

UNIVERSITE DE NANTES  
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

-----

Année 2013

Thèse n° 052

**PROCOLE D'ETUDE *IN VITRO*  
DE LA PIGMENTATION DENTAIRE PAR LA  
CHLORHEXIDINE**

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**GINEAU Tony**

Né le 30 / 04 / 1987

Le                      devant le jury ci-dessous :

Président : M. le professeur Assem SOUEIDAN  
Assesseur : M. le professeur Jean-Michel BOULER  
Co-Directeur : M. le Docteur Céline BORIES

Directeur de thèse : M. le Docteur Xavier STRUILLOU

<b>UNIVERSITÉ DE NANTES</b>	
<b>Président</b>	Pr. Olivier LABOUX
<b>FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE</b>	
<b>Doyen</b>	Pr. Yves AMOURIQ
<b>Assesseurs</b>	Dr. Stéphane RENAUDIN Pr. Assem SOUEIDAN Pr. Pierre WEISS
<b>Professeurs des Universités Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.</b>	
Monsieur Yves AMOURIQ Madame ALLIOT-LICHT Brigitte Monsieur GIUMELLI Bernard	Monsieur Philippe LESCLOUS Madame PEREZ Fabienne Monsieur SOUEIDAN Assem Monsieur WEISS Pierre
<b>Professeurs des Universités</b>	
Monsieur BOHNE Wolf (Professeur Emérite) Monsieur JEAN Alain (Professeur Emérite)	Monsieur BOULER Jean-Michel
<b>Praticiens Hospitaliers</b>	
Madame Cécile DUPAS	Madame Emmanuelle LEROUXEL
<b>Maitres de Conférences Praticiens hospitaliers des C.S.E.R.D.</b>	<b>Assistants hospitaliers universitaires des C.S.E.R.D.</b>
Monsieur AMADOR DEL VALLE Gilles Madame ARMENGOL Valérie Monsieur BADRAN Zahi Monsieur BODIC François Madame DAJEAN-TRUTAUD Sylvie Monsieur DENIAUD Joël Madame ENKEL Bénédicte Monsieur GAUDIN Alexis Monsieur HOORNAERT Alain Madame HOUCHMAND-CUNY Madline Madame JORDANA Fabienne Monsieur KIMAKHE Saïd Monsieur LAGARDE André Monsieur LE BARS Pierre Monsieur LE GUEHENNEC Laurent Madame LOPEZ-CAZAUX Sérénia Monsieur MARION Dominique Monsieur NIVET Marc-Henri Monsieur RENAUDIN Stéphane Madame ROY Elisabeth Monsieur STRUILLOU Xavier Monsieur UNGER François Monsieur VERNER Christian	Madame BOEDEC Anne Madame BORIES Céline Monsieur CLÉE Thibaud Madame DAZEL LABOUR Sophie Monsieur DEUMIER Laurent Monsieur FREUCHET Erwan (jusqu'au 03/01/14) Monsieur FRUCHET Aurélien (jusqu'au 15/10/13) Monsieur LANOISELEE Edouard Madame MALTHIERY Eve Monsieur MARGOTTIN Christophe (jusqu'au 03/11/13) Madame MELIN Fanny Madame MERAMETDJIAN Laure Madame ODIER Amélie (jusqu'au 11/11/13) Monsieur PAISANT Guillaume (jusqu'au 30/09/13) Monsieur PILON Nicolas Madame RICHARD Catherine Monsieur ROLOT Morgan Monsieur TOURE Amadou (Assistant associé jusqu'au 16/10/13)

Par délibération, en date du 6 décembre 1972, le Conseil de 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'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

# REMERCIEMENTS

*A Monsieur le Professeur Assem SOUEIDAN,*

Professeur des Universités

*Praticien hospitalier des centres de soins d'enseignement et de recherche dentaires*

-NANTES-

*Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse,  
Pour votre disponibilité en tant que président de jury,  
Pour vos conseils et votre partage d'expérience dans le monde de la recherche,  
Pour votre extrême gentillesse,  
Veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.*

*A Monsieur le Professeur Jean-Michel BOULER,*

Professeur des Universités

-NANTES-

*Pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de superviser ce travail,  
Pour vos conseils et votre partage d'expérience dans le monde de la recherche,  
Pour votre soutien et votre investissement durant toute la durée du protocole,  
Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de toute ma reconnaissance.*

*A Monsieur le Docteur Xavier STRUILLLOU,*

Maître de Conférences des Universités  
Praticien hospitalier des centres de soins d'enseignement et de recherche dentaires

-NANTES-

*Pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger ce travail,  
Pour votre professionnalisme et votre enseignement,  
Pour vos précieux conseils,  
Veuillez trouver dans ce travail ma sincère sympathie, ma reconnaissance ainsi que ma  
profonde estime.*

*A Mademoiselle la Docteur Céline BORIES,*

Assistant Hospitalo-Universitaire des Centres de soins d'enseignement et de recherche  
dentaires  
Ancien-interne des hôpitaux de Nantes

-NANTES-

*Pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger ce travail,  
Pour la rapidité de vos corrections,  
Pour la pertinence de vos réponses,  
Pour votre rigueur qui m'a finalement imprégné,  
Pour votre investissement personnel dans ce travail,  
Veuillez trouver ici mon profond respect ainsi que mes sincères remerciements.*

Je remercie toute l'équipe enseignante pour la qualité de leur enseignement ainsi que leurs précieux conseils.

Je remercie également ma famille et tout particulièrement mes parents et ma sœur pour leur soutien, leur accompagnement tout au long de mon cursus.

Je remercie mes ami(e)s de promotion car sans eux les années étudiantes n'auraient pas eu autant de sens.

Je remercie mes amis de toujours ...

Je remercie enfin ma chère et tendre ...

# TABLE DES MATIERES

Introduction .....	3
--------------------	---

## Chapitre 1 : La Chlorhexidine

1 . 1 Historique.....	4
1 . 2 Structure chimique.....	4
1 . 3 Propriétés physico-chimiques.....	4
1 . 4 Mécanismes d'action et pharmacodynamie.....	4
1 . 5 Effets attendus de la chlorhexidine.....	5
1 . 5 . 1 Effets antiplaque.....	5
1 . 5 . 2 Effets antibactériens.....	5
1 . 5 . 2 . 1 A basse concentration.....	6
1 . 5 . 2 . 2 A haute concentration.....	6
1 . 5 . 3 Effets cariostatiques.....	6
1 . 5 . 4 Effets antifongiques.....	6
1 . 6 Facteurs d'interaction.....	7
1 . 6 . 1 Principal : pH.....	7
1 . 6 . 2 Secondaires.....	7
1 . 6 . 2 . 1 Fluorure de sodium.....	7
1 . 6 . 2 . 2 Laurylsulfate de sodium.....	7
1 . 6 . 2 . 3 Calcium.....	8
1 . 6 . 2 . 4 Composition salivaire.....	8
1 . 7 Effets indésirables de la chlorhexidine.....	8
1 . 7 . 1 Sensation de sécheresse buccale.....	8
1 . 7 . 2 Gonflement des parotides.....	8
1 . 7 . 3 Altération du goût.....	8
1 . 7 . 4 Formation augmentée du tartre.....	9
1 . 7 . 5 Desquamation superficielle de la muqueuse buccale.....	9
1 . 7 . 6 Infections virales.....	10
1 . 7 . 7 Colorations.....	10

## Chapitre 2 : Analyse des études in vivo et in vitro sur les colorations liées à l'utilisation de bains de bouche à base de chlorhexidine

2 . 1 Étiologies des colorations des dents et des muqueuses.....	11
2 . 1 . 1 Réactions de MAILLARD : non enzymatique.....	11
2 . 1 . 2 Réactions avec les pigments métalliques.....	12
2 . 1 . 3 Réactions des produits de l'alimentation et des constituants des boissons avec les composés inhibiteurs de plaque .....	13
2 . 2 Mécanismes d'interaction de la chlorhexidine avec son environnement de l'organe dentaire.....	13

2 . 2 . 1	Liaison de la chlorhexidine aux macromolécules.....	13
2 . 2 . 2	Liaison de la chlorhexidine avec les protéines en.....	13
2 . 2 . 3	Effet de la précipitation de la chlorhexidine en fonction de sa concentration	14
2 . 3	Excipients réduisant les effets secondaires de la chlorhexidine.....	15
2 . 3 . 1	Antiadhésif 239/144.....	15
2 . 3 . 2	Peroxyborate / Peroxycarbonate.....	15
2 . 3 . 3	Polyvinylpyrrolidone (PVP).....	16
2 . 3 . 4	ADS = Métabisulphite de sodium et acide ascorbique.....	17
2 . 4	Méthode de recherche bibliographique.....	18
2 . 5	Comparaison des études <i>in vivo</i> traitant des colorations liées à la chlorhexidine.....	19
2 . 6	Comparaison des études <i>in vitro</i> traitant des colorations liées à la chlorhexidine.....	21

### **Chapitre 3 : Protocole d'étude *in vitro* sur l'étude des colorations dentaires liées à l'usage de bains de bouche à base de chlorhexidine**

3 . 1	Introduction.....	25
3 . 2	Matériels et méthodes.....	25
3 . 2 . 1	Substrats testés.....	26
3 . 2 . 2	Premier protocole test.....	28
3 . 2 . 2 . 1	Acquisition de l'image.....	29
3 . 2 . 3	Deuxième protocole test.....	31
3 . 2 . 4	Protocole définitif.....	34
3 . 3	Résultats.....	36
3 . 4	Discussion.....	36
	Conclusion.....	39
	Références Bibliographiques .....	40
	Table des illustrations et tableaux .....	47

# INTRODUCTION

L'étiologie bactérienne des maladies parodontales est admise depuis 50 ans. Les travaux de LÖE et coll en 1965 ont entre autre permis de donner un caractère infectieux à cette maladie. L'évolution des techniques a permis de distinguer deux approches bien distinctes et complémentaires dans la prise en charge de ces maladies parodontales : une approche mécanique et une approche chimique. Dans l'approche chimique, deux familles de constituants peuvent être utilisées : les antibiotiques et les antiseptiques. Dans le cadre de cette étude *in vitro*, nous nous intéressons au « gold standard » des antiseptiques utilisés en odontologie : la chlorhexidine. De nombreuses études ont montré l'efficacité de la chlorhexidine pour inhiber la formation de plaque et combattre l'inflammation. Sa structure de bisdiguamide symétrique lui procure ses propriétés antibactériennes. Cependant, celle-ci a tendance à engendrer des colorations à la fois dentaires et des muqueuses à moyen et long terme. Le but de ce travail est d'effectuer une modélisation *in vitro* des colorations liées à la chlorhexidine.

Nous décrirons dans une première partie les propriétés chimiques et antiseptiques de la chlorhexidine pour combattre les complications d'origine bactériennes. Dans un second temps, un chapitre sera développé sur le principal effet secondaire: les colorations dentaires. Enfin, une étude *in vitro* portant sur l'élaboration d'un modèle de comparaison de différents bains de bouche à base de chlorhexidine sera traitée dans un troisième chapitre.

# CHAPITRE 1 : LA CHLORHEXIDINE

## 1.1 – Historique

La chlorhexidine a été développée dans les années quarante par l'Imperial Chemical Industries, en Angleterre, et commercialisée en 1954 comme un antiseptique de la peau (Mathur et Setur, 2011). Plus tard, l'antiseptique fut utilisé dans divers domaines comme la chirurgie, l'obstétrique, l'urologie, la gynécologie. L'utilisation en dentisterie a été introduite comme pré-désinfection avant chirurgie ou traitement endodontique (Gomes et Viama, 2013).

## 1.2 – Structure chimique

La chlorhexidine est une molécule de synthèse. Elle a une structure de bisdiguamide. En effet la guanine par oxydation donne la guanidine. La condensation de 2 guanidines donne un biguanide. Ces 2 molécules sont reliées par un pont hexaméthylène avec 2 cycles 4-chlorophényle terminaux.

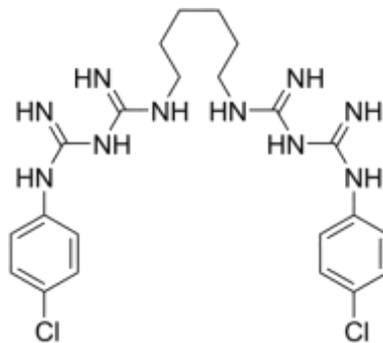


Figure 1 . Molécule de chlorhexidine

La symétrie de cette molécule de chlorhexidine lui confère des propriétés anti-bactériennes.

## 1.3 – Propriétés physico-chimiques

La chlorhexidine est une base avec de fortes charges bicationiques ce qui lui confèrent une haute interactivité avec les anions (Bascones et al. 2005) Cette molécule est plus stable sous forme de sel. La base libre, le diacétate et le dichlorhydrate sont peu solubles dans l'eau tandis que le digluconate est très soluble (D. M. Foulkes 1973).

## 1.4 – Mécanisme d'action et pharmacodynamie

La molécule de chlorhexidine, chargée positivement, se lie par une forte liaison aux membranes bactériennes chargées négativement. Celle-ci est également captée par les mucines qui sont des protéines salivaires (ROLLA et al. 1970). L'hydroxyapatite seule est incapable de capter et de retenir la chlorhexidine après un bain de bouche. Cependant,

l'hydroxyapatite de l'émail est toujours recouverte par un film protecteur de glycoprotéines salivaires. On peut donc considérer que les mucines présentes à la surface dentaire jouent un rôle significatif dans la rétention de la chlorhexidine. Une étude de L.G. HJELJORD et G. ROLLA (1973) a montré que l'absorption de la chlorhexidine était largement supérieure pour des protéines à haut poids moléculaire supérieur à 50 000. En revanche, cette captation est quasiment nulle pour des poids moléculaires inférieurs à 20 000. Ces auteurs émirent l'hypothèse que la chlorhexidine était retenue aux surfaces des tissus buccaux par des liaisons électrostatiques. Les molécules de chlorhexidine liées seraient ensuite remplacées progressivement par compétition par des ions calcium présents dans la salive. Sa capacité de se lier autant avec les protéines restant en solution qu'avec celle qui précipitent est une des raisons qui expliquerait sa rémanence malgré les flux salivaires.

