'il s'agit de bactéries résistantes type *E. faecalis*. Ces bactéries colonisent alors le péri apex en utilisant leurs propriétés de résistances à la phagocytose. On note aussi des bactéries comme *Actinomyces israelii* et *Arachnia propionica*.

La lésion en elle-même peut contenir des micro-organismes qui sont attachés à l'extrémité radiculaire et se présenter en cellules planctoniques ou en amas. (4) Ces amas peuvent contenir différentes formes microbiennes (levures par exemple).

Dans certains cas l'infection canalaire est responsable des échecs endodontiques en permettant la prolifération et la survie de bactéries au niveau du péri apex grâce à une sur-instrumentation canalaire. (1) Force est de constater qu'une préparation canalaire excessive projetée au-delà de l'apex l'ensemble des micro-organismes et les débris organiques présents dans le réseau canalaire, et provoquer un

saignement qui met en danger une obturation canalaire étanche exempte de bactéries. (4)

ii. Voie de colonisation des bactéries

Les canalicules dentinaires représentent la voie principale de colonisation de l'endodonte à partir d'une lésion carieuse. Le diamètre des tubuli dentinaires varie de 1 à 3 microns et supérieur chez les sujets jeunes et à proximité de la pulpe. Cependant, la taille des bactéries est de l'ordre du micron. Les bactéries ont donc la capacité de coloniser la dentine en profondeur sur plusieurs centaines de microns par l'intermédiaires des canalicules dentinaires. (4)

L'ouverture des tubuli peut être provoquée par une carie ou une fracture dentinaire à distance de la pulpe, la mise à nu des tubuli après la taille des cavités en milieu contaminé par la salive, des restaurations défectueuses ou non étanches, l'attrition due à la mastication ou l'abrasion résultant d'une récession parodontale. (4)

Les tubuli ont un rôle double : la diffusion des substances exogènes et l'invasion bactérienne du réseau canalaire. Cette colonisation des tubuli est malgré tout soumise à plusieurs facteurs : une adhésion bactérienne aux tissus puis leur coopération afin de créer un biofilm. L'endodonte est colonisé lorsque les bactéries s'accumulent dans différents sites grâce à leur division et leur croissance. (4) D'autre part, cette colonisation est dépendante de l'apport nutritionnel disponible et donc du degré de diffusion des substances et de la perméabilité dentinaire. Les bactéries entre alors en coopération ou en compétition pour envahir les canalicules dentinaires. (4) La progression des bactéries se fait par division plutôt que par déplacement autonome. La pénétration des bactéries dans les tubuli peut être facilitée par la pression des matériaux d'obturation, les ciments de scellement associés ou non à la présence de boue dentinaire. (4) (Figure n°7)

Les bactéries intra canalaire doivent donc être éliminées par une action mécanique (préparation canalaire) et chimique (irrigation antibactérienne). (2)(6)

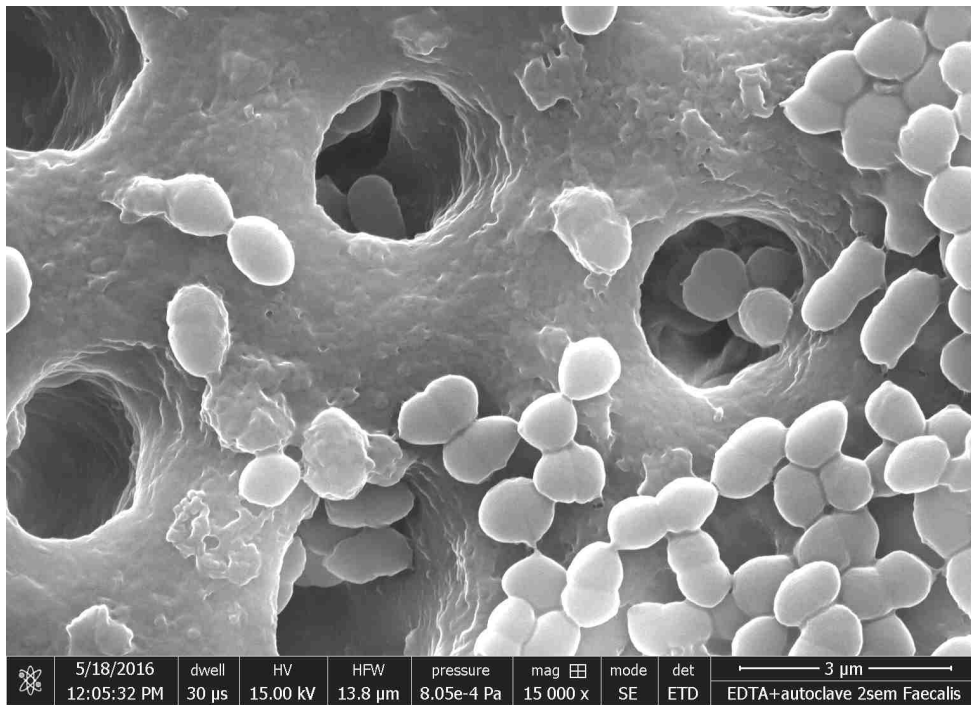


Figure n°7 : Dentine radulaire et tubuli dentinaires contenant des bactéries *E. Faecalis* au Microscope électronique à balayage *in vitro*

II) Place de l'irrigation dans le traitement endodontique

L'objectif du traitement endodontique est d'éliminer l'ensemble des micro-organismes et leurs toxines présentes dans le système endodontique et d'empêcher toute recolonisation extérieure (7). Historiquement, les solutions d'irrigation ont beaucoup évoluées, mais à l'heure actuelle rien ne peut remplacer l'hypochlorite de sodium qui demeure le traitement de référence (8). L'irrigation débute dès l'ouverture de la chambre pulpaire et continue jusqu'à l'obturation tridimensionnelle du réseau canalaire.

a. Le principe et objectifs : (4)

L'objectif de l'irrigation en endodontie est double : la lubrification des instruments canaux et l'élimination des débris organiques et minéraux. (7) Par son action physique, l'irrigation permet ainsi la mise en suspension des débris et des micro-organismes. Elle empêche leur sédimentation et un blocage potentiel du réseau canalaire. D'autre part, l'irrigation a une action chimique qui doit associer : une efficacité anti bactérienne, une action solvante et une biocompatibilité avec les tissus péri-apicaux. (4)

Les études montrent qu'environ un tiers des parois radiculaires ne sont pas préparées mécaniquement (9), l'irrigation a donc un rôle majeur dans la désinfection chimique. En effet, la réussite du traitement canalaire est garantie par l'élimination du tissu pulpaire résiduel qui peut constituer un réservoir nutritionnel pour les micro-organismes persistants dans le réseau canalaire. Une synergie entre l'instrumentation mécanique et l'irrigation antibactérienne potentialise leurs actions.

Une irrigation optimale nécessite la mise en place d'une digue et la constitution d'un réservoir d'irrigant assuré par la cavité d'accès endodontique lors d'un traitement canalaire (par la HAS en 2008). Cependant, le succès d'une désinfection chimique dépend du type, du volume et de la concentration de la solution d'irrigation, des moyens utilisés pour apporter la solution dans le canal, et le temps consacré à l'irrigation finale. (6)

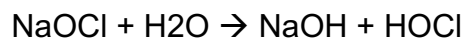
b. Hypochlorite de Sodium

L'hypochlorite de sodium est utilisé en endodontie depuis 90 ans, il a été introduit comme irrigant en 1920 (10). Il est commercialisé principalement pour la désinfection domestique. (6) Il possède un large spectre antibactérien, agit sur les spores, les levures et les virus (4). Il représente la seule solution qui a un effet solvant sur les tissus organiques mais aucun sur les composants minéraux. (3). Il s'agit en général d'une solution de NaOCl 2,5% ou 3% stabilisée avec du chlorure de sodium(NaCl) et tamponnée à un pH de 12. L'hypochlorite de sodium est la solution d'irrigation la plus utilisée en endodontie.

i. Propriétés et principes physico-chimiques (3)(4)

L'hypochlorite de sodium est créé par électrolyse d'une solution de chlorure de sodium (4). $\text{Cl}_2 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{NaOCl} + \text{NaCl} + \text{H}_2\text{O}$

En solution aqueuse (H_2O), l'hypochlorite de sodium (NaOCl) se dissocie en hydroxyde de sodium (NaOH) et acide hypochloreux (HOCl) qui s'ionise en milieu basique en ion hypochlorite (OCl^-) et ions hydrogène (H^+). (11)



En milieu basique :



L'acide hypochloreux et les ions hypochlorites sont en équilibre et le niveau de chlore actif est directement lié au pH de la solution. L'acide hypochloreux a une capacité oxydante plus importante que les ions hypochlorites soit une fonction bactéricide plus importante. L'activité de l'hypochlorite de sodium est d'autant plus efficace que la proportion d' HClO est grande (12).

L'hypochlorite de sodium est dégradé par la libération d'oxygène et la formation de chlorate dues à la lumière, la chaleur et la dégradation naturelle de la solution. Il faut donc des conditions de conservation strictes. En effet, lorsque la solution est stockée et que la dilution a déjà été réalisée, elle doit être conservée dans un flacon opaque à l'abri de la chaleur pendant un délai raisonnable (inférieur à 3 mois). (3)

ii. Modalités d'action (6)

L'hypochlorite de sodium présente des propriétés intéressantes avec un pH basique et un effet durable au niveau du réseau canalaire mais il nécessite un temps d'action minimal pour obtenir une dissolution des débris.

1. Action Antiseptique

L'hypochlorite de sodium est l'antiseptique de choix en endodontie. Son action s'avère rapide et efficace sur les micro-organismes même à de très faibles concentrations à partir de 1% (13).

Cliniquement, la présence d'exsudat inflammatoire, de débris tissulaires et de bactéries dissipent et réduisent l'efficacité de l'hypochlorite de sodium car l'action anti-oxydante de l'hypochlorite de sodium s'inactive à cause des acides gras et des protéines. (4)

L'acide hypochloreux et les ions hypochlorites confère à l'hypochlorite de sodium ses propriétés antiseptiques. *In vitro*, NaClO 2,5% est efficace contre un biofilm d'*Enterococcus faecalis* en moins de 10 minutes (3). A partir de 4%, il est un agent d'irrigation antibactérien de choix sur des dents présentant une pulpe nécrotique ou une pathologie péri-apicale (6) et il a prouvé son efficacité par rapport aux autres solutions d'irrigation. (14)

Malgré tout, il existe une corrélation entre concentration élevée et cytotoxicité importante.

2. Action solvante (13)

L'hypochlorite de sodium est le seul irrigant possédant la capacité de dissoudre les résidus de pulpes nécrotiques (15) et les composants organiques (16).

L'hypochlorite de sodium crée une réaction de saponification en solvant les graisses et des matières organiques. Il dégrade les acides gras en glycérol et en sels

d'acides gras ce qui diminue la tension superficielle de la solution grâce à l'excès NaOH.

L'hypochlorite de sodium neutralise les acides aminés. Nous observons une création d'ions hydroxydes qui induit une réduction du pH. Le chlore provoque une oxydation irréversible des groupements thiol et inhibe les principales fonctions enzymatiques (17).

Les inconvénients liés à ce pouvoir solvant concernent la corrosion des instruments endodontiques durant le traitement canalaire.

3. Biocompatibilité

Les reproches fait à l'hypochlorite de sodium sont multiples : une mauvaise odeur, un mauvais goût, la possibilité d'endommager des vêtements et son ingestion peut être mortelle. (4)

Le principal inconvénient concerne la cytotoxicité de la solution d'irrigation pour l'ensemble des tissus vivants. (6). A une concentration de plus de 5%, il provoque une hémolyse, une ulcération et une nécrose des tissus. (4)

Pourtant leur utilisation en endodontie est à privilégier puisque selon l'étude de Pashley *et al.* ou celle de Chang *et al.* en 2001, les propriétés antibactériennes sont plus élevées dans les solution NaOCl d'au moins 5% malgré l'augmentation de la toxicité de l'irrigant utilisé.

Le principal inconvénient de l'hypochlorite de sodium est donc sa cytotoxicité tissulaire. (2)

c. Les échecs des traitements endodontiques et l'irrigation :

La principale cause d'échec du traitement endodontique est d'origine bactérienne (18) ; force est de constater que la persistance des lésions péri apicales suite à un traitement canalaire est liée aux bactéries persistantes dans le réseau canalaire sous forme de biofilm (19)

L'anatomie canalaire est complexe. La préparation mécanique de l'ensemble du canal endodontique est quasi-impossible. L'irrigation canalaire doit alors prendre le relais et éliminer l'ensemble des tissus vivants ou nécrosés que l'on ne peut pas éliminer mécaniquement. Des configurations canalaire spécifiques comme les anastomoses, les deltas apicaux, les canaux accessoires, les canaux latéraux et les connexions inter-canales empêchent une désinfection chimique de qualité. (4). Il est indispensable pour un nettoyage et une désinfection complète de pouvoir déplacer les solutions d'irrigation dans les zones anfractueuses. Il s'agit d'activer la solution d'irrigation.

Plusieurs solutions ont été proposées par les industriels afin de diminuer les taux d'échec : une activation mécanique par un maitre-cône en gutta-percha, une activation sonore avec l'EndoActivator® ; nous nous intéresserons à une activation électro-chimique : le stérident-OH52.

III) Le Stérident OH-52 (20-23)

a. Généralités

La société Sterildent commercialise un appareil, le Sterildent OH-52, qui est capable de générer un courant de faible intensité dans le système endocanalair. L'établissement de ce courant se fait par l'intermédiaire d'une électrode (électrode négative) pouvant être insérée dans le canal radiculaire d'une dent en cours de traitement endodontique et d'une électrode en contact avec la joue du patient (patch).

La société Sterildent a amassé une certaine quantité de données cliniques sur l'efficacité de son appareillage dans le cadre du traitement de dents présentant une infection endo-canalair. Néanmoins elle n'a pas encore entrepris d'étude systématique sur le sujet.

b. Les objectifs cliniques

- éliminer les foyers infectieux chroniques des canaux secondaires ou provenant des tubules dentinaires. Eviter l'avulsion dentaire.
- stériliser non seulement le canal principal mais aussi les canaux collatéraux, les tubules dentinaires et les lésions péri-apicales.
- éviter toute lésion ou irritation du périodonte, immédiate ou secondaire.
- traiter avec succès une dent infectée en une séance unique

c. Utilisation clinique

Le Stérident OH-52 ne remplace pas la technique de préparation et d'obturation canalair actuelle qui sont bien codifiées et qui restent importantes et nécessaires. L'anesthésie, l'ouverture de chambre, le parage canalair, le drainage et la meilleure obturation canalair possible restent les gestes incontournables. L'utilisation du système ne révolutionne pas les habitudes du praticien.

Pour obtenir un résultat de qualité, il est préférable de pratiquer l'obturation canalair définitive immédiatement après l'application de l'appareil stérident-OH52. Si le

praticien préfère la préparation canalaire sur plusieurs séances, ceci est possible, mais la méthode OH-52 permet quelque soit l'importance de l'infection de traiter en une seule séance.

d. Principe d'action : l'ionisation

i. Principe physico-chimique et utilisation

Un ion est un élément ou une molécule chimique qui a une ou plusieurs charges électrostatiques. Un ion ayant des charges positives est un cation. Un ion ayant des charges négatives est un anion.

Lors de la création d'un courant électrique dans un milieu type eau salée, il va y avoir un phénomène d'électrolyse qui transforme une molécule en plusieurs ions : $H_2O = H^+$ et OH^- ainsi que $NaCl = Na^+$ et Cl^- , c'est l'ionisation.

Les ions OH^- et Cl^- se dirigeront vers l'électrode positive et H^+ et Na^+ vers l'électrode négative.

ii. Action antibactérienne des ions hydroxyle OH^-

Les ions métalliques type OH^- présentent des propriétés bactéricides et de bactériolyse. La surabondance d'ion OH^- entraîne une toxicité sur l'activité microbienne, et la saponification des acides gras.

En effet, les ions hydroxyles endommagent la membrane cytoplasmique des micro-organismes et inhibent la réplication de l'ADN et provoquent ainsi une dénaturation des protéines. (4) Pour être efficace, les ions OH^- doivent diffuser dans les tubules dentinaires. L'effet antibactérien des ions OH^- dépend du pH, du temps d'application et de la distance qui les sépare de la cible bactérienne. (4)

Notons que les bases comme les ions OH^- sont dotées d'un grand pouvoir mouillant. (6)

Pourtant, les ions OH^- représentent une toxicité pour les tissus du péri apex en provoquant leur nécrose.

e. Résumé du Mécanismes d'action

L'ionisation par OH-52 serait déterminante et indispensable pour obtenir la stérilisation complète de l'arbre canalair et des tubules dentinaires.

Une expérience *ex vivo* (dents extraites) sur la diffusion des ions OH⁻ dans les canalicules dentinaires a été réalisée par les industriels. A l'aide de la phénolphtaléine qui se colore en rouge au contact des ions OH⁻ et suite à l'application du stérildent en milieu physiologique, ils ont démontré la diffusion des ions OH⁻ dans les canalicules et les canaux accessoires.