Ainsi, il faut noter que la plaque est inhibée jusqu'à 24h après exposition à la chlorhexidine (ROLLA et al. 1971). JENSEN et CHRISTENSEN (1971) ont détecté une concentration antibactérienne suffisante jusqu'à 5h après introduction en bouche. BONESVOLL, LOKKEN et ROLLA (1974) ont constaté une rétention de la chlorhexidine de 30% immédiatement après un rinçage par un bain de bouche. La nature cationique de la chlorhexidine permet à celle-ci de se combiner aux composés anioniques tels que les groupes carboxyles, phosphates présents dans l'alimentation ou bien les protéines salivaires.

## **1 . 5 – Effets attendus de la chlorhexidine**

### **1 . 5 . 1 – Effets antiplaque**

Toutes les études traitant de l'effet antiplaque de la chlorhexidine sont formelles: la chlorhexidine a bien un effet antiplaque. MENDIETA et VALLCORBA (1994) ont montré une action anti-gingivite après 2 rinçages par jour pendant 7 jours avec 2 solutions différentes à des concentrations de 0.12% et 0.2%. En effet, les effets sur l'inhibition de la plaque étaient significativement augmentés par rapport au groupe contrôle. Les PI (indice de plaque) ont été comparés par deux techniques d'analyse (PI décrit par Quiqley et Hein en 1962, et Silness et Loë en 1964).

Une autre étude de K. LORENZ et G. BRUHN (2006) a montré une diminution significative de l'indice de plaque après rinçage 2 fois par jour d'une solution à base de chlorhexidine versus groupe contrôle pendant 3 semaines. Cette étude est arrivée aux mêmes résultats.

Il semblerait que cet effet soit lié à la chlorhexidine qui empêcherait les liaisons cellules-cellules et cellules-surfaces par compétition chlorhexidine-calcium car celui-ci serait impliqué dans les phénomènes de liaison. De ce fait, l'adhésion bactérienne ne peut avoir lieu ce qui empêche leur agglutination (ROLLA et MELSON 1975a) .

### **1 . 5 . 2 – Effets antibactériens**

La chlorhexidine a des effets sur les bactéries GRAM positifs et les GRAM négatifs, incluant les aérobies et les anaérobies. Cependant, il existe de petites variations de sensibilités entre les différentes familles de bactéries avec une sensibilité augmentée pour les bactéries

GRAM+ en comparaison des GRAM- (HENNESEY, 1973). Aucune résistance significative n'a été décrite même sur des utilisations de longue durée (SCHIOTT CS. 1976).

#### **1 . 5 . 2 . 1 – A basse concentration**

A basse concentration, il y a augmentation de la perméabilité membranaire par modification de la concentration de potassium intracellulaire (CIANCO SG. 1994). La chlorhexidine se fixerait sur les lipopolysaccharides présents sur la surface de la membrane, et modifiant ainsi les échanges transmembranaires (HUGO & LONGWORTH, 1966).

#### **1 . 5 . 2 . 2 – A haute concentration**

A haute concentration, la chlorhexidine produit un effet bactéricide par précipitation du cytoplasme bactérien après introduction dans les bactéries de la molécule par voie transmembranaire (CIANCO SG . 1994).

Son action antibactérienne complète ainsi son action antiplaque traité plus haut. De plus, cette action antiseptique diminue les risques d'inflammation après un geste chirurgical par exemple en augmentant ainsi les chances d'une bonne cicatrisation.

#### **1 . 5 . 3 – Effets cariostatiques**

Son action antibactérienne diminue les risques d'atteinte carieuse car celle-ci est d'origine bactérienne. Des études visant à calculer l'acidité ont été réalisées. Ainsi, OPPERMAN (1979) a mesuré le PH de la plaque après avoir appliqué une solution à base de sucrose pour constater la diminution du pH. Ensuite, des bains de bouche à base de chlorhexidine de concentration 0.05% ont été réalisés. L'augmentation du PH est constatée jusqu'à 4h. On peut aisément en déduire que si la concentration était augmentée pour atteindre la concentration en chlorhexidine des bains de bouche du marché, l'effet pourrait être prolongé augmentant ainsi les effets cariostatiques de la chlorhexidine.

#### **1 . 5 . 4 – Effet antifongique sur Candida Albicans**

Candida Albicans est un champignon de type levure de la famille Albicans. Sa prolifération est rendue possible par altération du terrain biologique. Habituellement, elle est sous forme de champignon (état saprophyte). Elle est donc inoffensive. Mais sous certaines conditions, elle se transforme en parasite avec l'apparition de filaments et devient pathogène.

Des études ont été menées sur l'adhésion de Candida Albicans au contact des résines acryliques sous l'effet de la chlorhexidine (Kassab et al). Celle-ci montre un effet anti-adhérent de la chlorhexidine sur Candida Albicans car l'antiseptique agit sur les mécanismes de production des phospholipases à l'origine de son maintien sous sa forme levure. La chlorhexidine diminue ainsi la forme hyphale (filamenteuse) de la levure et diminue son pouvoir pathogène.

De plus ADDY et WRIGHT 1978 ont confirmé *in vivo* les effets antifongiques de la chlorhexidine par son application dans les cas de stomatites prothétiques chez l'homme.

## **1 . 6 . Facteurs d'interaction**

### **1 . 6 . 1 – Principal : PH**

Une étude menée par ADDY et ROBERTS en 1981 a montré l'influence du pH sur le potentiel antiseptique de la chlorhexidine. Celle-ci portait sur la fixation de différents antiseptiques dont le digluconate de chlorhexidine au contact de pastilles de résines polyméthylacrylates. Le potentiel d'adhésion de l'antiseptique montrait une faible désorption de celui-ci après rinçage à l'eau distillée des surfaces liées. Cependant, cette désorption est augmentée avec la diminution du pH environnant par perte des charges négatives de la surface des résines acryliques. Ce phénomène chimique de surface voudrait réduire considérablement les liaisons de surface avec les charges positives de l'antiseptique. Cette altération de surface pourrait expliquer la pH dépendance de l'absorption de la chlorhexidine et expliquer également la réduction de l'effet antibactérien de ces bains de bouche. Selon cette étude, en dessous d'un pH de 3, l'augmentation de la nature cationique des molécules environnantes est telle que la chlorhexidine ne peut plus se fixer sur les surfaces dentaires et est éliminé par le flux salivaire.

### **1 . 6 . 2 – Secondaires**

#### **1 . 6 . 2 . 1 – Fluorure de Sodium**

C'est un composé chimique utilisé dans la fabrication des dentifrices comme source d'ions fluorures. Celui-ci est connu pour ses effets anti-caries. Diverses études ont été publiées afin de connaître l'influence du fluorure de sodium sur les propriétés de la chlorhexidine.

LORENZ et BRUHN en 2006 ont trouvé des résultats similaires sur la plaque dentaire après rinçage à la chlorhexidine, suivi avec ou sans brossage avec un dentifrice à base de fluorure de sodium. Les résultats sont similaires pour les études de Dolles et Gjerme en 1980.

MENDIETA et VALLCORBA en 1994 ont comparé deux bains de bouche à base de chlorhexidine avec et sans fluorure de sodium. Celui-ci semblerait diminuer l'efficacité de la chlorhexidine par incorporation du fluor sur la surface dentaire et empêchant ainsi l'antiseptique de se fixer.

La contradiction des études ne permet pas de conclure à une hypothétique diminution des propriétés antiseptiques de la chlorhexidine.

#### **1 . 6 . 2 . 2 – Laurylsulfate de sodium**

C'est un composé utilisé dans la fabrication des dentifrices pour ses propriétés amphiphiles, donnant ainsi une capacité à créer de la mousse. Les adjuvants, composés anioniques, diminuent les effets cationiques de la chlorhexidine et diminuent les propriétés antiseptiques de la chlorhexidine. Les études de SHEEN et OWENS en 2001 ont montré une diminution des colorations induites par la chlorhexidine avec l'utilisation d'un dentifrice à base de lauryl sulfate de sodium. Cependant, cela peut résulter d'une inactivation de l'antiseptique par les charges anioniques contenues dans la plupart des dentifrices. Il est

donc préférable d'effectuer les brossages à distance des rinçages avec les bains de bouche (SHEEN et OWENS, 2001).

### **1 . 6 . 2 . 3 – Calcium**

HAUGEN en 1974 a montré que le calcium a de trop fortes concentrations pouvait inhiber le pouvoir antiseptique de la chlorhexidine.

### **1 . 6 . 2 . 4 – Composition salivaire**

La pellicule salivaire est un facteur clé sur les colorations dentaires car sa composition peut varier en fonction des individus. En effet, des variations chimiques et physiques de la pellicule permettent plus ou moins de fixer la chlorhexidine et les agents chromogènes. Ces effets influencent la structuration de la pellicule par précipitation des glycoprotéines salivaires avec les molécules de chlorhexidine (SHEEN et al, 2001). L'observation des colorations formées sur les surfaces suggèrent un dépôt initial de molécules chromogènes qui se secondent par la prolifération d'îlots aux mêmes endroits. Cette étude a démontré des différences de coloration entre les différents types de salive, mais la cause n'a pas été identifiée.

La concentration des constituants organiques (protéines, glycoprotéines) dépendent du flux salivaire. En effet, des variations de flux entre individus ont été identifiées. La sécrétion salivaire chez la femme est significativement inférieure par rapport à celle de l'homme (HEINTZE et al, 1983). Nous savons également que les colorations augmentent lorsque le flux salivaire est inexistant. Cet ensemble pourrait bien expliquer également les différences de coloration entre individus (SHEEN et al, 2002).

## **1 . 7 – Effets indésirables de la chlorhexidine**

### **1 . 7 . 1 – Sensation de sécheresse buccale**

La chlorhexidine entraîne des perceptions de sécheresse buccale très aléatoires entre les patients. Ces sensations sont accentuées avec les rinçages aux bains de bouche à base de chlorhexidine diluée à la concentration de 0.2% comparés aux dilutions à 0.12% (HEPSO et al. 1988).

### **1 . 7 . 2 – Gonflement des parotides**

Des augmentations de volume des parotides peuvent être observées. Celles-ci peuvent être uni ou bilatérales. Cet effet secondaire est extrêmement rare et reste sans explication (LINDHE. 2010).

### **1 . 7 . 3 – Altération du goût**

L'usage de la chlorhexidine provoque des modifications de perception de goût. En effet, plusieurs auteurs se sont penchés sur cet effet secondaire. Les études de LANG et al. 1988 ont montré que des sujets utilisant des bains de bouche à base de chlorhexidine à 0.2%, 2 fois par jour constataient un changement de leur perception du goût salé (vérifié par une

solution de chlorure de sodium) alors que les autres goûts sucré amer acide n'étaient pas touchés. Cette dysgueusie était rapidement ressentie dès le début du traitement, persistait pendant toute la période puis disparaissait à l'arrêt du traitement. Cette modification de perception du goût salé peut être expliquée par la nature cationique de la chlorhexidine. En effet, elle peut se lier aux molécules anioniques telles que les groupements sulfates, phosphates ou carboxyles. Les liaisons pourraient alors s'établir avec les bourgeons du goût et empêcher la fixation du sodium créant ainsi ce goût salé (LANG et al. 1988). De plus, la dénaturation des protéines de surface des bourgeons du goût est à envisager (GJERMO et al. 1973).

#### **1 . 7 . 4 – Formation augmentée du tartre**

Cette augmentation a été observée par les études de Flemming et al, 1990. En effet, après utilisation pendant 6 mois d'un bain de bouche à base de chlorhexidine de concentration 0,06%, l'indice de tartre était augmenté de 273,2% chez ces patients par rapport à ceux qui avaient une hygiène mécanique classique sans bain de bouche. Cet indice était de 276.4% avec l'usage de chlorhexidine en irrigation sous-gingivale pulsée. La formation du tartre est donc indépendante du mode d'administration et intervient également pour de faibles concentrations. Cette formation est due à la précipitation de protéines salivaires sur les surfaces dentaires avec augmentation de l'épaisseur de la pellicule. Sur celle-ci viennent précipiter des sels inorganiques venant de l'alimentation (Lindhe. 2010).

#### **1 . 7 . 5 – Desquamation superficielle de la muqueuse buccale**

En 1982, 3 cas de desquamation des muqueuses buccales liée à la chlorhexidine 0.2% ont été observés par Skoglund et Holst. Cependant, ces lésions disparaissaient peu de temps après l'arrêt du traitement ou bien simplement en utilisant des concentrations de 0,1%. Ceci montre bien la réversibilité des lésions.

Si nous tenons compte des propriétés intrinsèques de la chlorhexidine, plusieurs explications sont proposées. Tout d'abord, la chlorhexidine peut précipiter avec les protéines salivaires type mucine, faisant perdre ainsi les propriétés mécaniques et lubrifiantes de la salive, entraînant des irritations liées aux frottements des muscles en mouvement contre les muqueuses. Ensuite, la salive a un rôle protecteur sur les muqueuses. Par les mêmes mécanismes que précédemment, la salive précipite et perd ses propriétés de protection. La chlorhexidine se retrouve directement en contact avec les cellules muqueuses et exerce son pouvoir cytotoxique sur celles-ci. Enfin, des enduits blanchâtres ont été observés. Les biopsies ont montré l'existence de cellules épithéliales kératinisées, dont certaines avec leur noyau persistant, évoquent une desquamation rapide (Flötra et al. 1971).

Ces desquamations sont donc idiosyncratiques et dose indépendantes. En effet, la capacité de la chlorhexidine à précipiter dépend de la tolérance de chaque individu et la composition de chaque salive. SKOGLUND et HOLST ont décrit trois cas de desquamation avec des concentrations de 0.2%. Certaines lésions guérissaient avec des concentrations de 0,1%. Cependant, il est impossible de conclure à un effet dépendant de la dose.

### **1 . 7 . 6 – Infections virales**

La salive contient beaucoup d'IgAs qui participent activement à la reconnaissance, d'adhésion et liaison aux cellules. Il s'agit de la première ligne de défense de la muqueuse buccale. Les propriétés cationiques de la chlorhexidine font que celles-ci précipitent avec les mucines, considérées comme un réservoir pour ces immunoglobulines, rendant la muqueuse plus sensible aux infections virales (Öydna et Gjermo, 1982).

### **1 . 7 . 7 – Colorations**

Les colorations des dents et des téguments sont les effets secondaires les plus rencontrés chez les patients utilisant la chlorhexidine. L'étiologie ainsi que les mécanismes seront traités dans la deuxième partie.

## CHAPITRE 2 :

# ANALYSE DES ETUDES IN VIVO / IN VITRO SUR LES COLORATIONS LIEES A L'UTILISATION DE BAINS DE BOUCHE A BASE DE CHLORHEXIDINE

### 2 . 1 - Étiologies des colorations des dents et des muqueuses

Il existe trois principales étiologies à l'origine de ces colorations :

- Réaction de MAILLARD
- Réactions avec les pigments métalliques
- Réactions avec les produits de l'alimentation et les constituants des boissons

#### 2 . 1 . 1 - Réaction de MAILLARD : Réactions non enzymatique

La réaction de Maillard est une série de réactions parallèles et consécutives assez complexe. Elle met en œuvre des composés contenant une fonction amine (peptides, acides aminés, protéines) et des sucres réducteurs (pentoses, hexoses). On peut subdiviser la réaction de Maillard en trois étapes principales.

Figure 2 . Figure schématique de la réaction de Maillard (Eriksen et Nordbo, 1985)

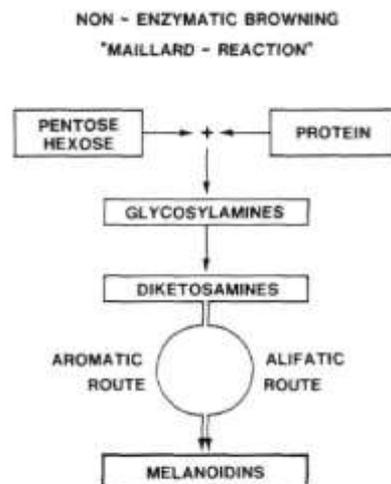


Fig. 1. This figure indicates the main steps in an organic, non-enzymatic browning reaction.

La réaction est initiée par la condensation d'un groupe amine d'un acide aminé avec un sucre réducteur. Ces substrats viennent des glycoprotéines de la pellicule acquise composée à 80% de protéines et 20% de carbohydrates comme le glucose (ERIKSEN 1985). Cette réaction est favorisée par des conditions faiblement acides et s'auto-catalyse par le

groupement acide de l'acide aminé. En revanche, elle est inhibée par les dioxydes de soufre et les sulfites (BERK 1976).

La phase suivante est : - Le réarrangement d'Amadori (cas des aldoses)

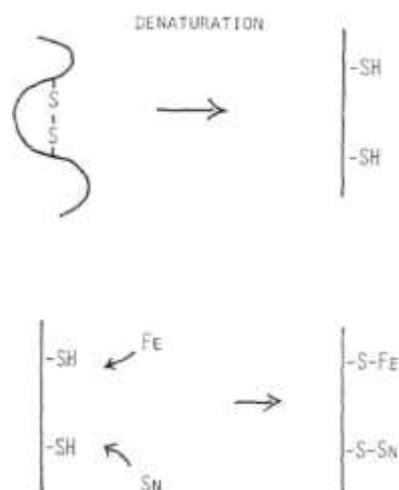
- Le réarrangement de Heyns (cas des cétooses)

Ces réactions catalysées par les acides, passent par une étape intermédiaire de formation de glycosylamines (base de Schiff) puis de diketosamines. Cette série de réactions est identique pour les deux types de réarrangement. De plus, les produits d'Amadori ont tendance à former des énols. En fonction du pH environnement, les réactions d'énolisation diffèrent. A  $\text{pH} \leq 7$ , l'énolisation 1-2 est privilégiée alors qu'à des pH plus élevés, l'énolisation 2-3 est plus marquée. Ces mécanismes suivis d'une série de polymérisation aboutissent à la formation de mélanoidines (pigments marron). Ce sont des polymères bruns de haut poids moléculaire qui peuvent contenir des groupes carbonyles, carboxyles, éthers, méthyles, amides, amines, pyrroles, indoles, anhydrides, hydroxyles (Tressl *et al* 1998). La température, le pH, l'humidité du milieu et la présence de métaux influencent la vitesse de réaction de Maillard.

### 2.1.2 - Réactions avec les pigments métalliques

Les études ont démontré la capacité de la chlorhexidine à dénaturer les protéines du biofilm salivaire (HJELJORD *et al* 1973). Les protéines de la pellicule sont dénaturées par formation de groupes sulfhydryles après que les ponts disulfures soient cassés (ERIKSEN 1985). Ainsi les groupes peuvent réagir avec les ions métalliques provenant de l'alimentation. L'augmentation du nombre de groupes sulfhydryles provoque des colorations jaunes et les groupes sulfures métalliques quant à eux provoquent des colorations brunes (ELLINGSEN *et al* 1982).

Figure 3 . Figure montrant les réactions chimiques possibles entre le biofilm salivaire et les pigments métalliques ( Eriksen et Nordbo, 1985)



Les études effectuées sur des lapins montrent que l'addition de la chlorhexidine associée aux ions ferriques potentialise les effets colorants. En effet, la chlorhexidine est un agent dénaturant.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cr}^{2+}$  réagissent directement pour former des sulfures métalliques et donner des colorations brunes. En outre, les agents oxydants dissolvent les ions sulfites et induisent la formation d'ions sulfate qui sont solubles (ELLINGSEN 1982).

### **2 . 1 . 3 – Réaction des produits de l'alimentation et des constituants des boissons avec les composés inhibiteurs de plaque**

Les aldéhydes et les cétones sont des constituants chimiques naturellement présents dans l'alimentation. Ce sont tous deux des composés carbonylés qui présentent beaucoup d'analogies. On représente les aldéhydes sous forme R-CHO. Les cétones, eux, sont représentés par R-CO-R'. La double liaison de l'oxygène lui confère un caractère plutôt basique au groupement. L'étude de NORBDO en 1971 a montré que la chlorhexidine pouvait réagir avec ces constituants chimiques et provoquer des colorations dentaires. PRAYITNO en 1979 et ADDY en 1982 ont démontré *in vivo* les capacités colorantes de la chlorhexidine lorsqu'elle était associée au thé, au vin rouge ou bien au café. Cela peut être dû soit par la formation de composants pigmentés par réaction avec la chlorhexidine (ADDY. 1982), soit par la haute teneur de composés tanniques présents surtout dans le thé et le vin rouge (NORDBO. 1977). Les tannins sont très dénaturants et le vin rouge contient aussi beaucoup de composés ferriques.

Joiner et Eloffson en 2006 ont étudié l'absorption de la chlorhexidine et du thé noir en condition *in vitro*. Ils en ont conclu que la chlorhexidine potentialisait les effets du thé pour les colorations. Avec un rinçage à la chlorhexidine, les colorations augmentaient puis il y avait un retour à l'état initial. Alors qu'avec le thé, les effets étaient augmentés et le retour à l'état initial était plus long. Cela montre une association de la chlorhexidine aux protéines salivaires qui est réversible. Par ailleurs, la molécule antiseptique perturbe la pellicule de surface présente sur la surface dentaire ce qui donne un accès plus facile pour les composés tanniques au contact direct de l'émail.

### **2 . 2 – Mécanismes d'interactions de la chlorhexidine avec l'organe dentaire**

#### **2 . 2 . 1 – Liaison de la chlorhexidine aux macromolécules**

Les études de HJELJORD en 1973 ont constaté que la liaison protéine/chlorhexidine était liée au poids moléculaire de la protéine. En effet, la liaison était beaucoup plus importante pour des molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 50000 pb (albumine) par rapport aux protéines de poids moléculaire inférieur à 20000 pb (protéine gastriques). Dans cette étude comparant les interactions protéines/chlorhexidine, 27% des protéines présentes dans la salive étaient liées à la chlorhexidine (Origines bactériennes, cellulaires, débris). La dénaturation des protéines absorbées par la membrane des muqueuses et des dents, ainsi que la lente réversibilité de la réaction peut expliquer en partie les colorations liées à la chlorhexidine.

#### **2 . 2 . 2 – Liaison de la chlorhexidine avec les protéines en fonction du pH**

Une étude de HJELJORD en 1973 a permis de mettre en évidence une pH dépendance des liaisons entre les protéines et la chlorhexidine. En effet, l'albumine, principale protéine circulant dans le sang, a été étudiée en mélangeant celle-ci avec une solution à base de chlorhexidine à 0.05% dans un milieu dont le pH était variable. Un faible pourcentage

d'albumine d'origine bovine précipitait à pH 7 alors qu'à pH 9, une grande partie de l'albumine était liée à la chlorhexidine. De plus, il n'y avait quasiment pas d'interaction entre la chlorhexidine et les protéines venant de l'estomac (environnement acide en condition *in vitro*). Lorsque le pH descendait progressivement par addition de 0.1N HCl, la précipitation des protéines diminuait elle aussi. Il existe donc une corrélation entre le pH et la liaison protéine-chlorhexidine.

A un pH  $\leq 3$  et inférieur, les groupes acides de l'albumine ne sont plus ionisés et invalident la connexion avec les charges positives de la chlorhexidine. Le pH 8 /9 coïncide avec la perte des charges positives par les groupements amines, ce qui donne une augmentation des charges négatives sur les protéines. L'augmentation de la solubilité des molécules de chlorhexidine à des pH élevés ainsi que les possibles interactions avec les lipoprotéines et glycoprotéines du fluide biologique peut être un facteur d'interaction protéine-chlorhexidine. Le pH change la configuration des protéines et augmente le nombre de site de liaison pour les pH plus élevé.

### 2 . 2 . 3 – Effet de la précipitation de la chlorhexidine en fonction de sa concentration

PRAYITNO et ADDY en 1979 ont étudié les effets *in vitro* de la chlorhexidine en fonction de sa concentration sur les colorations dentaires. Les différentes concentrations étudiées étaient de 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.2, 1 et 5% sur une période de 10 jours. Les pastilles de perspex ont été analysées par spectrophotométrie. Les résultats ont révélé une concentration seuil située entre 0.001 et 0.01% au-delà de laquelle l'absorbance calculée par spectrophotométrie était bien supérieure. Cependant, le maximum des colorations a été observées pour des concentrations de 0.1% donc pour les concentrations supérieurs à 0.1% , les bains de bouche ne produisent pas plus de colorations.

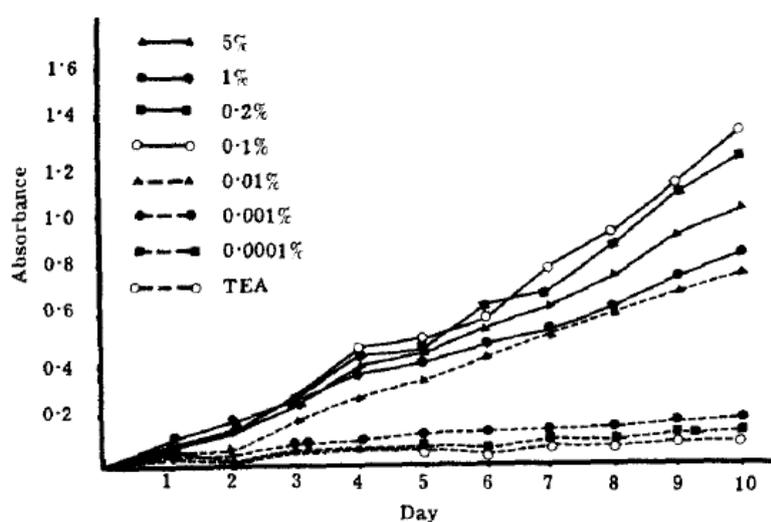


Figure 4 . Effet colorant de différentes concentrations en chlorhexidine sur une période de 10 jours (PRAYITNO et ADDY, 1979)

Pour une concentration de 5%, l'absorbance est plus faible que pour les solutions à 0.1 et 0.2%. Les colorations dues à la chlorhexidine sont liées à la concentration de l'antiseptique

présents dans les bains de bouche. Cependant, les colorations ne sont pas proportionnelles à la concentration. La réduction des colorations observées à haute concentration est intéressante, surtout sur les interactions entre la nature cationique de la chlorhexidine et les possibles anions environnants. Ces effets surviennent par la formation de complexes anion / cation instables grâce à la prédominance anionique de la surface des pastilles de perspex (méthacrylate) en condition *in vitro*. Ces complexes peuvent se dissocier et retourner en solution.

## **2 . 3 – Excipients réduisant les colorations liées à la chlorhexidine**

### **2 . 3 . 1 – Antiadhésif M239/144**

Le M239/144 est un copolymère conçu pour se lier aux hydroxyapatites de l'émail. Ses chaînes hydrophiles sont en contact avec le milieu buccal environnant. Le copolymère a une structure qui possède des groupements acide carboxylique sur sa chaîne principale ainsi que des polymères polyéthers (polyéthylène glycol) ou PEG sur ses chaînes latérales. Le PEG est extrêmement hydrosoluble. Le M239/144 a une masse molaire supérieure à 30,000. Il a montré une inhibition de l'adhésion des *S. sanguis* de 27 à 94% suivant les souches bactériennes (Addy et al, 1992). Cependant, outre ses propriétés inhibitrices d'adhésion, le M239/144 ne possède pas de propriétés antimicrobiennes. Les études de WADE et ADDY en 1994 ont eu l'idée de combiner l'anti-adhérent avec un antimicrobien tel que la chlorhexidine pour augmenter le potentiel de chacune des substances. Les résultats ont montré une réduction de l'activité antibactérienne de la chlorhexidine à l'exception de son action sur *A. Viscosus* qui était similaire. M239/144 diminuait également les effets colorants de la chlorhexidine. Apparemment, le M239/144 posséderait des chaînes latérales de groupements éthylènes qui montreraient une polarité avec les résidus guanidine de la chlorhexidine (Cserhati et al, 1990). Cependant cette liaison ne serait pas associée à l'inactivation de la chlorhexidine.