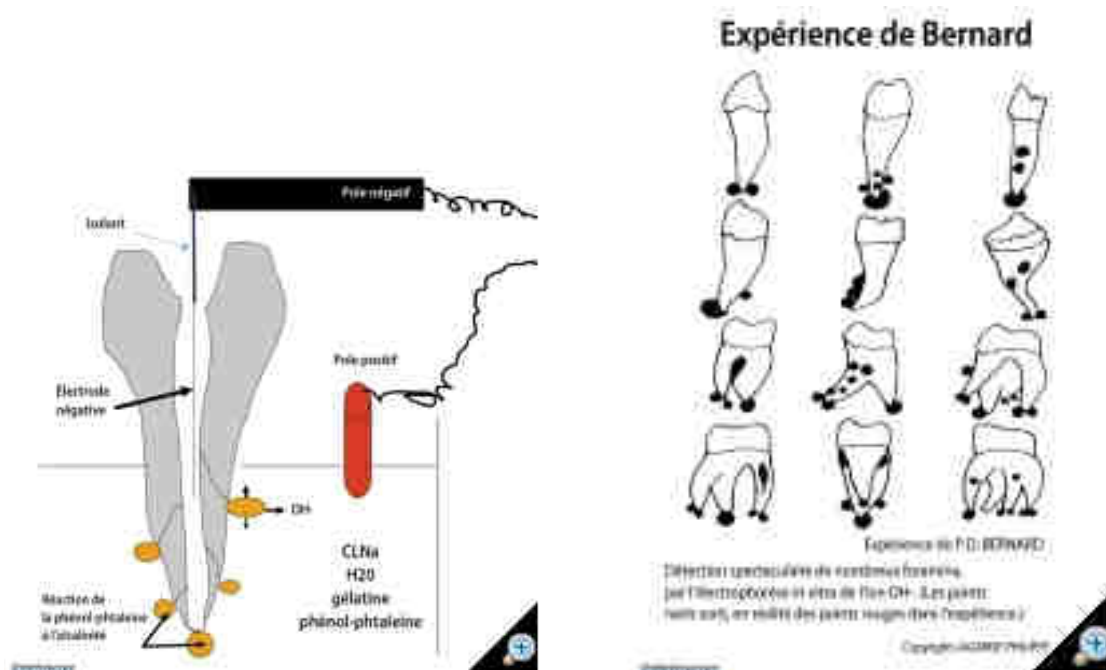


Figure n°8 : Efficacité du Stérildent *ex vivo* avec des racines plongées dans de l'eau salée avec un réactif, la phénolphtaléine, qui se colore en rouge au contact des ions OH⁻.

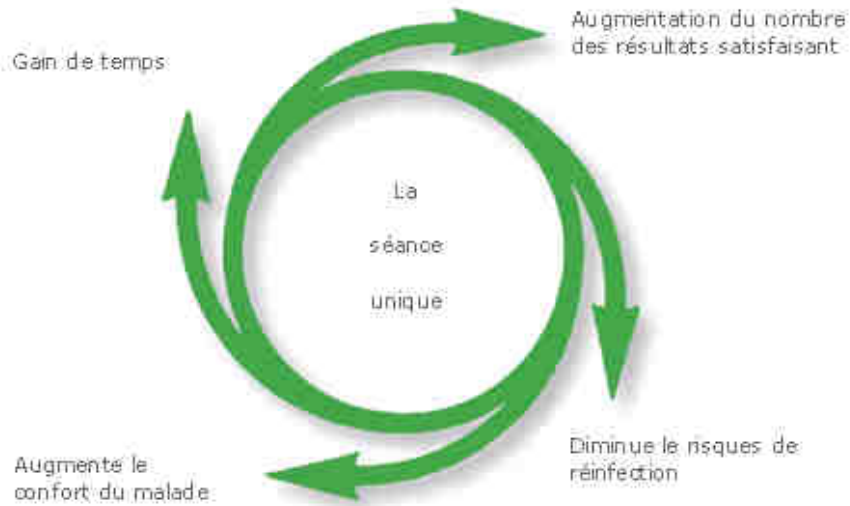


Figure n°9 : Avantages du Stérident selon l'industriel

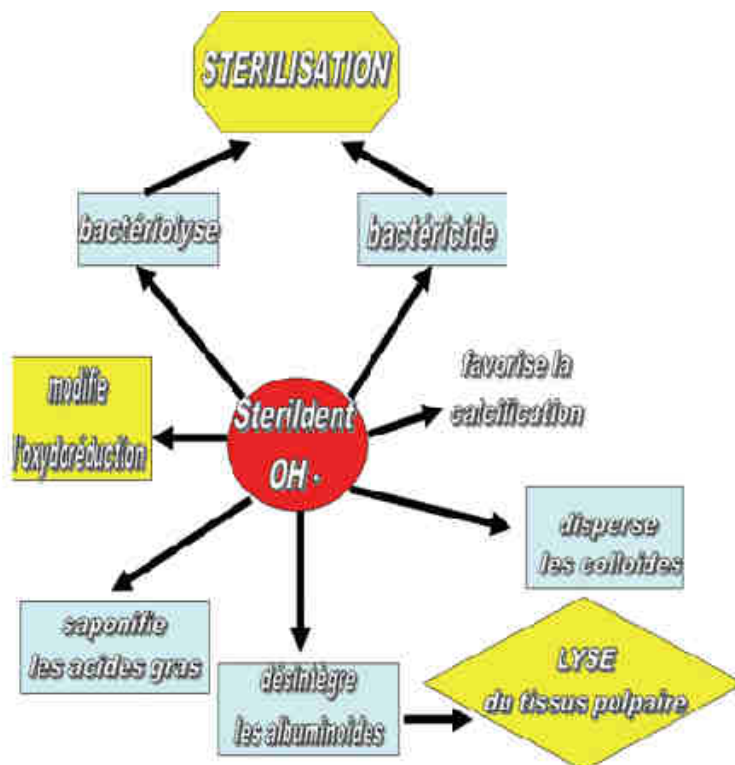


Figure n°10 : Récapitulatif des propriétés du Stérident et des ions OH-

Chapitre 2 : Etude *in vitro* de l'efficacité du Stérident OH25 sur l'infection endodontique à *E. Faecalis*

I) Matériels et Méthodes :

a. Matériels

Les milieux utilisés sont :

- Pour la coulée des geloses : Muller-Hington/ MH (BD DIFCO ref 225250) et Brain Heart Infusion Agar / BHI (BD DIFCO ref 241830)
- Tryptic Soy Broth TSB (SIGMA-ALDRICH ref43592 lot BCB54262V)

Les produits utilisés pour les différents protocoles sont :

- Hypochlorite de sodium commercialisé 2,5% (DENTSPLY France ref 5000571)
- Hypochlorite de sodium commercialisé 6% (COLTENE ENDO Canal Pro NaOCl 6% ref 60011161)
- NaCl 0,9% préparé (SIGMA ALDRICH)
- Phosphate Buffered Salin /PBS (DUTSCHER)

L'appareil Stérident OH52 nous a été prêté par l'entreprise Stérident.

b. Souches bactériennes

La souche utilisée dans ces manipulations est *Enterococcus Faecalis* CCM 2541 qui nous a été donné par UMR-S 1121 (INSSERM). Cette dernière est cultivée en milieu MH, BHI et TSB en aérobiose à 37°C

c. Méthodes

Nous proposons donc dans un premier temps de mettre en place une étude *in vitro* puis *ex vivo* pour confirmer l'efficacité de l'appareil sur une souche bactérienne

d'intérêt dans l'infection endodontique : *E. Faecalis*. Pour être en accord avec les données de la littérature sur l'analyse des procédés de désinfection canalaire, nous prévoyons de réaliser deux tests :

- un premier test d'activité de diffusion en gel d'agarose type Mueller Hington
- un second test d'activité sur dents extraites

Ces deux types de test seront réalisés en présence d'hypochlorite de sodium puisque nous considérons que c'est l'irrigant de choix pour l'endodontie et que l'appareil stérilident doit être utilisé en présence d'hypochlorite selon les données du fournisseur.

La souche bactérienne de référence qui sera utilisée dans les deux séries de test sera *Enterococcus faecalis*, car c'est une souche prévalente dans le microbiote des infections endo-canalaire et pour lequel les méthodes actuelles sont les plus inefficaces.

Ces méthodes permettront de valider l'activité de l'appareil tout en testant des paramètres tels que l'intensité et la durée de l'électrolyse ; Ces éléments seront par la suite essentiels pour pouvoir monter des expériences *in vivo*.

i. Test de diffusion en gel d'agarose : (23-25)

La méthode de diffusion sur gélose a été suivie pour évaluer l'activité antibactérienne de l'hypochlorite de sodium à des concentrations variables avec ou sans Stérilident OH52. Ces études nous permettent de comparer la mesure des zones d'inhibition contre *E. faecalis* et ainsi de déterminer la concentration minimale inhibitrice des deux protocoles.

L'étude de diffusion en gel d'agarose est une technique d'analyse *in vitro* de l'activité d'agents antibactériens tels que les antibiotiques mais qui peut également être utilisée pour les systèmes de désinfection canalaire (Fig 11).