En 1995, Addy et Moran ont retravaillé sur la combinaison entre la chlorhexidine et l'antiadhésif en étude *in-vivo*. Les résultats sont sans appel. Les colorations avaient bien diminué par rapport au groupe contrôle (0.2% CHX). Cependant, la reprise croissante de la plaque semblait indiquer que cette inhibition de la coloration était le résultat d'une détérioration de l'activité de la chlorhexidine par l'anti-adhésif.

### **2 . 3 . 2 – Peroxyborate / Peroxycarbonate**

Les agents oxydants tels que le peroxyde d'hydrogène ont longtemps été utilisés en pratique dentaire pour ses propriétés désinfectantes et nettoyantes des dents et des gencives. Cependant, le peroxyde d'hydrogène à des concentrations acceptables pour l'utilisation en hygiène orale humaine (<3%) est instable. Des bains de bouche à base d'antioxydants tels que le peroxyborate ou le peroxycarbonate ont été commercialisés. Les études *in vivo* de Moran et Addy en 1995 ont montré une diminution significative de l'activité des bains de bouche à base de chlorhexidine combinés aux agents oxydants par rapport à la solution saline témoin. Par contre, cette inhibition n'est pas uniforme entre les 2 agents. En

effet, sur des durées supérieures à 3h, l'inhibition devient de plus en plus similaire à la solution témoin avec cependant une efficacité légèrement supérieure pour le peroxyarbonate. Cette différence d'efficacité peut s'expliquer par les proportions différentes d'oxygène actif présent dans les deux oxydants. Le peroxyarbonate a un pourcentage d'oxygène actif supérieur (11,4%) par rapport au peroxyborate (10,6%) Roberts 1951).

L'inhibition de plaque est cependant augmentée par rapport à la solution témoin, mais elle n'atteint pas la rémanence de la chlorhexidine. Les bains de bouche oxydant peuvent inhiber la formation de plaque, non par un effet antibactérien direct, mais par quelque autre mécanisme. Ces bains de bouche n'ont pas d'effets antibactériens directs ce qui explique leur courte rémanence. Ces combinaisons chlorhexidine/agent antioxydant peuvent être utilisés en préventif avant un acte chirurgical par exemple.

D'autres études comme celle de Gründemann et Timmerman en 2000 ont pu conclure que l'ajout d'un agent oxydant à la chlorhexidine était supérieur à l'utilisation de la chlorhexidine seule, en ce qui concernait l'inhibition de la plaque. De plus, le nombre de surfaces colorées était significativement inférieur lorsqu'un agent oxydant était ajouté à la chlorhexidine. Celle-ci partait mieux au brossage après un traitement rinçage avec antioxydant.

Addy et Al-Arrayed en 1991 ont conclu *in vivo* que l'agent oxydant pourrait avoir sa place dans le contrôle de la coloration dentaire associée à l'utilisation de la chlorhexidine, et aussi avoir une action antiplaque supérieure à la chlorhexidine seule. Cependant, les données concernant les antioxydants sont en contradiction les unes des autres pour avoir une conclusion suffisamment fiable et exploitable.

### **2 . 3 . 3 – Polyvinyl Pyrrolidone (PVP)**

Claydon et Addy en 2001 ont étudié les effets de la PVP à différentes concentrations en association avec la chlorhexidine. Les indices de plaque augmentaient avec l'augmentation du pourcentage de PVP et étaient plus importants qu'avec la chlorhexidine (0,06%) sans PVP. Par contre, l'intensité des colorations était significativement augmentée avec les rinçages chlorhexidine 0.06% comparé aux rinçages avec le placebo (eau) ou chlorhexidine/PVP. De plus, la diminution des tâches dentaires augmentait avec l'augmentation de la concentration en PVP et était peu significative pour les faibles concentrations. La PVP, aux concentrations utilisées (1.2%, 5%, 10%), réduiraient donc les colorations d'une solution de chlorhexidine 0,06% au prix d'une perte de son pouvoir d'inhibition envers la plaque dentaire.

Claydon et Manning en 2001 ont analysé les effets de la PVP (7%) sur l'activité clinique de solutions de chlorhexidine à 0.09% et 0.2%. Les conclusions sont contraires à celles de la première étude car ils ne trouvent pas de différences sur les scores de plaque entre la chlorhexidine et la chlorhexidine/PVP. De plus, il n'y a également pas de différences significatives entre la chlorhexidine et la chlorhexidine/PVP sur les colorations extrinsèques (dents et langue). Cancro et al en 1974 ont établi que les doses de 4mg de PVP et moins n'avaient aucune efficacité sur la plaque. Avec l'augmentation des doses passant de 5 à 6mg, l'inhibition de la plaque était très faible.

Dans l'étude de Claydon et Manning en 2001, il est apparu que la PVP ne bloquait pas la réaction entre la chlorhexidine et le tissu dentaire et gingival. C'est en contradiction avec les données des laboratoires qui montraient que la PVP pouvait bloquer les réactions de colorations de la chlorhexidine. Apparemment, la chlorhexidine se positionnerait temporairement entre la pellicule de surface des dents et la PVP car la chlorhexidine serait plus rapidement absorbée sur les surfaces que la PVP. Mais sachant que la PVP est non polaire, une fois que la concentration en PVP dans le milieu buccal a chuté, les surfaces dentaires sont réexposées à la chlorhexidine. Cela pourrait expliquer à la fois la diminution des colorations et la perte du pouvoir antiseptique de la chlorhexidine par un enclavement de celle-ci.

### **2 . 3 . 4 – ADS = Métabisulphite de Sodium / Acide Ascorbique**

Le système ADS ou anti-discoloration system est contenu dans les bains de bouche à base de chlorhexidine à différentes concentrations. Il s'agit d'une association de métabisulfite de sodium et d'acide ascorbique. Le métabisulfite est un élément inorganique utilisé pour ses propriétés désinfectantes et anti-oxydantes. L'acide ascorbique, lui, est aussi un anti-oxydant diminuant ainsi la prolifération des bactéries. Des études menées par C. Solis et A. Santos en 2011 ont comparé *in vivo* les colorations entre l'usage de deux bains de bouche à base de chlorhexidine, avec ou sans ADS. Pour eux, il n'y a pas de différence significative entre les deux produits, à la fois sur le contrôle de plaque et sur les colorations.

Une autre étude *in vivo* de N. Arweiler et N. Boehnke en 2006 a comparé un bain de bouche à 0.2% de chlorhexidine sans alcool avec un ADS contre un bain de bouche de même concentration avec 7% d'éthanol, avec comme placebo une solution avec uniquement 14% d'alcool. Ils en ont conclu qu'en plus de réduire les colorations, les ADS diminuaient les propriétés anti-bactériennes de la chlorhexidine sur la plaque dentaire ; en effet l'ADS interagissait avec les molécules de chlorhexidine et inhiberait l'adhésion des charges positives des molécules de digluconate sur les mucines salivaires. Ceci est en contradiction avec les données *in vivo* de F. Bernardi et MR. Pincelli qui, en 2004, ont publié une étude montrant un contrôle de plaque similaire entre les deux bains de bouche avec et sans ADS, et une diminution significative des colorations avec l'utilisation de la solution avec ADS. Selon eux, la synergie des deux molécules contenues dans l'ADS interférait avec les mécanismes de la pigmentation.

De plus, M. Addy a publié en 2004 une étude *in vitro* utilisant des blocs de résine méthylmétacrylate. Il a comparé des bains de bouche avec ADS avec des concentrations de chlorhexidine de 0.12% et 0.2%. La différence de coloration entre les deux solutions avec ADS n'est pas significative. De plus, il n'y a pas de différence de coloration par rapport à une solution de chlorhexidine sans ADS. Il est tout à fait possible que la durée de trempage de 2min dans les solutions ne soit pas suffisante pour mettre en évidence une quelconque différence de coloration entre les deux solutions.

Enfin, l'étude *in vivo* de P. Cortellini en 2008 a observé une diminution significative des colorations dentaires avec ADS versus Chlorhexidine seule.

## 2 . 4 – Méthode de recherche bibliographique

Une recherche bibliographique électronique a été effectuée sur la base de données Pubmed. Nous avons pu identifier :

- 222 articles correspondant aux mots clefs « discoloration » AND « chlorhexidine » indexés entre 1971 et 2012.
- 169 articles correspondant aux mots clefs « chlorhexidine » AND « stain » OR « staining » indexés entre 1964 et 2011.

La lecture des titres et résumés a permis d'identifier différents types d'articles :

- Revue de la littérature
- Études cliniques humaines
- Études cliniques animales
- Études *in vitro*
- Méta-analyses

Nous avons focalisé notre recherche sur les effets de la chlorhexidine sous forme de bain de bouche sur les colorations dentaires ainsi que les mécanismes qui y sont liés .Nous avons exclu tous les articles où la chlorhexidine n'était pas sous forme de bains de bouche, et où l'utilisation était autre que dentaire.

A l'issue de cette recherche, nous avons sélectionné :

- 14 publications internationales en anglais concernant les études cliniques *in vitro* qui ont étudié les colorations liées à la chlorhexidine sur des blocs de méthylmétacrylate Après lecture des résumés, nous avons conservé dans le cadre de la comparaison de protocole, les études sorties après 2000 c'est-à-dire 5 études *in vitro*.
- 14 publications internationales en anglais concernant des études cliniques humaines (comportant de 15 à 48 patients) qui ont étudié les effets colorants des bains de bouche à base de chlorhexidine ainsi que les possibles interactions par addition de différents adjuvants à la solution. Le plus souvent, il s'agit d'études en simple ou double aveugle. Cependant, les conflits d'intérêts ainsi que les biais répétés en font des articles scientifiques de faible niveau de preuve. 10 études sorties après 2000 ont été retenues dans le cadre de la comparaison de protocole.

15 études au total sur les 29 ont été sélectionnées pour les comparaisons de protocole. Ainsi les 14 autres (essai clinique chez l'animal, méta-analyse) ont été exploitées pour l'écriture de cette thèse.

<u>Recherche bibliographique sur Pubmed :</u> <i>Chlorhexidine &amp; Discoloration</i> <b>222</b>	<u>Recherche bibliographique sur Pubmed :</u> <i>Chlorhexidine &amp; stain</i> <b>169</b>
<u>Limites :</u> odontologie, en anglais, bains de bouche <b>107</b>	<u>Limites :</u> odontologie, en anglais, essais cliniques <b>67</b>
Après lecture des titres et résumés <b>8</b>	Après lecture des titres et résumés <b>19</b>
Recherche manuelle ascendante <b>0</b>	Recherche manuelle ascendante <b>2</b>
Au total : <b>8</b> articles retenus	Au total : <b>21</b> articles retenus

Tableau 1. Tableau récapitulatif de la méthodologie bibliographique.

## 2 . 5 – Comparaison comparative des études *in vivo* traitant des colorations liées à la chlorhexidine

De nombreux auteurs se sont penchés sur la problématique de cette thèse : Quels sont les mécanismes responsables de ces colorations ? Comment peut-on les éviter ? Les avancées pharmaceutiques permettent-elles de palier à tous ces effets secondaires indésirables ? Pour répondre à ces différentes problématiques, plusieurs protocoles ont été mis en place. Dans cette partie, le but est de comparer les protocoles *in vivo* déjà utilisés.

### Abréviations

Groupe randomisé : **Rand**

Simple Aveugle : **Simple A**

Double aveugle : **Double A**

Triple aveugle : **Triple A**

Groupes parallèles : **G Parallèles**

Traitements croisés : **Ttt croisés**

La bouche divisée (**Bouche D**) est une méthode qui permet d'effectuer plusieurs manipulations dans une seule bouche en traitant les arcades ou bien les secteurs de manières différentes.

Le **PI** (indice de plaque) décrit par Silness et Loë en 1964 se base sur le nombre de face colorée après le passage du contrôle de plaque. Le nombre total de face retenu est de quatre. Il s'agit des faces mésiales, distales, vestibulaires et palatines/linguales.

Le **BOMP** (indice de saignement ou Bleeding on marginal probing) décrit par Van der Weijden et al en 1994 permet d'évaluer le saignement gingival présent en trois points par dent sur chaque face.

Le **GMSI** (gingival modification of stain index) est une classification utilisée pour évaluer la quantité de plaque présente sur chaque dent. En effet, Koertge et Gunsolley en 1993 ont divisé la dent en quatre zones à exploiter :

- Faces vestibulaires et palatines/linguales
- Face proximales mésiales/distales
- Face gingivales (Faces qui longent la gencive)

Ensuite, l'intensité de chaque zone est classifiée selon un score décrit par Lobene en 1968 qui est :

- 0 = Pas de coloration
- 1 = Légère coloration
- 2 = Coloration modérée
- 3 = Forte coloration

Le **VF** (Microbiological Evaluation ou technique vérifiant la vitalité bactérienne) s'appuie sur des techniques de fluorescence puis d'analyse au microscope. C'est une technique décrite par Arweiler en 2001.

Le **BI** ou index de coloration est une technique décrite par Brecx et al. 1993. Elle se base sur le nombre de face colorée après passage du contrôle de plaque. Le nombre total de face retenu est de deux. Il s'agit des faces vestibulaires et palatines/linguales.

Étude / Année	Nombre de Volontaires	Protocole	Méthode d'analyse	Test statistique	Résultats
1) 2000	28	- Rand - Simple A - G Parallèles	- PI - GMSI - BOMP	- Mann-Whitney	- PI < pour groupe avec CHX et PER - GMSI < pour groupe avec CHX et PER - BOMP < pour groupe avec CHX et PER
2) 2001	48	- Rand - Double A - Ttt Croisés	- GMSI - PI	- Wilcoxon - Comparaison moyenne	- GMSI < si augmentation PVP - PI augmenté si présence de PVP
3) 2001	42	- Simple A - Ttt - Croisées Rand	- PI - GMSI - BOMP	- ANOVA - Comparaison moyenne - Wilcoxon	- PI = si CHX seule et PVP /CHX - GMSI = si CHX seule et PVP /CHX - BOMP = si CHX seule et PVP /CHX
4) 2004	15	- Simple A - Rand	- Spectro - PI - GMSI	- Wilcoxon Kolmogorov - Student t-test	- PI = si CHX / ADS - GMSI < si CHX/ADS
5) 2005	30	- Double A - Ttt Croisées - Rand	- GMSI (Ramfjord, 1959) - PI / BOMP (idem)	- Kruskal Wallis	- GMSI = CHX/ sodium fluoride ou cetylpiridium - PI / BOMP < CHX / sodium fluoride ou cetylpiridium
6) 2006	21	- Ttt Croisés - Rand - Double A	- PI - VF	- ANOVA - Kolmogorov - Student t-test	- PI < CHX (CHX meilleure que alcool simple) - VF < CHX (CHX meilleure que alcool simple)
7) 2006	96	- Rand - Double A	- PI / GMSI - BOMP - DI	- ANOVA - Kolmogorov	-PI < CHX / CHX.NaF / CHX.ethanol vs plac -BOMP< CHX / CHX.NaF / CHX.ethanol vs plac -DI ≥ CHX / CHX.NaF / CHX.ethanol vs plac
8) 2008	48	- Rand - Triple A	- GMSI	- Coefficient de corrélation - Test exact Fischer	- GMSI < CHX/ADS versus CHX seule - Meilleure tolérance avec ADS
9) 2010	20	- Single A - Rand - Bouche D	- GMSI	- Comparaison de moyenne	-GMSI < si absence de tartre avant ttt par CHX
10) 2011	15	- Double A - Ttt Croisés - Étude comparative	- PI - GMSI - BI (Brecx 1993)	- ANOVA	-PI et GMSI = avec ttt CHX/ADS - BI < CHX/ADS versus CHX seule

Tableau 2. Tableau récapitulatif des différentes études *in vivo* comparées

- 1) Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate
- 2) Studies on the effect of polyvinyl pyrrolidone on the activity of chlorhexidine mouthrinses : plaque and stain
- 3) The effect of polyvinyl pyrrolidone on the clinical activity of 0.09% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses
- 4) Chlorhexidine with an Anti Discoloration System. A comparative study
- 5) Influence of Additional Active Ingredients in the Effectiveness of Non-Alcoholic Chlorhexidine Mouthwashes : A Randomized Controlled Trial
- 6) Différences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions : a 4-day plaque re-growth study
- 7) Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator –blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study
- 8) Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery : a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial
- 9) Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces : a randomized trial
- 10) 0.2% Chlorhexidine Mouthwash with an antidiscoloration system versus 0.2% chlorhexidine mouthwash : A prospective clinical comparative study

Cette comparaison montre une similitude entre les protocoles. En effet, concernant les modes d'évaluation des colorations, on constate que les classifications de Lobene (1968) et Brex (1993) sont très largement utilisées. Cependant, les modes d'évaluation sont assez subjectifs. En fonction de l'investigateur, les données ne seront pas forcément les mêmes, impliquant un biais important dans les études. De plus, il se peut que les patients n'aient pas bien respecté les protocoles. Enfin, il est très difficile d'avoir exactement la même luminosité, la même chaleur de lumière avant et après les traitements avec les études *in vivo*. Ceci peut entraîner une faute d'appréciation des colorations, biaisant ainsi les résultats.

## **2 . 6 – Comparaison des études *in vitro* traitant des colorations liées à la chlorhexidine**

Les études *in vitro* sont de bonnes alternatives lorsque les études *in vivo* sont difficiles. En effet, il est possible d'utiliser toujours les mêmes substrats, diminuant ainsi les biais. Cependant, comme toute étude *in vitro*, elle comporte des limites, imposant ainsi de trouver le protocole et le substrat se rapprochant le plus de l'environnement buccal. Voici un tableau qui récapitule les différentes études *in vitro* menées sur le sujet.

Étude / Année	Nombre d'échantillons	Substrat	Méthode d'analyse	Test statistique	Résultats
1) 2001	66	Perspex	Spectrophotométrie	ANOVA	- Les propriétés intrinsèques de la salive ont une action sur les colorations
2) 2001	126	Perspex	Spectrophotométrie	ANOVA	- Thé/café potentialisent les effets colorants de la CHX
3) 2002	66	Perspex	Spectrophotométrie	ANOVA	- coloration augmenté si pas de stimulation salivaire
4) 2004	24	Perspex	Spectrophotométrie	ANOVA Mann-Whitney	- colorations = si CHX seul ou ADS /CHX
5) 2007	35	Disques d'hydroxyapatites	Ellipsométrie	Tukey Kramer ANOVA	- CHX potentialise les effets du thé pour les colorations - colorations Thé seul ≥ CHX seule

Tableau 3 . Tableau récapitulatif des différentes études *in vitro* comparées

1) The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining *in vitro* – a developmental method

2) The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride to produce staining *in vitro*: a possible predictor of inactivation

3) The effect of unstimulated and stimulated whole saliva on extrinsic staining *in vitro* – a developmental method

4) A non-staining chlorhexidine mouthwash? Probably not: a study *in vitro*

5) Absorption of chlorhexidine and black tea onto *in vitro* salivary pellicles, as studied by ellipsometry

Le bloc de Perspex est très largement utilisé dans les études *in vitro*. Il s'agit d'un bloc rectangulaire de méthylmétacrylate de 30mm x 10mm x 3mm spécialement préparé pour être accueilli dans la chambre UV du spectrophotomètre. Les données sont ainsi recueillies en toute objectivité en évitant les biais liés à la récolte des données. Cependant, peu

d'études en dehors de l'équipe de M Addy de l'université de Bristol ont été menées. Cela explique l'absence de non diversité des protocoles.

Le protocole mis en place dans la troisième partie a pour but de valider un modèle parmi le test de 4 substrats bien différents, avec un enregistrement des données faisant intervenir une autre technique.

## CHAPITRE 3 :

# PROTOCOLE D'ETUDE IN VITRO SUR L'ETUDE DES COLORATIONS DENTAIRES LIEES A L'USAGE DE BAINS DE BOUCHE A BASE DE CHLORHEXIDINE

### 3 . 1 – Introduction

La plaque dentaire est le principal facteur étiologique des deux plus grands problèmes dentaires : la maladie carieuse et la maladie parodontale. De nombreuses études ont montré que le contrôle rigoureux de la plaque diminuait considérablement la progression de ces maladies. Les avancées technologiques et scientifiques ont permis de sortir des conduites à tenir afin de garder un contrôle de plaque optimale. Ainsi, les contrôles mécaniques et chimiques de la plaque font désormais partie intégrante de la santé bucco-dentaire. De nombreuses études ont montré que le seul contrôle mécanique de la plaque n'était pas suffisant pour en éliminer la totalité. En effet, cette méthode requiert du temps, de la motivation et de la dextérité manuelle. Les composants chimiques peuvent venir en complément de la méthode manuelle. Ils sont alors recommandés. Durant la phase thérapeutique, le praticien recommande l'utilisation d'antimicrobien pour retirer la plaque, traiter les gingivites ou en post-traitement chirurgical. Ces anti-microbiens peuvent contenir de sels métalliques, d'huiles essentielles, de phénols, de fluorures, d'ammoniums quaternaires, de bisguanides. Cette liste n'est cependant pas exhaustive.

Le digluconate de chlorhexidine, de la famille des bisguanides, est le gold standard dans les thérapeutiques de contrôle de plaque. Cependant, l'utilisation d'agents chimiques à base de chlorhexidine provoque de nombreux effets secondaires. Celui qui nous intéresse plus particulièrement est la formation de colorations brunâtres sur les surfaces dentaires et gingivales. Le but de cette manipulation est d'étudier le pouvoir colorant de différents bains de bouche à base de chlorhexidine sur différents substrats.

### 3 . 2 – Matériels et méthodes

De nombreuses études *in vitro* à ce sujet ont été réalisées par l'équipe de Addy M, du département de parodontologie de l'université de Bristol en Angleterre. L'utilisation de blocs de Perspex a été très largement testée dans les études *in vitro*. Il s'agit d'un bloc rectangulaire de résine polyméthacrylate de méthyle de 30mm x 10mm x 3mm spécialement préparé pour être accueilli dans la chambre UV du spectrophotomètre. Les données sont ainsi recueillies en toute objectivité en évitant les biais liés à la récolte des données. Les résultats recueillis montrent une augmentation significative des colorations liées à l'usage de bain de bouche à base de chlorhexidine. Cependant, peu d'études en dehors de l'équipe de Addy M ont été menées. Cela explique l'absence de diversité des protocoles. Le protocole

mis en place dans le cadre de cette étude *in vitro* a pour but de valider un modèle parmi le test de 5 substrats bien différents, avec un enregistrement des données faisant intervenir une technique autre que celle de l'équipe de Bristol.

Le protocole a été réalisé au Laboratoire d'Ingénierie OstéoArticulaire (LIOAD) de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM UMR5791) de l'Université de Nantes au pôle Odontologie. Il s'agit d'une étude *in vitro* comparative non randomisée faisant intervenir deux opérateurs. Le premier, est désigné pour la réalisation des échantillons et du recueil des données. Le second est désigné pour la réalisation des échantillons, des bains et le traitement des données. Cette étude a été réalisée sur une durée totale de 8 mois avec l'élaboration de deux manipulations test et d'une manipulation définitive, fruit d'une maturation du protocole et de l'expérience des opérateurs.

Plusieurs réunions ont été menées en collaboration avec plusieurs enseignants afin d'affiner le protocole. Dans le premier protocole, trois bains de bouche ont été testés :

- Eludril 0.12 % de chlorhexidine du laboratoire Pierre Fabre
- Curasept ADS 212 0.12% de chlorhexidine avec ADS (Anti Discoloration System) du laboratoire Curaden Swiss
- Solution sous forme générique pour bain de bouche à base de chlorhexidine à 0.12% de concentration du laboratoire Biogaran

La solution du témoin négatif est de la salive artificielle sous forme de berlingot.

### **3 . 2 . 1 – Substrats testés**

- Dents humaines (incisives, canines, prémolaires et molaires) avec analyse de la couronne associée à l'émail, et la partie radiculaire associée au ciment ( ce qui représente 2 substrats sur un même échantillon )

Celles-ci ont été coupées en deux dans le sens longitudinal par un isomet de la marque BUEHLER à la vitesse de 4 sur 10. La plus grande lame diamantée a été utilisée et irriguée par de l'huile de synthèse pour donner deux échantillons par dent. Les dents préalablement nettoyées et surfacées délicatement sont ainsi ajustées et collées sur une plaque avec de la colle cyanoacrylate pour être découpées. Après découpe, la partie collée est nettoyée pour retirer tout excédent de colle.

- Des coupes d'ivoire d'éléphant

Des statuettes d'ivoire d'éléphant d'Afrique ont été récupérées aux douanes et découpées préalablement avec un isomet identique aux dents humaines ; le but étant d'avoir un bloc long d'environ 10 cm sur 1 cm de diamètre afin que la découpe des échantillons soit plus facile. Le bloc est tranché avec un LEICA SP1600 à une vitesse de 15 environ. La vitesse ne doit pas être augmentée car les échantillons se courbent. Ils sont donc inexploitable pour la lecture des données. Dans les manipulations du

début, l'épaisseur était de 100 micromètres. Nous nous sommes aperçus que l'alcool contenu dans les bains de bouche déshydratait les échantillons, les rendant plus cassants et complètement courbés. L'épaisseur a été augmentée à 300 micromètres pour la dernière manipulation. Nous avons observé une bien meilleure préhension. De plus, les échantillons étaient beaucoup plus stables dans le temps.

- Pastilles de CDA (Apatite déficiente en calcium)

Les pastilles de diamètre 0.7 cm ont été fabriquées par les deux manipulateurs à l'aide d'une presse. Une pression de 10 tonnes était nécessaire pour une quantité de poudre d'environ 20 grammes. Les pastilles sont cuites par la suite afin de les rendre moins fragiles.

- Coupes de résine

Les blocs de résine acrylique de polyméthacrylate de méthyle ont été commandés au laboratoire de prothèse du centre de soins du CHU de Nantes. Leur composition était identique aux résines utilisées pour confectionner les dents des prothèses amovibles. Les dimensions des blocs étaient d'environ 10cm de longueur sur 1cm de diamètre. La coupe des blocs s'est effectuée de la même manière que les coupes d'ivoire avec une épaisseur de 100 micromètres.

L'intérêt de tester différents substrats est évident. Cela permet de comparer la sensibilité des différents composants naturels et chimiques susceptibles d'être présents dans la cavité buccale. Les dents d'origine humaine sont incontournables dans le protocole car c'est un organe de la cavité buccale. La partie cémentaire est étudiée car visible lorsque les récessions apparaissent. L'ivoire est un matériau d'origine naturelle et utilisé car sa composition se rapproche de celle de l'émail. La CDA est un matériau d'origine synthétique et utilisé car sa composition se rapproche de celle de l'émail. La résine est utilisée car le but était de savoir si les personnes utilisant des prothèses amovibles devaient les retirer avant d'effectuer des bains de bouche pour éviter la coloration des dents synthétiques.