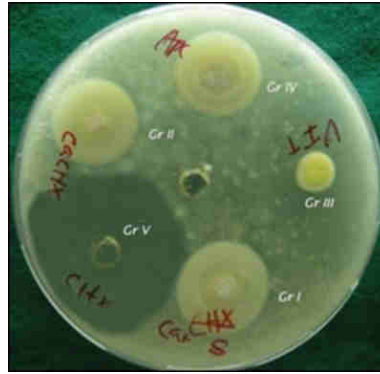


Figure n°11 : test de diffusion en gel d'agarose pour quatre formulations d'hydroxyde de calcium et Chlorhexidine

A l'aide d'un montage expérimental modifiant les sondes de l'appareil sterident OH-52, et permettant de l'utiliser dans une boîte de pétri, nous envisageons de réaliser ces tests de diffusion dans six conditions différentes : en présence d'hypochlorite de sodium (1.25, 1.875, 2.5, 4 et 6%) et en présence d'un milieu salin (NaCl 0,9%).

Le montage du Stérident a été modifié au niveau de l'électrode de référence qui est utilisée en clinique contre la peau du patient, sous la forme d'un patch. Cette cathode est remplacée par un fil d'or qui sera placé dans un puits central de la boîte de pétri avec du NaCl 0,9%. L'ensemble est monté sur un couvercle de boîte de pétris selon la figure n°12.

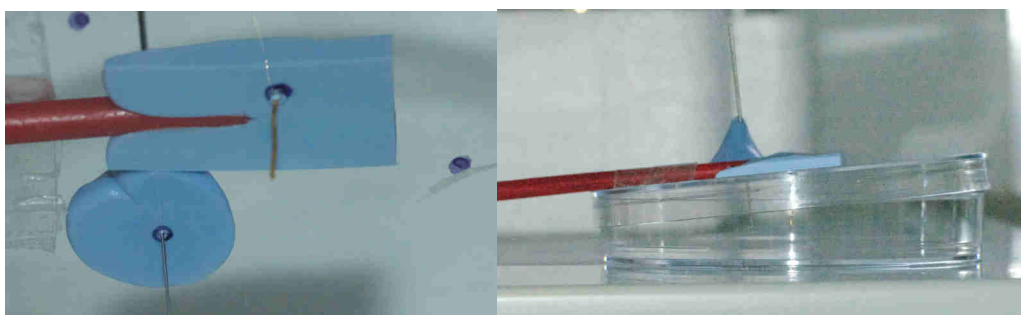


Figure °12 : Montage du Stérident OH52 pour le protocole in vitro

Pour chacune des conditions, le test a été réalisé avec et sans application d'un courant électrique. L'activité sera analysée par mesure de la plage de lyse

observée sur la gélose qui aura été, préalablement au traitement,ensemencée de manière homogène avec une souche d'*E. faecalis*.

Le but de cette étape est de déterminer l'activité de l'appareillage dans les conditions d'utilisation recommandées par le fournisseur.

Suite à cette première phase de tests, le temps d'application du courant électrique et son intensité seront modifiés.

Nous pourrions également déterminer si l'activité de l'hypochlorite de sodium et du courant électrique présentent un effet additif ou synergique.

Nous avons réalisé l'ensemble des manipulations avec un poste de sécurité microbiologique.

Nous débutons pour chaque manipulation par une préculture. Deux tubes sont annotés : un tube témoin et un tube avec la pré-culture. Chaque tube contient un prélèvement de 5mL de milieu Muller-Hington. Nous ajoutons un prélèvement d'une colonie en boîte de pétri d'*Enterococcus Faecalis* pour la pré-culture. Les tubes sont mis en incubation à 37°C pendant 24h en milieu aérobie en agitation orbitale. Le tube témoin, dans lequel aucune colonie n'a été ensemencé permet de relever une quelconque contamination du milieu utilisé.

Nous relevons la Densité Optique à 600nm de la pré-culture à T+24h par rapport à l'échantillon de contrôle MH. La concentration est au minimum de 0,600 pour chacune des manipulations

Pour la première manipulation en diffusion sur gel d'agarose, nous réalisons une première boîte avec seulement deux puits équidistants contenant du NaCl 0,9% ou NaOCl 2,5% sur laquelle nous allons appliquer le Sterident OH52 à sa charge maximale de 500mC afin de constater les résultats obtenus dans les conditions d'utilisation recommandées par le fournisseur.

Pour les manipulations suivantes, nous comparons l'efficacité antibactérienne avec NaOCl seul ou avec Stérident OH52 à une charge équivalente puis variable sur la souche *E. faecalis*.

Nous commençons par réaliser les dilutions : 4 concentrations d'hypochlorite de sodium : 0 %, 1,25%, 2,5% et 4%

- Solutions 2,5% et 6% commerciales
- Solution 1,25% : 500 L de 2,5% et 500 L de NaCl 0,9%
- Solution 4% : 600 L de 6% et 300 L de NaCl 0,9%

Puis nous préparons des boites de culture MH :

- Réalisation de 4 puits équidistants du puits central avec un emporte-pièce à l'aide d'un patron réalisé au préalable. La taille des puits, déterminée par la taille de l'emporte pièce, est de 3 mm de diamètre.
- Ensemencement de chaque boite avec 100 L de la pré-culture et étalement à l'aide d'un rateau selon la méthode décrite dans la figure n°13.

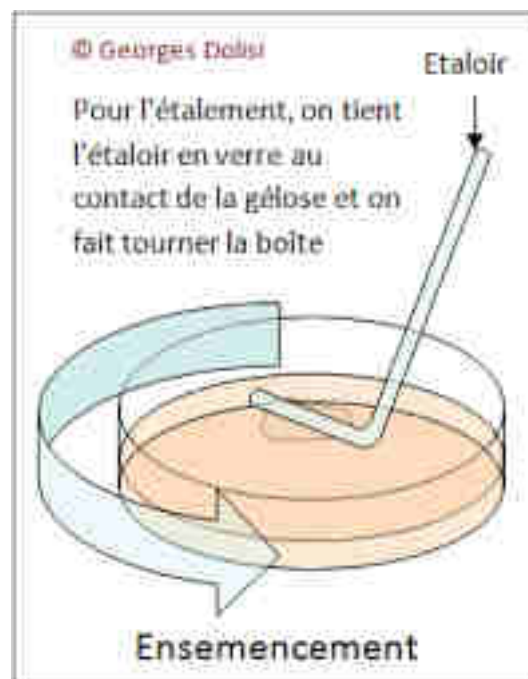


Figure n°13 : Technique ensemencement

Nous remplissons chaque puits avec une concentration d'hypochlorite de sodium différente, par exemple : Puit 1 : NaCl 0,9%, Puit 2 : NaClO 1,25%, Puit 3 : NaClO 2,5%, Puit 4 : NaClO 4%

Nous appliquons en fonction du protocole, le Sterident OH52 un courant de 200mC et 5 mA durant 40 secondes soit un courant de 500mC et 5 mA durant 1min 20 secondes.

La cathode en or est placée au centre la boîte de pétris (avec un puit contenant du NaCl 0,9%) et l'anode en Nickel Titane dans chaque puits.

L'ensemble des boîtes sont mises en incubation en milieu aérobie pendant 24H à 37°C

Après la manipulation T+24h, nous réalisons un relevé de chaque boîte. La mesure de chaque plage de lyse est faite avec une règle double décimètre avec la graduation à 0,5mm, sur un négatoscope.

Ensuite on utilise le site www.agardiffusion.com pour l'analyse des différentes plages de lyse et le calcul de la MIC (Concentration Minimale Inhibitrice) à partir du diamètre de chaque plage de lyse en fonction du dispositif de désinfection.

ii. Test d'activité sur dent extraite : *ex vivo* (26-36)

Les tests d'activité des désinfectants canaux sur dents extraites sont actuellement la norme. Ils permettent d'évaluer l'action dans un contexte proche du contexte clinique. Ils consistent à inoculer des dents extraites et stérilisées avec une souche bactérienne d'*E. faecalis*. Les dents sont ensuite traitées dans les mêmes conditions qu'un traitement endodontique *in vivo*, puis infectées avec une souche référencée. Les dents sont par la suite conservées pendant plusieurs semaines dans un milieu de culture bactérien et la présence résiduelle de bactéries suite au traitement est suivie par la mesure de la croissance bactérienne.

Dans notre étude, nous utilisons des dents monoradiculées (incisives, canines). Les dents seront préparées en suivant un protocole déjà publié (30). Brièvement après avulsion, les dents sont conservées dans l'hypochlorite de sodium 2,5% puis stérilisées en autoclave à 121°C pendant 20min. La couronne de chaque dent récoltée sera sectionnée au niveau de la jonction amélo-cémentaire avec une scie microtomique (BONWILL SCIENTIFIC (USA)) à l'aide d'un disque diamanté (Diamond Wafer Blade de ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES (France)) après

avoir vérifié la longueur de la racine et la perméabilité de chaque canal avec une lime K10. Les racines sont préparées pour avoir une longueur standard de 12 mm. Ne sont inclus dans l'étude que les racines présentant les caractéristiques suivantes : présenter un canal radiculaire unique, une apexification terminée et une courbure radiculaire limitée *i.e* inférieure à 5 degrés. Nous éliminons de notre population les dents cariées au-dessous de la jonction amélo-cémentaire, fracturées, fissurées ou perforées, et ayant déjà été traitées endodontiquement. Nous obtenons une population de 50 dents.