Dans le protocole détaillé plus loin, le thé a été mis à contribution car le but était de constater ses effets potentialisateurs. En effet, PRAYITNO en 1979 et ADDY en 1982 ont démontré *in vivo* les capacités colorantes de la chlorhexidine lorsqu'elle était associée au thé. Cela peut être dû soit à la formation de composants pigmentés par réaction avec la chlorhexidine (ADDY. 1982), soit par la haute teneur en composés tanniques présents surtout dans le thé et le vin rouge (NORDBO. 1977).

Les protocoles test ainsi que les protocoles définitifs ont été réalisés sur une durée de 3 semaines. Voici la mise en œuvre du protocole test.

### 3 . 2 . 2 - Premier Protocole Test

Après préparation soigneuse des échantillons, les différents bains sont préparés. Voici les différents bains :

- ✓ Eludril seul
- ✓ Eludril associé au thé
- ✓ Curasept seul
- ✓ Curasept associé au thé
- ✓ Générique
- ✓ Générique associé au thé
- ✓ Salive seule (témoin négatif)

A l'instant T0, le thé est préparé selon les recommandations du fabricant. Il s'agit d'un thé noir de la marque «Le Palais des Thés» . Pour 100ml d'eau, une cuillère à café de thé sec est versée. L'eau est portée à 95° puis infusée pendant 4 minutes et laissée à refroidir à température ambiante.

Dans chaque puit sont déposés :

- 4 millilitres de solution de bain de bouche (à l'aide d'une pipette graduée)
- 2 millilitres de thé (si besoin)
- l'échantillon (après immersion totale pendant 1 minute dans de la salive artificielle afin de mimer le biofilm salivaire)

L'acquisition de l'image a été effectuée avant tout trempage à l'instant T0, puis à l'instant T1 (une semaine après), puis à l'instant T2 (deux semaines après), puis à l'instant T3 (trois semaines après).

3 échantillons par substrat sont utilisés pour chaque bain. Dans un souci d'efficacité et d'organisation, des boîtes de 12 puits ont été utilisées pour un seul bain. En effet, les 3 échantillons par substrat, sachant qu'il y a 4 substrats (l'ivoire et le ciment faisant partie de la dent ), nous arrivons à 12 puits nécessaires. Enfin, sachant que nous utilisons 6 bains et 1 témoin négatif, nous avons eu besoin de 7 boîtes de 12 puits pour la manipulation.

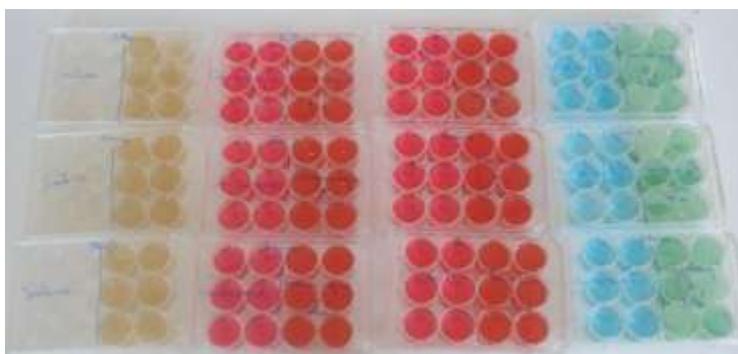


Figure 5 . Boîte de 12 puits après immersion des échantillons

A la fin de chaque fin d'acquisition d'image, les boîtes sont soigneusement refermées avec du film plastique extensible pour éviter tout phénomène d'évaporation et placées dans une étuve à 37°.

### 3 . 2 . 2 . 1 – Acquisition de l'image

Avant chaque manipulation, les échantillons sont photographiés pour être analysés. La plus grande reproductibilité est essentielle pour le traitement car le but du protocole est d'observer des différences de colorations. Les conditions entre les T0, T1, T2 et T3 doivent être identiques afin d'éviter tous biais liés à l'acquisition. Pour cela, nous avons gardé le même opérateur pour la prise des photographies. De plus, l'appareil photographique ainsi que l'objectif sont restés inchangés. Il s'agit d'un Nikon D80 et d'un objectif macro Sigma appartenant au département de parodontologie de la faculté de chirurgie dentaire de Nantes. La prise des photographies ainsi que la reproductibilité ont été une des étapes les plus compliquées du protocole.

Au début, les photographies étaient prises par l'opérateur dans une pièce très lumineuse, avec de la lumière naturelle et artificielle, sans support. Le résultat était extrêmement médiocre.



Figure 6 . Coupe de dent prise à T0 avec l'appareil photographique

Sur celle-ci, on peut constater que la lumière du jour vient de la gauche. La photo est donc divisée en deux avec un dégradé du plus clair au plus foncé, de la gauche vers la droite. Il n'est alors pas possible pour nous d'évaluer une quantité de couleur avec un défaut aussi important d'uniformité de fond. De plus, les données ne peuvent être reproductibles si nos conditions sont dépendantes de la luminosité extérieure (par beau temps ou par temps de pluie par exemple).

Par exemple, les figures 7 et 8 montrent les variations possibles liées aux conditions extérieures. De plus, la brillance au niveau de l'émail est un phénomène que nous ne pouvons pas retirer car c'est lié tout simplement à sa surface. La surface n'est pas plate donc les rayons lumineux approchent la surface dentaire avec différents axes entraînant cette brillance.



Figure 7 . Coupe de dent prise à T1 avec l'appareil photographique



Figure 8 . Coupe de la même dent que figure 7 à T0 avec l'appareil photographique

Nous avons fait part de nos difficultés à un photographe du service de photologie du CHU de Nantes. Il nous a expliqué l'utilité de s'affranchir des conditions extérieures donc par la suite, celles-ci ont été prises dans un local fermé sans lumière. Autour de l'échantillon, nous pouvons constater des ombres. C'est un phénomène tout à fait normal. Cependant dans l'expérience, l'ombre augmente la quantité de noir sur le fond, le rendant moins uniforme.

De la prise de photo de l'instant T0 à T2 de la première manipulation test, le fond était une feuille de canson blanche. Celle-ci réfléchissait un peu la lumière et n'était pas adéquate. Pour l'instant T3 de la première manipulation test, en accord avec le photographe de la photologie, il a été décidé de placer l'échantillon sur un fond gris et mat. En plus du changement de fond, et pour atténuer encore plus les ombres, un système de lumière a été installé en direction des échantillons. Il s'agit d'un support contenant deux lampes 12V à gauche et deux lampes 12V à droite. Chaque lampe a une puissance de 25W. La quantité de lumière délivrée peut être modifiée par un variateur associé. Les quatre lampes orientées sur un seul échantillon permettent d'atténuer au maximum les ombres car chacune des lampes atténue l'ombre créée par la lampe opposée.



Figure 9 . Support pour photographie

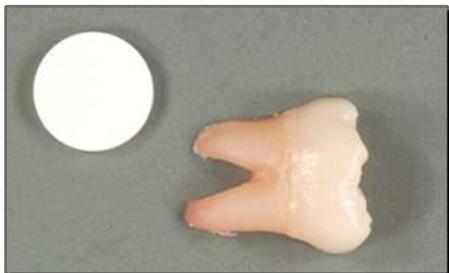


Figure 10 . Coupe de dent prise à T2 avec l'appareil photographique

Sur cette photographie, on constate un fond beaucoup plus homogène. La brillance de l'émail est toujours présente car inévitable. Les ombres sont toujours présentes mais atténuées. L'acquisition de l'image des dents naturelles a été la plus compliquée. En effet, le volume de la dent, la concavité de la couronne, son état de surface en font un échantillon très difficile à photographier.

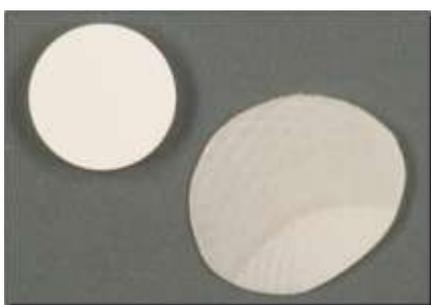


Figure 11 . Coupe d'ivoire prise à T2 avec l'appareil photographique

Sur cette photographie, on constate un fond homogène ainsi que des ombres très réduites. L'ivoire en fine lamelle permet de s'affranchir de toutes les contraintes liées à l'anatomie dentaire, avec une structure chimique assez proche.

Une pastille de CDA a été rajoutée à partir de l'instant T3 de la 1<sup>ère</sup> manipulation. Celle-ci est utilisée comme un témoin de la même manière que le fond.

Le traitement des résultats n'a pas été effectué car il y avait de trop grandes variations de fond, de luminosité et d'environnement. Cette première manipulation a servi à affiner le protocole, pour permettre d'évaluer les difficultés auxquelles nous n'avions pas pensé.

### 3 . 2 . 3 – Deuxième protocole test

Après préparation soignée des échantillons, les différents bains sont réalisés. Voici les différents bains :

- ✓ Eludril seul
- ✓ Eludril associé au thé
- ✓ Curasept seul
- ✓ Curasept associé au thé

- ✓ Générique
- ✓ Générique associé au thé
- ✓ Salive seule (témoin négatif)

A l'instant T0, le thé est préparé selon les recommandations du fabricant. Il s'agit d'un thé noir de la marque « Le Palais des Thés ». Pour 100ml d'eau, une cuillère à café de thé sec est versée. L'eau est portée à 95° puis infusée pendant 4 minutes et laissée refroidir à température ambiante.

Dans chaque puit sont déposés :

- 4 millilitres de solution de bain de bouche (à l'aide d'une pipette graduée)
- 2 millilitres de thé (si besoin)
- l'échantillon (après immersion totale pendant 1 minute dans de la salive artificielle)

L'acquisition de l'image a été effectuée avant tout trempage à l'instant T0, puis à l'instant T1 (une semaine après), puis à l'instant T2 (deux semaines après), puis à l'instant T3 (trois semaines après).

Le protocole de départ est identique à la première manipulation test. Les bains de bouche et la salive artificielle sont inchangés. Le nombre d'échantillon par solution était de trois. Nous avons donc eu besoin de 7 boîtes de 12 puits pour réaliser l'expérience. A la fin de chaque acquisition d'image, les boîtes sont refermées, enveloppées dans un film plastique extensible et placées dans un étuve à une température de 37°.

Chaque échantillon avant l'acquisition d'image est séché pour retirer le liquide sur sa surface, ce qui pourrait augmenter la brillance, puis placé sur un fond mat à côté d'une pastille de CDA. Cette manipulation est effectuée pour chaque échantillon, aux instants T0, T1, T2 et T3.

L'appareil photographique est mis en place sur le support contenant les lampes. Le support doit être bien placé afin d'avoir un grossissement optimal correspondant à la focale de l'objectif macroscopique utilisée. Pour notre part à l'institut INSERM, et par rapport à notre objectif macro, le support devait être positionné au plus bas.

Au niveau des réglages de l'appareil photographique :

- Mode Manuelle M
- Diaphragme 22 / 2.0k
- Sensibilité iso 200
- Balance de blanc en Tungstène

Le réglage de l'objectif était fait en fonction de l'échantillon photographié et en fonction de la netteté. Les réglages étaient pratiquement toujours les mêmes car l'appareil photographique était toujours à la même distance et l'objectif identique.

### Le traitement des données

Une fois l'acquisition des données, celles-ci sont sous forme de fichier JPEG. Elles sont dans un premier temps converties en fichier TIFF à l'aide du logiciel PHOTOSHOP 6.0 pour analyse dans le logiciel QUANTIMET LEICA QWIN 3. L'analyse s'effectue de la façon suivante :

- Sélection de la zone à analyser par l'opérateur :

Cette sélection s'effectue sur la zone intéressante du substrat (pour la dent, la couronne et le ciment sont sélectionnés séparément), puis sur une partie du fond ainsi que de la pastille témoin. Le but de cette sélection est de choisir la zone la plus représentative et la plus grande possible de chaque échantillon à analyser. Le logiciel donne une valeur pour chaque couleur.

- Les données sont recueillies dans un tableau Excel pour chaque substrat en fonction de chaque bain

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>
	225,87	229,99	250,01	229
	217,32	220,36	226,52	226,12
	205,16	219,4	217,95	223,67
Moyenne	216,12	223,25	231,49	226,26

Tableau 4 . Différentes valeurs de rouge recueillies à différents instants pour un même substrat

- Au vue des légères différences de fond obtenues entre T0 et T3, nous avons été obligés de passer par une étape de pondération des données recueillies. Celle-ci a consisté pour chaque échantillon de chaque substrat à chaque couleur, à calculer une donnée pondérée qui sera utilisée pour les calculs statistiques.

Ex : Dans un premier temps, il faut trouver la valeur pondérée du fond de l'échantillon à analyser. Pour se faire, on a utilisé la formule suivante :  $100 - ((\text{valeur brute du fond à la couleur rouge} / \text{référence Rouge}) * 100)$

Dans l'exemple ci-dessous, voici le calcul :  $100 - ((101,85/117,77) * 100) = 13.52$

La valeur référence (ici 117,77) est une valeur calculée sur un fond pris en photographie et utilisée comme témoin dans les mêmes conditions et identiques.

Ensuite, cette valeur est utilisée en utilisant la formule suivante : (valeur brute de l'échantillon + (valeur brute de l'échantillon\*valeur de pondération trouvée précédemment / 100)

Dans l'exemple ci-dessous, voici le calcul :  $(222,33+(222,33*13,52/100))=252$

Eludril			
Rouge			
Fond			
Brute	Pondéré	Brut	Pondéré
101,85	13,52	222,33	252
109,89	6,69	216,56	231
117,32	0,38	216,42	217
152,39	-29,40	246,14	174
147,38	-25,14	245,27	184
155,72	-32,22	245,92	167

Tableau 5 . Valeurs de rouge recueillies avec leurs pondération.

- La différence T0-T3 entre les données pour chaque couleur de chaque échantillon est effectuée. Ce sont ces données qui serviront pour l'analyse des données et la réalisation des tests statistiques.

Émail						
T0-T3						
Eludril	Eludril + thé	Générique	Générique + thé	Curasept	Curasept + thé	Salive
78	83	39	87	1	13	126
47	48	48	62	36	57	98
50	3	16	118	67	35	62

Tableau 6 . Différences T0 et T3 pour l'émail pour chaque bain

### 3 . 2 . 4 – Protocole définitif

Le protocole définitif est identique aux deux autres protocoles test. En effet ceux-ci ont permis d'affiner la méthode de travail. Cependant nous nous sommes rendus compte que le nombre de 3 échantillons par bain était trop juste car l'écart-type était trop faible. Le risque étant soit de démontrer une différence à tort alors qu'il n'y en avait pas ou bien de ne pas mettre en évidence de différence alors qu'il aurait pu en avoir une. Il a donc été décidé

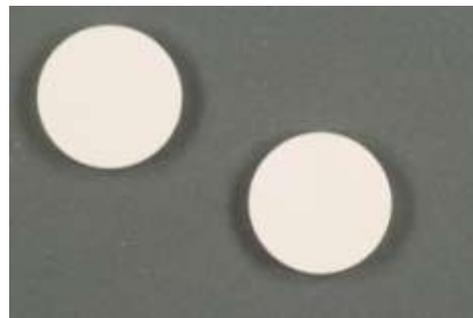
d'augmenter le nombre d'échantillon par substrat à 6 sans renouveler la résine car celle-ci était extrêmement peu colorée à l'œil nu et donc sans réel intérêt pour cette manipulation. Pour ce qui est des lamelles d'ivoire, le protocole de coupe était identique. Cependant, l'épaisseur a été augmentée à 300 $\mu$ m pour éviter les rétractions d'échantillon liées à la déshydratation de l'ivoire.

Pour l'acquisition des images, un deuxième rendez-vous a été organisé avec le photographe de la photologie car nous avons observé une légère différence de fond surtout avec la résine sans que la cause soit identifiée.



Figure 12 . Photographie à l'instant T2 d'une coupe de résine de la deuxième manipulation

Figure 13 . Photographie à l'instant T2 d'une pastille de CDA à la deuxième manipulation



Ci-dessus nous pouvons constater une différence assez importante de couleur de fond. Le but dans cette troisième manipulation est d'éviter de pondérer les données ce qui est source de biais important. Un réglage a ainsi été réalisé en photologie à ISO200 alors que l'appareil photographique était bloqué en ISO automatique alors qu'il indiquait ISO200.

Enfin, sachant que ce qui nous intéressait était la différence delta T0-T3, la manipulation n'a consisté qu'à acquérir les données à T0 puis à T3, 3 semaines plus tard.

Le reste du protocole, de la réalisation au traitement des données fait strictement appel aux mêmes procédures.

### 3.3 - Résultats

Les résultats ont été répertoriés dans des tableaux par substrat et par couleur. Un test paramétrique de comparaison de moyenne ANOVA a été utilisé ; voici un aperçu de ces résultats.

<b>Contraste</b>	<b>Différence</b>	<b>Significatif</b>
Curasept + thé vs Générique + thé	89,667	Oui
Curasept + thé vs Eludril + thé	53,333	Oui
Curasept + thé vs Eludril	46,333	Non
Curasept + thé vs Salive	33,333	Non
Curasept + thé vs Curasept	25,333	Non
Curasept + thé vs Générique	7,333	Non
Générique vs Générique + thé	82,333	Oui
Générique vs Eludril + thé	46,000	Non
Générique vs Eludril	39,000	Non
Générique vs Salive	26,000	Non
Générique vs Curasept	18,000	Non
Curasept vs Générique + thé	64,333	Oui
Curasept vs Eludril + thé	28,000	Non
Curasept vs Eludril	21,000	Non
Curasept vs Salive	8,000	Non
Salive vs Générique + thé	56,333	Oui
Salive vs Eludril + thé	20,000	Non
Salive vs Eludril	13,000	Non
Eludril vs Générique + thé	43,333	Non
Eludril vs Eludril + thé	7,000	Non
Eludril + thé vs Générique + thé	36,333	Non

Tableau 7. Comparaison des deltas T0-T3 observés entre les solutions pour l'ivoire

On constate à travers ce tableau des différences significatives entre le curesept + thé versus générique + thé et Eludril + thé. En effet, le générique ainsi que l'Eludril en association avec le thé donnent des colorations plus importantes que le Curasept + thé en admettant un risque de 5% d'erreur.

De plus, on constate que le générique lorsqu'il est utilisé avec du thé donne plus de coloration. Soit le thé potentialise les effets colorants du bain de bouche, soit le thé a des effets colorants liés à sa forte concentration de composés tanniques. Enfin, la salive et le Curasept colorent moins que le générique lorsqu'il est associé avec du thé avec une probabilité théorique d'erreur à 5%.

<b>Contraste</b>	<b>Différence</b>	<b>Significatif</b>
Générique + thé vs Générique	61,000	Oui
Générique + thé vs Curasept	59,000	Oui
Générique + thé vs Salive	40,000	Oui
Générique + thé vs Curasept + thé	37,667	Oui
Générique + thé vs Eludril + thé	30,000	Non
Générique + thé vs Eludril	19,667	Non
Eludril vs Générique	41,333	Oui
Eludril vs Curasept	39,333	Oui
Eludril vs Salive	20,333	Non
Eludril vs Curasept + thé	18,000	Non
Eludril vs Eludril + thé	10,333	Non
Eludril + thé vs Générique	31,000	Non
Eludril + thé vs Curasept	29,000	Non
Eludril + thé vs Salive	10,000	Non
Eludril + thé vs Curasept + thé	7,667	Non
Curasept + thé vs Générique	23,333	Non
Curasept + thé vs Curasept	21,333	Non
Curasept + thé vs Salive	2,333	Non
Salive vs Générique	21,000	Non
Salive vs Curasept	19,000	Non
Curasept vs Générique	2,000	Non

Tableau 8 . Comparaison des deltas T0-T3 observés entre les solutions pour la CDA

On constate des différences significatives en comparant le générique + thé avec le générique, le Curasept, la salive ainsi que le Curasept + thé. Le générique associé avec le thé est toujours plus colorant.

Des différences sont également observées en comparant l'Eludril avec le générique et le Curasept.

De nombreux tableaux ont été traités dans le cadre de cette étude. Cependant, il était impossible de tous les mentionner ci-contre. Pour plus ample information, ils sont disponible à l'INSERM UMRS791.

Nous avons tenté également de les convertir en pourcentage afin d'utiliser un test de comparaison de fréquence mais malheureusement sans résultats exploitables.

### 3 . 4 - Discussion

Nous pouvons constater que le digluconate de chlorhexidine est une molécule qui est source de colorations. Il est important que les laboratoires se penchent sur la question car de nombreux patients se plaignent des colorations dentaires liées à la chlorhexidine. En effet, les dents deviennent brunâtres dès la première semaine de traitement par bain de bouche. Heureusement, ces colorations sont réversibles.

Dans cette étude, nous avons bien observé une augmentation des colorations lorsque la chlorhexidine était associée au thé. Cependant, il ne nous est pas possible de conclure si l'augmentation des colorations était liée à la potentialisation de l'effet colorant du thé par la chlorhexidine, ou bien simplement par la haute teneur en composés tanniques dans le thé. Il serait important de refaire le même protocole en y incluant le thé seul qui serait le témoin positif.

Certains laboratoires comme CURADEN SWISS ont associé de l'ADS (anti-discoloration system) dans leurs bains de bouche à base de chlorhexidine (Curasept). Il est possible de voir les résultats de toutes ces recherches dans le chapitre 2 . 3 . 4 traitant des ADS.

De plus, ce protocole était établi pour valider un modèle autre que l'équipe de Martin ADDY de l'université de Bristol. En effet, ils utilisaient des pastilles de perspex (résine de polyméthacrylate de méthyle) avec une analyse UV au spectrophotomètre. Le perspex associé à la spectrophotométrie est un protocole assez éloigné de la réalité clinique. Ce n'est donc pas le substrat idéal pour cette manipulation. Les dents se rapprochent le plus des conditions *in vivo*. Cependant, leurs formes et leurs états de surface rendent le travail de capture d'image trop compliqué et non reproductible. De plus, la préparation est assez complexe. Les pastilles de CDA sont très reproductibles, et possèdent un état de surface impeccable. La fabrication est simple. Sa composition se rapproche de celle de la dent. Cependant, elles sont très fragiles à manipuler. Enfin, l'ivoire est assez simple à préparer, sa composition est très proche de l'émail, et elle tient bien dans le temps. Elle est sensible aux colorations. Selon nous, il s'agit du substrat idéal pour des manipulations *in vitro* intéressantes les colorations dentaires.

Une autre orientation a été donnée au protocole. En effet, il a été décidé d'utiliser les photographies en noir et blanc. Le traitement des images ne se ferait non pas en analysant les quantités de rouge, bleu et vert mais en analysant les différents niveaux de gris. Le traitement des données numériques serait plus facile et tout aussi rigoureux. Les recherches sont en cours donc non publiées dans ce travail.

# CONCLUSION

La chlorhexidine est vraiment la molécule incontournable dans le milieu de la dentisterie. La formation initiale nous apprend à prescrire les bains de bouche. Cependant, devant le nombre de solutions proposées et le nombre de molécules présentes, la formation devrait être davantage tournée sur les avantages et les inconvénients à l'utilisation des différents bains de bouche. C'est pour cela que beaucoup de praticiens utilisent certains bains de bouche sans savoir exactement si la molécule est utilisable pour une situation clinique donnée. La molécule de chlorhexidine en fait partie. En effet, la chlorhexidine est souvent prescrite après chaque brossage. Elle est aussi fréquemment associée à des dentifrices contenant du lauryl sulfate de sodium qui inhibent l'action de la molécule antiseptique.

La chlorhexidine sous sa forme la plus adaptée à la situation et bien utilisée est la thérapeutique chimique de choix. Par contre, le problème des colorations lié à son usage persiste. La formation ou la documentation du praticien peut diminuer une bonne partie des effets par des gestes simples comme le détartrage avant tout traitement pour retirer la plaque (JOINER et ELOFSON, 2006), ou bien par l'utilisation de bains de bouche avec un système discolorant (CORTELLINI P, 2008). Cependant la deuxième solution est à prendre avec précaution car la diminution des colorations pourrait aller de pair avec une diminution du pouvoir antiseptique de la chlorhexidine (BERNARDIF et PINCELLI MR, 2004).

Enfin, la chlorhexidine a encore de beaux jours devant elle car ses effets sont totalement réversibles et du point de vue de la balance bénéfique/risque, l'utilisation de cette molécule reste encore favorable.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**1. ADDY M, AL-ARRAYED F et MORAN J.**

The use of an oxidising mouthwash to reduce staining associated with chlorhexidine. Studies in vitro and in vivo.

J Clin Periodontol 1991;**18**(4):267-271.

**2. ADDY M, MORAN J, DAVIES RM et coll.**

The effect of single morning and evening rinses of chlorhexidine on the development of tooth staining and plaque accumulation. A blind cross-over trial.

J Clin Periodontol 1982;**9**(2):134-140.

**3. ADDY M, MORAN J, NEWCOMBE R et coll.**

The comparative tea staining potential of phenolic, chlorhexidine and anti-adhesive mouthrinses.

J Clin Periodontol 1995;**22**(12):923-928.

**4. ADDY M, MORAN J et SHARIF N.**

A non-staining chlorhexidine mouthwash ? Probably not :a study in vitro.

Int J Dent Hygiene 2005;**3**(2):59-63.

**5. ADDY M et ROBERTS WR.**

Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of antiseptic mouthrinses containing chlorhexidine, alexidine, cetyl pyridinium chloride and hexetidine. Relevance to mode of action.

J Clin Periodontol 1981;**8**(4):295-310.

**6. ADDY M et WRIGHT R.**

Comparison of the in vivo and in vitro antibacterial properties of providone iodine and chlorhexidine gluconate mouthrinses.

J Clin Periodontol 1978;**5**(3):198-205.

**7. ARWEILER NB, NETUSCHIL L et REICH E.**

Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality. A controlled clinical study.

J Clin Periodontol 2001;**28**(2):168-174.

**8. ARWEILER NB, BOEHNKE N, SCULEAN A et coll.**

Differences in efficacy of two commercial 0.2% chlorhexidine mouthrinse solutions: a 4-day plaque re-growth study.

J Clin Periodontol 2006;**33**(5):334-339.

**9. BASCONES A, MORANTE S, MATEOS L et coll.**

Influence of additional active ingredients on the effectiveness of non-alcoholic chlorhexidine mouthwashes : A randomized controlled trial.  
J Periodontol 2005;**76**(9):1469-1475.

**10. BERNARDI F, PINCELLI MR, CARLONI S et coll.**

Chlorhexidine with an Anti Discoloration System. A comparative study.  
Int J Dent Hyg 2004;**2**(3):122-126.

**11. BERK Z.**

Non-enzymatic browning.  
In : Braveman's introduction to the biochemistry of food.  
Amsterdam : Elsevier, 1976:149-167.

**12. BONESVOLL P, LOKKEN P et ROLLA G.**

Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses.  
Arch Oral Biol 1974;**19**(11):1025-1029.

**13. BRECX M, MACDONALD LL, LEGARY K et coll.**

Long-term effects of Meridol and chlorhexidine mouthrinses on plaque, gingivitis, staining, and bacterial vitality.  
J Dent Res 1993;**72**(8):1194-1197.

**14. CANCRO LP, PAULOVICH DB, BOLTON S et coll.**

Dose response of chlorhexidine gluconate in a model in vivo plaque system.  
J Dent Res 1974;**53**(3)765.

**15. CIANCIO SG, MATHER ML et BUNNEL HL.**

The effect of a quaternary ammonium-containing mouthwash on formed plaque.  
Pharmacol Ther Dent 1978;**2**:1-5.