Le canal est alors instrumenté avec une lime 10 et 15, type flexofile, jusqu'à l'apex. Les racines seront préparées de manière conventionnelle à l'aide du système Protaper®. Nous utilisons successivement 4 instruments : le S1 et le S2 travaillant en retrait pour augmenter la conicité des 2/3 coronaires puis le F1 et le F2 pour préparer le 1/3 apical. Une séquence de Protaper® est utilisée pour cinq dents puis elle est renouvelée. Nous réalisons un rinçage de 2mL de NaClO 2,5% et la vérification de la perméabilité avec lime 10 entre chaque instrument de rotation continue puis un rinçage final à EDTA 17% pendant 10 min suivi du NaCl 0,9%.

Après le séchage des racines, l'ensemble est stérilisé par autoclavage (121° C, 20 minutes) et une pré-culture de bactérie *E. Faecalis* en milieu TSB est préparée.

A l'aide d'une seringue d'irrigation canalaire, chaque canal sera alors inoculé par un milieu de culture bactérien TSB contenant *E faecalis* (DO600nm = 0,645 nm) . Nous remplissons entièrement le canal afin obtenir une goutte à l'apex de la racine. Lors de l'inoculation, la dent est maintenue à l'aide d'une précelle stérile au-dessus d'un tube de 1,5mL, contenant au préalable du TSB. Ce processus est renouvelable jusqu'à l'obtention d'un biofilm endocanalaire. Ce biofilm n'étant pas visible, nous pouvons cependant observer une colonisation bactérienne grâce à l'apparition d'un dépôt blanchâtre au fond des tubes correspondant à l'infection du milieu de culture ne pouvant provenir que des bactéries canalaire. (Figure n°14) Le milieu choisi est le TSB avec 6,5% de Chlorure de sodium (Tryptiase Soy Broth) qui est un milieu très favorable au développement d'un biofilm d'*E. faecalis*. (32) Nous répétons le réensemencement trois fois à T+7jours, T+14jours et T+21jours.

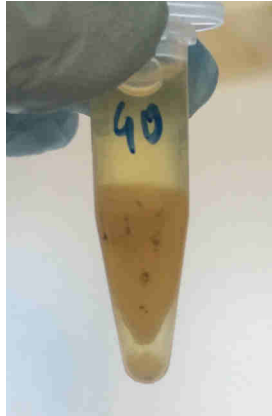


Figure n° 14 : Dent infectée par *E.faecalis* en milieu TSB (protocole *ex vivo*)

Trois groupes de dents seront alors réalisés, l'un subissant un traitement final avec de l'hypochlorite de sodium à 2,5% et l'appareil sterident OH-52, en suivant les données du constructeur (Groupe 3 :21 dents), un autre groupe traité avec de l'hypochlorite de sodium 2,5% seul (Groupe 2 : 20 dents) et le dernier groupe control avec un rinçage final au NaCl 0,9%. (Groupe 1 : 8 dents).

Avant de commencer la désinfection finale, nous vidons le milieu de chaque tube et nous prélevons avec une pointe de papier le biofilm du canal pour vérifier de la présence d'un biofilm et pouvoir par la suite procéder à l'identification de la souche. La pointe de papier est mise en culture avec du BHI pendant 48H dans un tube de 1,5mL.

Nous nettoyons la racine à l'aide d'une compresse stérile imbibée de la Chlorhexidine non diluée.

Nous réalisons le protocole de désinfection finale pour chaque groupe :

- pour le GROUPE 1 : 1 seringue d'irrigation de 2mL de NaCl 0,9% en 40 secondes avec une agitation manuelle de la seringue
- pour le GROUPE 2 : 1 seringue d'irrigation de 2mL de NaClO 2,5% en 40 secondes avec une agitation manuelle de la seringue
- pour le GROUPE 3 : 1 seringue d'irrigation de 2mL de NaClO 2,5% en 40 secondes avec une agitation manuelle de la seringue puis application du stérident-OH52 avec un montage à 300mC et 5mA pendant 1 minute d'application (la dent est maintenue avec du parafilm au-dessus du tube). (Figure n°15)

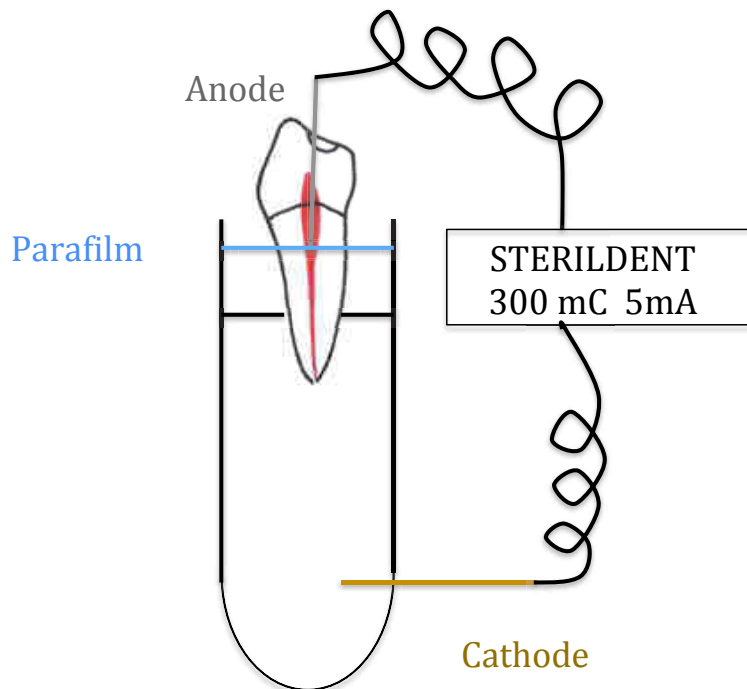


Figure n° 15 : Schéma du dispositif préparé pour le Stérildent OH52 lors du protocole *ex vivo*

Une fois la désinfection faite, nous séchons chaque canal avec une pointe de papier. Pour nettoyer les résidus de Chlorhexidine sur les racines, nous utilisons une compresse imbibée de PBS (solution tampon) et nous réinjectons du milieu TSB directement dans le canal à l'aide d'une seringue afin d'éliminer tous les produits utilisés lors de la désinfection canalaire.

Les racines sont ensuite conservées après traitement dans un milieu de culture spécifique à *E. faecalis* (TSB) et la croissance bactérienne est évaluée par mesure de la DO à 600 nm à J0 puis visuellement pour l'ensemble des autres relevés.

L'activité des deux procédures sera exprimée en pourcentage de dents ne présentant pas de bactéries résiduelles c'est-à-dire sans contamination du milieu de culture ; elle sera relevée environ tous les 3 jours.

Des contrôles d'identification des souches relevées lors de la manipulation seront réalisés au hasard à l'aide de galerie API.

Pour garantir la reproductibilité des résultats et limiter les biais de notre étude, l'ensemble du protocole est réalisé par un endodontiste et nous avons pu calibré à l'aide d'une balance, la vitesse et le volume injecté lors du rinçage final.

II) Résultats et Discussion

Le but de cette étude est de déterminer l'efficacité du Stérident OH25 lors de la désinfection du réseau canalaire infecté par *E. faecalis*.

a. Diffusion en gel d'agarose :

Chaque lecture a été réalisée à T + 24H après la manipulation correspondante. Pour chaque boîte de pétri, la plage de lyse correspond à l'efficacité du protocole de désinfection choisi. Une plage de lyse est circulaire car elle est liée à la diffusion radiale de l'hypochlorite de sodium dans la gélose depuis le puits central à la plage de lyse. Elle est mesurée à partir son plus grand diamètre à l'aide d'un double décimètre (précision 0,5mm) sur un négatoscope.

Pour pouvoir étalonner la concentration minimale inhibitrice (MIC) selon le protocole de Bonev, la mesure du diamètre lyse doit prendre en compte le diamètre du puits réalisé lors de la manipulation. Nous calculons ce diamètre selon la formule suivante : diamètre = plage de lyse – diamètre du punch (3mm). Nous calculons la MIC sur le site www.agardiffusion.com ; cet outil permet de déterminer la MIC à partir des concentrations d'antibactériens et les diamètres des plages de lyse en utilisant l'analyse de régression à la moyenne. Les détails de l'analyse sont décrits dans Bonev *et al.* (26)

Dans un premier temps, nous souhaitons déterminer l'activité de l'appareillage Stérident OH52 seul. Nous avons appliqué un courant de 500mC dans une boîte ensemencée avec seulement deux puits de NaCl 0,9%. La plage de lyse obtenue

après l'application du Stérident est nulle au niveau du puits centré sur l'anode. Pourtant, au niveau de la cathode, nous notons une plage de lyse circulaire de 2 mm de diamètre. (33)(34)

Dans un second temps, après avoir choisi de comparer l'activité antibactérienne *in vitro* de l'hypochlorite de sodium associée ou non au Sterident OH52, nous avons souhaité déterminer l'activité de l'appareillage dans les conditions d'utilisation recommandées par le fournisseur. Nous évaluerons également l'effet bactéricide d'une variation de la charge lors de l'application du Stérident comme le propose l'industriel.