**16. CLAYDON N, ADDY M, JACKSON R et coll.**

Studies on the effect of polyvinyl pyrrolidone on the activity of chlorhexidine mouthrinses: plaque and stain.  
J Clin Periodontol 2001;**28**(6):558-564.

**17. CLAYDON N, MANNING CM, DARBY-DOWMAN A et coll.**

The effect of polyvinyl pyrrolidone on the clinical activity of 0.09% and 0.2% chlorhexidine mouthrinses.  
J Clin Periodontol 2001;**28**(11):1037-1044.

**18. CORTELLINI P, LABRIOLA A, ZAMBELLI R et coll.**

Chlorhexidine with an anti discoloration system after periodontal flap surgery: a cross-over, randomized, triple-blind clinical trial.  
J Clin Periodontol 2008;**35**(7):614-620.

**19. CSERHATI T, SZOGYI M et LELKES L.**

Study of chlorhexidine-tenside interactions by means of charge-transfer chromatography.  
Pharm Acta Helv 1990;**65**(4):113-116.

**20. DOLLES OK et GJERMO P.**

Caries increment and gingival status during 2 years' use of chlorhexidine- and fluoride-containing dentifrices.  
Scand J Dent Res 1980;**88**(1):22-27.

**21. ERIKSEN HM, NORDBO H, KANTANEN H et coll.**

Chemical plaque control and extrinsic tooth discoloration. A review of possible mechanisms.  
J Clin Periodontol 1985;**12**(5):345-350.

**22. ELLINGSEN JE, ROLLA G et ERIKSEN HM.**

Extrinsic dental stain caused by chlorhexidine and other denaturing agents.  
J Clin Periodontol 1982;**9**(4):317-322.

**23. ELLINGSEN JE, ERIKSEN HM et ROLLA G.**

Extrinsic dental stain caused by stannous fluoride.  
Scand J Dent Res 1982;**90**(1):9-13.

**24. FOULKES DM.**

Some toxicological observations on chlorhexidine.  
J Periodont Res 1973;**8**(suppl. 12):55-57.

**25. FLEMMING TF, NEWMAN MG, DOHERTY FM et coll.**

Supragingival irrigation with 0.06% chlorhexidine in naturally occurring gingivitis. I. 6 month clinical observations.  
J Clin Periodontol 1990;**61**(2):112-117.

**26. FLOTRA L, GJERMO P, ROLLA G et coll.**

Side effects of chlorhexidine mouth washes.  
Scand J Dent Res 1971;**79**(2):119-125.

**27. GJERMO P, RÖLLA G et ARSKAUG L.**

Effect on dental plaque formation and some in vitro properties of 12 bisbiguanides.  
J Periodont Res 1973;**8**(suppl 12):81-88.

**28. GOMES BP, VIAMA ME, ZAIA AA et coll.**

Chlorhexidine in endodontics.  
Braz Dent J 2013;**24**(2):89-102.

**29. GRUNDEMANN LJ, TIMMERMAN MF, IJZERMAN Y et coll.**

Stain, plaque and gingivitis reduction by combining chlorhexidine and peroxyborate.  
J Clin Periodontol 2000;**27**(1):9-15.

**30. HAUGEN E et JOHANSEN JR.**

Sensitization of guinea pigs with chlorhexidine.  
Acta Odontol Scand 1974;**32**(3):173-175.

**31. HJELJORD LG, ROLLA G et BONESVOLL P.**

Chlorhexidine-protein interactions.

J Periodont Res 1973;**8**(suppl.12) :11-16.

**32. HENNESEY TD.**

Some antibacterial properties of chlorhexidine.

J Periodont Res 1973;**8**(suppl.12):61-67.

**33. HEINTZE U, BIRKHED D et BJORN H.**

Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex.

Swed Dent J 1983;**7**(6):227-238.

**34. HEPSON HU, BJORNLAND T et SKOGLUND LA.**

Side-effects and patient acceptance of 0.2% versus 0.1% chlorhexidine used as post-operative prophylactic mouthwash.

Int J Oral Maxillofac Surg 1988;**17**(1):17-20.

**35. HUGO WB et LONGWORTH AR.**

The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

J Pharm Pharmacol 1966;**18**(9):569-578.

**36. JENSEN JE et CHISTENSEN F.**

A study of the elimination of chlorhexidine from the oral cavity using a new spectrophotometric method.

J Periodont Res 1971;**6**(4):306-311.

**37. JOINER A, ELOFSSON UM et ARNEBRANT T.**

Adsorption of chlorhexidine and black tea onto in vitro salivary pellicles, as studied by ellipsometry.

Eur J Oral Sci 2006;**114**(4):337-342.

**38. KASSAB H et ABDUL-RAHMAN G.**

The effect of some antifungal agents and chlorhexidine on Candida albicans adherence on acrylic resin denture base surface (In vitro study).

Dent J 2004;**4**(1):65-72.

**39. KOERTGE TE et GUNSOLLEY JC.**

Comparison of two dentifrices in the control of chlorhexidine-induced stain.

J Clin Dent 1993;**4**(1):1-5.

**40. LINDHE J, LANG N, KARRING T et coll.**

Clinical Periodontology and Implant Dentistry. 4<sup>e</sup> ed.

Copenhagen: Munksgaard. Blackwell, 2003.

**41. LANG NP, CATALANOTTO FA et KNOPFLI RU.**

Quality-specific taste impairment following the application of chlorhexidine digluconate mouthrinses.

J Clin Periodontol 1988;**15**(1):43-48.

**42. LOBENE RR.**

Effect of dentifrices on tooth stains with controlled brushing.

J Am Dent Assoc 1968;**77**(4):849-855.

**43. LORENZ K, BRUHN G, HEUMANN C et coll.**

Effect of two new chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discolouration. A randomized, investigator-blind, placebo-controlled, 3-week experimental gingivitis study.

J Clin Periodontol 2006;**33**(8):561-567.

**44. LÖE H, THEILADE E et JENSEN SB.**

Experimental gingivitis in man.

J Clin Periodontol 1965;**36**:177-187.

**45. MENDIETA C, VALLCORBA N, BINNEY A et coll.**

Comparison of 2 chlorhexidine mouthwashes on plaque regrowth in vivo and dietary staining in vitro.

J Clin Periodontol 1994;**21**(4):296-300.

**46. MATHUR S, TANU M, RAHUL S.**

Chlorhexidine : The gold standart in Chemical Plaque Control

Natl J Physiol Pharm Pharmacol 2011;**1**(2):45-50.

**47. NORDBO H.**

Discoloration of human teeth by a combination of chlorhexidine and aldehydes or ketones in vitro.

Scand J Dent Res 1971;**79**(5):356-361.

**48. NORDBO H.**

Discoloration of dental pellicle by tannic acid.

Acta Odontol Scand 1977;**35**(6):305-310.

**49. OYDNA J et GJERMO P.**

Effect of chlorhexidine mouthrinses on concentration of IgA in expectorates.

Scand J Dent Res 1982;**90**(3):189-192.

**50. OPPERMAN RV.**

Effect of chlorhexidine on acidogenicity of dental plaque in vivo.

Scand J Dent Res 1979;**87**(4):302-308.

**51. PRAYITNO S, TAYLOR L, CADOGAN S et coll.**

An in vivo study of dietary factors in the aetiology of tooth staining associated with the use of chlorhexidine.

J Periodont Res 1979;**14**(5):411-417.

**52. QUIGLEY G et HEIN.**

Comparative cleansing efficiency of manual and power brushing.  
J Am Dent 1962;65:26-29.

**53. ROBERTS JB.**

A comparison of sodium percarbonate with sodium perborate.  
Br Dent J 1951;90(4):93-97.

**54. ROLLA G, LOE H et SCHIOTT CR.**

The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins.  
J Periodont Res 1970;5(2):90-95.

**55. ROLLA G, LOE H et SCHIOTT CR.**

Retention of chlorhexidine in the human oral cavity.  
Arch Oral Biol 1971;16(9):1109-1116.

**56. ROLLA G et MELSON B.**

On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine.  
J Dent Res 1975;54(suppl B):57-62.

**57. SCHIOTT CR, BRINER WW, KIRKLAND JJ et coll.**

Two years oral use of chlorhexidine in man. III. Changes in sensitivity of the salivary flora.  
J Periodont Res 1976;11(3):153-157.

**58. SHEEN S, BANFIELD N et ADDY M.**

The propensity of individual saliva to cause extrinsic staining in vitro--a developmental method.  
J Dent 2001;29(2):99-102.

**59. SHEEN S, BANFIELD N et ADDY M.**

The effect of unstimulated and stimulated whole saliva on extrinsic staining in vitro--a developmental method.  
J Dent 2002;30(7/8):365-369.

**60. SHEEN S, OWENS J et ADDY M.**

The effect of toothpaste on the propensity of chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride to produce staining in vitro: a possible predictor of inactivation.  
J Clin Periodontol 2001;28(1):46-51.

**61. SILNESS J et LOE H.**

Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition.  
Acta Odontol Scand 1964;22(1):121-135.

**62. SKOGLUND LA et HOLST E.**

Desquamative mucosal reactions due to chlorhexidine gluconate. Report of 3 cases.  
Int J Oral Surg 1982;11(6):380-382.

**63. SLAYNE M, ADDY M et WADE W G.**

The effect of a novel anti-adherent compound on the adherence of oral streptococci to hydroxyapatite.

J Dent Res 1993;**72**(abstract 168):707.

**64. SOLIS C, SANTOS A, NART J et coll.**

0.2% chlorhexidine mouthwash with an antidiscoloration system versus 0.2% chlorhexidine mouthwash: a prospective clinical comparative study.

J Periodontol 2011;**82**(1):80-85.

**65. TRESSL R, WONDRAK GT, KRUGER RP et coll.**

New Melanoidin-like Maillard Polymers from 2-Deoxypentoses.

J Agric Food Chem 1998;**46**(1):104-110.

**66. VAN DER WEIJDEN GA, TIMMERMAN MF, NIJBOER A et coll.**

Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis.

J Clin Periodontol 1994;**21**(9):589-594.

**67. WADE WG, SLAYNE MA et ADDY M.**

The antibacterial and anti-staining properties of the novel anti-adherent agent M239, 144 alone and in combination with chlorhexidine.

J Clin Periodontol 1994;**21**(6):438-440.

**68. ZANATTA FB, ANTONIAZZI RP et ROSING CK.**

Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: a randomized trial.

J Appl Oral Sci 2010;**18**(5):515-521.

# TABLE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

**Figure 1** . Molécule de chlorhexidine ( [fr.wikipedia.org/wiki/Chlorhexidine](http://fr.wikipedia.org/wiki/Chlorhexidine))

**Figure 2** . Figure schématique de la réaction de Maillard (Eriksen et Nordbo, 1985)

**Figure 3** . Figure montrant les réactions chimiques possibles entre le biofilm salivaire et les pigments métalliques ( Eriksen et Nordbo, 1985)

**Figure 4** . Effet colorant de différentes concentrations en chlorhexidine sur une période de 10 jours (PRAYITNO et ADDY, 1979)

**Figure 5** . Boîte de 12 puits après immersion des échantillons

**Figure 6** . Coupe de dent prise à T0 avec l'appareil photographique

**Figure 7** . Coupe de dent prise à T1 avec l'appareil photographique

**Figure 8** . Coupe de la même dent que figure 5 à T0 avec l'appareil photographique

**Figure 9** . Support pour photographie

**Figure 10** . Coupe de dent prise à T2 avec l'appareil photographique

**Figure 11** . Coupe d'ivoire prise à T2 avec l'appareil photographique

**Figure 12** . Photographie à l'instant T2 d'une coupe de résine de la deuxième manipulation

**Figure 13** . Photographie à l'instant T2 d'une pastille de CDA à la deuxième manipulation

**Tableau 1** . Tableau récapitulatif de la méthodologie bibliographique

**Tableau 2** . Tableau récapitulatif des différentes études *in vivo* comparées

**Tableau 3** . Tableau récapitulatif des différentes études *in vitro* comparées

**Tableau 4** . Différentes valeurs de rouge recueillies à différents instants pour un même substrat

**Tableau 5** . Valeurs de rouge recueillies avec leurs pondération

**Tableau 6** . Différences T0 et T3 pour l'émail pour chaque bain

**Tableau 7** . Comparaison des deltas T0-T3 observés entre les solutions pour l'ivoire

**Tableau 8** . Comparaison des deltas T0-T3 observés entre les solutions pour la CDA

**GINEAU (Tony).** - Protocole d'étude in vitro de la pigmentation dentaire par la chlorhexidine. 48 f. ; 13 ill.; 8 tabl.; 68 ref. ; 30 cm. (Thèse : Chir Dent. ; Nantes ; 2013)

## RESUME

La chlorhexidine est utilisée depuis 60 ans en dentisterie. Ce « gold standard » des antiseptiques comporte cependant un inconvénient majeur en provoquant des colorations dentaires.

Dans un premier temps, les propriétés de la chlorhexidine seront détaillées. Dans un second temps, les mécanismes à l'origine de l'apparition des colorations suite à l'utilisation de l'antiseptique seront exposés. Enfin, un protocole de modélisation *in vitro* portant sur les colorations dentaires liées à la chlorhexidine sera présenté.

RUBRIQUE DE CLASSEMENT : Parodontologie

## MOTS CLES MESH

Plan de Recherche - Research Design

Chlorhexidine – Chlorhexidine

Bains de Bouche – Mouthwashes

Dyschromie Dentaire – Tooth Discoloration

## JURY

Président : Professeur SOUEIDAN A.

Assesseur : Professeur BOULER JM.

Directeur : Docteur STRUILLLOU X.

Co-Directeur : Docteur BORIES C.

## ADRESSE DE L'AUTEUR

44117 Saint André des Eaux

[phoenix3004@hotmail.com](mailto:phoenix3004@hotmail.com)