L'ensemble de ces données numériques sont regroupées dans les figures suivantes. (Figures n°16 à 18) Au préalable, nous avons éliminé tous les échantillons présentant des erreurs techniques (débordements du puits avec une zone de lyse non circulaire). La MIC est calculée selon la formule décrite sur le site www.agardiffusion.com

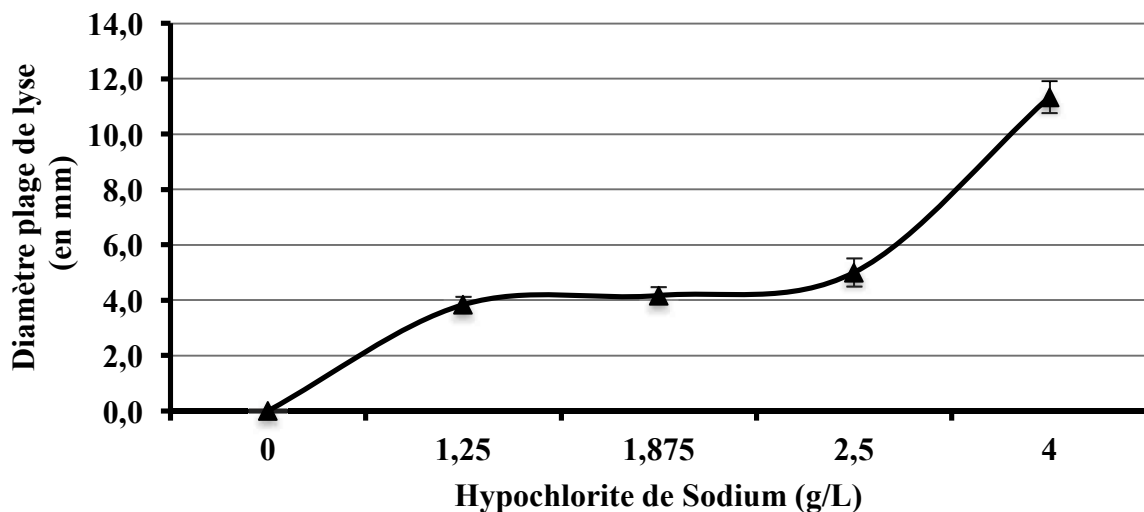


Figure n° 16 : Mesure de la plage de lyse en fonction de différentes concentrations en hypochlorite de sodium sur diffusion en gel d'agarose avec *E. Faecalis in vitro*

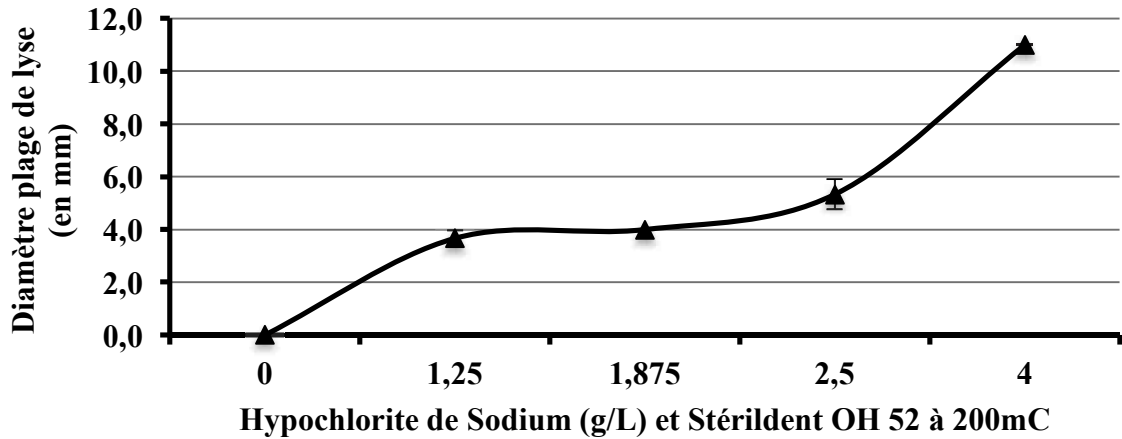


Figure n° 17 : Mesure de la plage de lyse en fonction de différentes concentrations en hypochlorite de sodium et Stérident OH52 à 200mC sur diffusion en gel d'agarose avec *E. Faecalis in vitro*

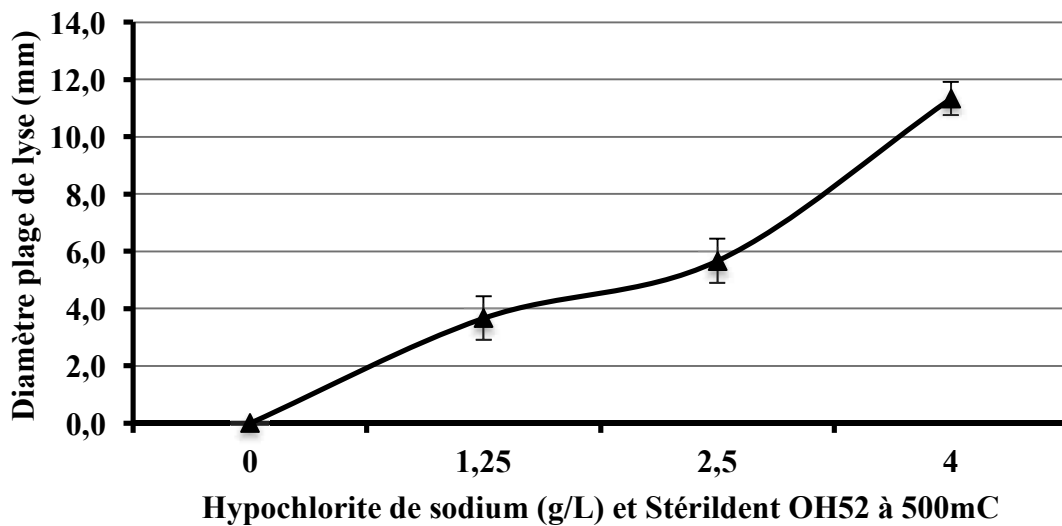


Figure n°18 : Mesure de la plage de lyse en fonction de différentes concentrations en hypochlorite de sodium et Stérident OH52 à 500mC sur diffusion en gel d'agarose avec *E. Faecalis in vitro*

L'analyse du diamètre de la plage de lyse selon la méthode de Bonev en utilisant deux logarithmes différents (l'un tenant compte d'une diffusion passive et l'autre d'une diffusion active) nous fournit une estimation de la MIC. Après le calcul, nous choisissons la MIC à partir du modèle, qui renvoie R2 plus proche de 1.

	d- model	d ² - model	d- model	d ² - model
intercept (ln($\mu\text{g/ml}$)):	NaN	NaN	-0,143	0,461
MIC ($\mu\text{g/ml}$):	NaN	NaN	0,867	1,586
slope:	NaN	NaN	0,393	0,481
R ² :	NaN	NaN	0,906	0,774

Figure n° 19: Tableau récapitulatif du calcul de la MIC pour l'hypochlorite de sodium *in vitro* à partir du site <http://www.agardiffusion.com>

Selon le tableau présenté sur la figure n°19 , la concentration minimale inhibitrice de l'hypochlorite de sodium seul est 0,867 $\mu\text{g/ml}$ soit environ 0,1%.

	d- model	d ² - model	d- model	d ² - model
intercept (ln($\mu\text{g/ml}$)):	NaN	NaN	-0,143	0,461
MIC ($\mu\text{g/ml}$):	NaN	NaN	0,867	1,586
slope:	NaN	NaN	0,393	0,481
R ² :	NaN	NaN	0,906	0,774

Figure n° 20 : Tableau récapitulatif du calcul de la MIC pour l'hypochlorite de sodium associé au Stérident OH52 à 200mC *in vitro* à partir du site <http://www.agardiffusion.com>

Nous avons évalué l'effet antibactérien du Stérident dans les conditions recommandées par le fournisseur, c'est-à-dire en présence d'hypochlorite de sodium. La MIC calculée est de 0,867 $\mu\text{g/ml}$ avec une charge de 200mC soit environ 0,1% Elle est identique à la MIC obtenue pour l'hypochlorite de sodium seul. (Figure n°20)

La MIC obtenue de 0,867% c'est-à-dire 0,1% avec l'hypochlorite de sodium à différentes concentrations correspond aux MIC calculées dans la littérature scientifique telle que MIC de 0,1% dans la revue Estrella at al. (33)

Comme l'appareil Sétrident peut travailler à différentes charges comme le recommande l'industriel afin d'augmenter l'efficacité antibactérienne, la MIC évaluée pour l'application du Stérident à une charge de 500mC est de 0,867 $\mu\text{g/ml}$ soit environ 0,1%. (Figure n°21)

	d- model	d ² - model	d- model	d ² - model
intercept (ln($\mu\text{g/ml}$)):	NaN	NaN	-0.143	0.461
MIC ($\mu\text{g/ml}$):	NaN	NaN	0.867	1.586
slope:	NaN	NaN	0.393	0.481
R ² :	NaN	NaN	0.906	0.774

Figure n° 21 : Tableau récapitulatif du calcul de la MIC pour l'hypochlorite de sodium associé au Stérident OH52 à 500mC *in vitro* à partir du site

<http://www.agardiffusion.com>

Dans les conditions testées, il n'existe pas de différence entre l'association Stérident à intensité variable et l'hypochlorite de sodium.

Nous observons aucune potentialisation du pouvoir antibactérien du NaClO avec le Sterident-OH52 dans les conditions de cette expérience.

Néanmoins, nous notons des éléments spécifiques lors de l'utilisation du Sterident en milieu *in vitro*. Au niveau du réservoir central de la boîte pour la cathode du Sterident, nous observons une plage de lyse importante et un halo rouge centré sur le punch. Le puits contient du NaCl 0,9%. Lorsque l'on applique un courant électrique d'intensité variable, une ionisation se produit. Les anions vont vers la cathode et les cations vers l'anode. Du dichlore (Cl_2) et des ions hypochlorures (ClO^-) sont formés. Ces éléments provoquent une lyse bactérienne au niveau de la cathode. Le halo rouge centré sur la cathode en or est dû à une diffusion de nanoparticule d'or dans la gélose lors de l'électrolyse de cet élément noble. (Figure n°22)

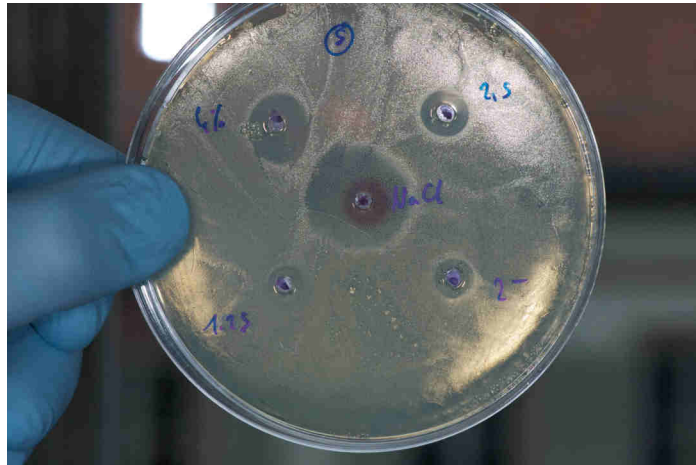


Figure n°22 : Expérience *in vitro* avec le Stérident à T+24 jours

Le diamètre de lyse au niveau de la cathode est important mais il faut noter le caractère répétitif de la manipulation. Lors de l'application du Stérident, l'anode est déplacée de puits en puits alors que la cathode reste en position centrale.

Afin d'éliminer la cause thermique de l'effet antibactérien de l'ionisation produite au niveau de la cathode, nous pouvons nous référer à la première manipulation. Nous comparons l'effet du Sterilident avec soit seulement deux puits de NaCl 0,9% soit deux puits de NaClO où l'on applique d'une part la cathode et d'autre part l'anode avec un courant maximal de 500mC.

Nous observons à T+24H une plage de lyse centrée de diamètre inférieur (5mm) sur le puits correspondant à la cathode sans apparition d'un halo rouge.

Nous en déduisons que le caractère antibactérien n'est pas d'origine thermique mais physico-chimique grâce aux ions hypochloreux. Cependant la formation de nanoparticules d'or est due au l'électrolyse de la cathode suite à des utilisations répétées. Cet élément est important à prendre en compte dans l'établissement du protocole *ex vivo* pour l'évaluation de l'appareillage.

b. Etude Ex vivo de l'efficacité du sterilident OH52

In vitro, nous n'observons aucun effet bactéricide significatif plus important avec le Stérident OH52 sur la souche bactérienne *E. faecalis*, la plus répandue en cas d'infection endodontique persistante.

Or le principe de l'appareil Stérident repose sur l'électrolyse produite au niveau de l'anode avec la production des ions OH^- . Ces derniers ont un rôle antibactérien et

diffusent dans les canalicules dentinaires. Le Stérident doit potentialiser l'action du rinçage final à l'hypochlorite de sodium en libérant les ions OH⁻.

La production ions hydroxyle OH⁻ au niveau de l'anode est locale c'est-à-dire autour de l'électrode. Nous pouvons nous demander *in vitro* si la diffusion des ions OH⁻ ne s'effectue qu'au niveau du puits et pas dans la gélose. Ainsi les ions OH⁻ générés ont potentiellement un effet bactéricide plus important dans un environnement restreint tel que le canal dentaire. D'autre part, un protocole *in vitro* reste un modèle limité car il omet plusieurs critères comme l'anatomie dentaire et dentinaire.

Face à ces résultats, nous décidons de mettre en place un protocole *ex vivo* pour appréhender la complexité anatomique et l'environnement du réseau canalaire. Cette manipulation aura le rôle de juge de paix.

Nous séparons notre population (50 dents infectées par *E. Faecalis*) en trois groupes : le groupe 1 traité par NaCl 0,9% (8 dents), le groupe 2 traité par l'hypochlorite de sodium 2,5% (20 dents), le groupe 3 traité par l'hypochlorite de sodium 2,5% et le Stérident à 500mC pendant 1 minute (21 dents). Une dent a été éliminée du fait de son résultat négatif lors du contrôle du biofilm canalaire avec *E. Faecalis*.

Le but de cette expérimentation est de comparer la création d'un nouveau biofilm ou non à partir des réservoirs bactériens au sein des canalicules dentinaires ayant subis une désinfection finale au NaCl 0,9% ou une désinfection standard (NaClO 2,5%) associée ou non au Stérident pendant un suivi de 2 semaines successives.

Chaque relevé, après désinfection, est réalisé sur des intervalles d'environ 3 jours et de manière visuelle. Lorsque le milieu est trouble par rapport au tube témoin, l'échantillon est considéré comme positif c'est-à-dire infecté.

Au départ, tous les groupes ont montré un niveau similaire d'infection à *E. faecalis*, grâce à un prélèvement à l'aide d'une pointe de papier dans chaque canal qui a été cultivé en milieu BHI pendant 3 jours. 98% des prélèvements se sont révélés positifs. Une dent a été exemptée de la manipulation après ce contrôle. Le but de ce contrôle était d'éviter d'avoir des faux négatifs liés à une erreur de manipulation.

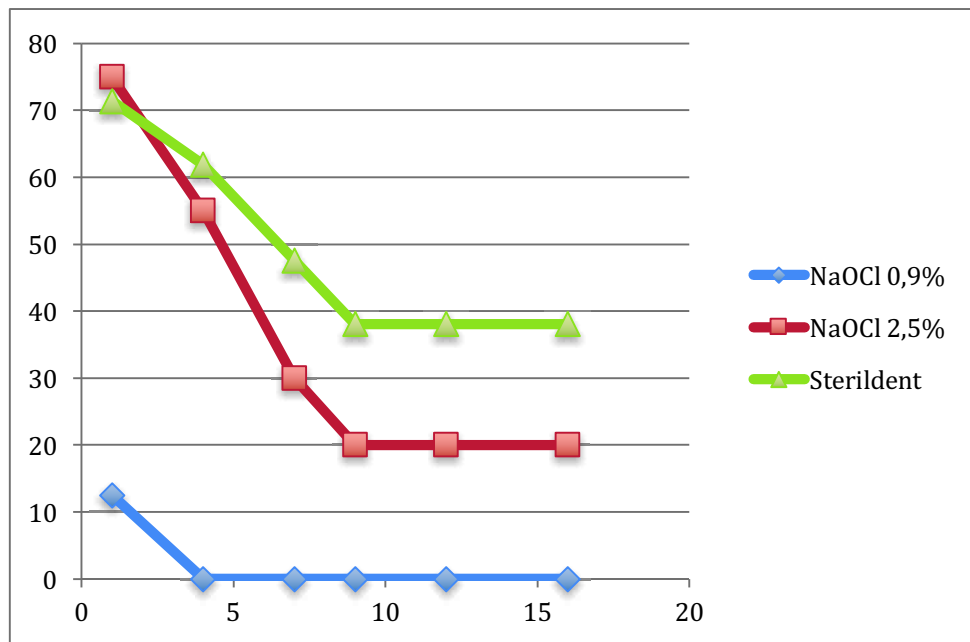


Figure n° 23 : Pourcentage d'échantillons présentant une dent non infectée par *E. Faecalis* (en pourcentage) après le protocole de désinfection finale choisi sur une durée donnée (en jours)

D'après les résultats (Figure n°23), nous observons que dans le groupe control (groupe 1), l'ensemble des dents montre une persistance de l'infection à *E. Faecalis*. Le NaCl 0,9% n'a aucun pouvoir bactéricide et n'a empêché en rien une recolonisation rapide du milieu en moins de 3 jours. Dans le groupe 2, 55 % des dents n'ont pas été recolonisées à T+3 jours puis nous observons une décroissance progressive de dents non infectées qui se stabilise à 20% à partir de T+7 jours jusqu'à T+14 jours. Dans le groupe 3, 60 % des dents ne sont pas infectées à T+3 jours ensuite nous observons de la même manière que le groupe 2 une décroissance mais moins importante à T+7 jours avec une stabilisation à 38% jusqu'à T+14 jours.

Le groupe 2 et le groupe 3 sont quasiment semblables à T+3 jours. Cependant, nous observons une différence du taux de survie de dents non infectées de 18% en moins à la fin de la première semaine.

Afin de relever visuellement et de manière plus précise, nous avons renouveler le milieu à T+7 jours.

Cependant, la présence de concentrations bactériennes inférieures à la limite de détection de la méthode de culture peuvent conduire à des faux négatifs

Le succès du traitement endodontique dépend en grande partie du contrôle des micro-organismes présents dans les canaux radiculaires infectés.

Le but de cette étude est d'évaluer l'efficacité de plusieurs types de protocoles de désinfection canalaire dans le traitement des canaux radiculaires nécrotiques et infectés. Du point de vue clinique, cette situation exige l'utilisation d'agents avec une activité antimicrobienne. Compte tenu de son efficacité démontrée contre le biofilm d'*E. faecalis*, nous avons utilisé l'hypochlorite de sodium 2,5%, seul ou combiné avec le Stérident. *E. Faecalis* sont des anaérobies facultatives bactéries gram positives souvent sélectionnées pour des études expérimentales car ces bactéries sont souvent isolées et fréquentes en cas d'échec endodontique ; elles peuvent pénétrer profondément dans tubuli dentinaires, ce qui rend leur élimination complète difficile. En outre, *E. Faecalis* peuvent s'organiser en biofilm, même dans des situations où les nutriments sont rares, ce qui augmente leurs résistances dans les parois du canal radiculaire.

Dans le groupe 2 et 3, il a été possible d'obtenir une absence de recolonisation bactérienne à l'exception du groupe contrôle. La repousse postérieure dans ces deux groupes indique que l'éradication d'*E. Faecalis* n'a pas été complète. Pour cette raison, le suivi à long terme est essentiel. L'analyse du taux de survie tient compte de toute la période (16 jours) et pas seulement un ou plusieurs points dans le temps.

De plus, d'après le graphique, nous notons que l'ajout du Stérident pour la désinfection canalaire augmente l'effet antibactérien de l'hypochlorite de sodium contre *E. faecalis* dans les tubules dentinaires. Ainsi, combinés ensemble, ils sont une alternative à l'utilisation de NaOCl seul comme solution d'irrigation finale

Les résultats de la présente étude confirmeraient la plus grande activité bactéricide de l'association de l'hypochlorite de sodium et du Stérident, par opposition à une solution de NaOCl 2,5% comme seul irrigant lors du rinçage canalaire final. Dans l'ensemble, nous montrons que le Stérident renforce l'activité bactéricide de l'hypochlorite de sodium en créant des ions hydroxydes. Ainsi, l'hypochlorite de

sodium et le Stérident à 15 jours a montré un nombre inférieur d'échantillons repousses (12 sur 21) par rapport à l'hypochlorite seul (16 sur 20), ce qui confirme les résultats précédents.

L'efficacité du Stérident est 50% supérieure à celle du traitement de référence.

Ainsi, des études cliniques qui impliquent des configurations anatomiques complexes sont nécessaires pour confirmer l'efficacité du Stérident OH52.

CONCLUSION

Les techniques actuelles de traitement endodontique sont dites chimio-mécaniques. Elles associent un traitement mécanique d'alésage du canal principal à l'action d'une solution désinfectante pour la désinfection du système endocanalaire.

L'hypochlorite de sodium est l'irrigant de choix en endodontie. Le mécanisme d'action de l'hypochlorite de sodium dépend de ses caractéristiques physico-chimiques. Les réactions de saponification, la neutralisation des acides aminés sont à l'origine d'un processus de dissolution des tissus. L'activité antimicrobienne est liée à l'inactivation irréversible par des ions hydroxydes d'enzymes indispensables au métabolisme bactérien. L'action de dissolution organique est due à la réaction de saponification qui dégrade les lipides et les acides gras.

Néanmoins, malgré les protocoles stricts d'irrigation alliant l'effet antibactérien de l'hypochlorite à l'effet mécanique de l'EDTA, nous sommes encore en face d'un fort taux d'échec (4% environ) dans les cas d'infection endocanalaire, avec des récurrences à court, moyen et long terme qui remettent en cause le pronostic de la dent sur l'arcade.

Le problème de ces méthodes de traitement est leur inadéquation partielle avec la physiopathologie. En effet, le système endocanalaire est complexe avec des canaux accessoires multiples qu'il est difficile d'atteindre avec notre instrumentation. De plus, la dentine formant la racine est un tissu présentant de nombreux canalicules dont le diamètre permet la prolifération bactérienne *in situ* et de ce fait peut représenter un réservoir latent de bactéries pathogènes. Il est prouvé que des molécules comme la chlorhexidine ou certains anesthésiques locaux peuvent diffuser au travers de ces canalicules. Nos produits de désinfection pourraient donc également diffuser dans ces canalicules. Pourtant l'hypochlorite de sodium au contact des tissus organiques s'inactive rapidement du fait de son action oxydante sur les acides gras et sur les protéines. Nous pouvons donc imaginer que nos méthodes actuelles peuvent atteindre certaines limites d'efficacité, notamment liées au relatif faible temps de contact avec les bactéries présentes dans le système endo-canalaire.

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur l'application de techniques complémentaires à l'irrigation canalaire et plus particulièrement à un système basé sur l'hydrolyse *in situ* : le Stérident OH52. Cet appareil pourrait générer localement, par électrolyse, des ions hydroxydes (OH⁻) et du dichlore // ions hypochloreux dans l'ensemble du système endo-canaire et avoir de ce fait une action antibactérienne locale. Cependant, il faut noter que l'action des systèmes d'électrolyse est dépendante des électrodes employées. En effet, certaines électrodes se corrodent au moment de leur utilisation et génèrent la libération d'ions métalliques.

Par des techniques de diffusion en gel d'agarose, nous n'avons pas observé d'effet significatif de l'association hypochlorite de sodium et Stérident OH52 par rapport à l'hypochlorite de sodium seul sur la souche bactérienne *E. faecalis*. La production d'ions hydroxyle OH⁻ s'effectue au niveau de l'anode et ne diffuse pas au-delà du puits.

A l'aide d'un protocole *ex vivo*, nous avons pu tester l'effet antibactérien dans un environnement restreint tel que le canal dentaire. Nous avons mesuré la diminution de la charge bactérienne, sur dents extraites infectées par *E. Faecalis*, après deux protocoles de désinfection finale (NaClO 2,5% avec ou sans Stérident OH52). Avec le Stérident OH52, nous avons désinfecté 50% de dents en plus par rapport à une désinfection canalaire à l'hypochlorite de sodium seul. Cette désinfection canalaire correspond à une absence de recontamination du milieu après 16 jours de culture *in vitro*. Les colonies d'*E. Faecalis* ont été détruites grâce à l'action des ions hydroxyles. Les échecs observés lors de la désinfection sont probablement dus aux colonies résiduelles situées au niveau des réservoirs canaux tels que les tubuli dentinaires et les canaux accessoires.

Dans les conditions de cette étude *ex vivo* et compte tenu de l'importance cruciale de l'activité antimicrobienne résiduelle effective dans les canaux radiculaires infectés, l'utilisation de l'hypochlorite de sodium associé au Stérident s'avère plus efficace dans le cadre désinfection finale *in vitro* par rapport à la technique de référence.

L'ensemble des tests présentés précédemment ont pour objectif de mettre en avant l'efficacité du Stérident OH52. Cependant, il serait également intéressant de

pouvoir objectiver l'efficacité de cette méthode de traitement plus précisément, notamment au niveau des tubuli dentinaires. Nous proposons ainsi de mesurer l'activité antibactérienne *in situ*, en étudiant l'effet de ce traitement par courant électrique continu sur la dentine et plus précisément sur la dentine infectée par des bactéries.

Si l'efficacité de cet appareil est confirmée par de futures études notamment des études cliniques à moyen et long terme, il faudra également mettre en évidence l'innocuité de cet appareil sur les tissus environnants en particulier ceux du periapex.