

Université de Nantes

UFR d'Odontologie

Docteur de l'Université de Nantes

Ecole doctorale de Chimie- Biologie
Discipline : Recherches Cliniques -Parodontologie

Christian VERNER

Utilisations des prélèvements bactériens lors de la prise
en charge des maladies parodontales

Thèse dirigée par le Dr Michel SIXOU
Soutenue le 14 novembre 2007

Jury :

Le Président : Pr Jacques DOURY

Les rapporteurs : Pr Martine BONNAURE-MALLET
Pr Jean Louis SAFFAR

Membres du jury : Dr David SPRATT
Dr Assem SOUEIDAN

**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**

Liste des principales abréviations utilisées

PCR rt : real time Polymerase Chain Reaction

Aa: Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Pg : Porphyromonas gingivalis

Tf : Tannerella forsythia

Td : Treponema denticola

Fn : Fusobacterium nucleatum sp

Pi : Prevotella intermedia

Capno : Capnocytophaga sp.

Cr : Campylobacter rectus

Ca: Candida Albicans

Ec: Eikenella corrodens

tétra: tétracycline

amox : amoxicilline

méto: métronidazole

doxy: doxycycline

mino: minocycline

ery: érythromycine

spi: spiramycine

clin: clindamycine

azithro: azithromycine

cip: ciprofloxacine

Table des matières

INTRODUCTION	7
---------------------	----------

1-Les maladies parodontales et les objectifs microbiologiques

1-1 -Microbiologie dans les maladies parodontales	21
1-2 -Classification des maladies parodontales	17
1-3 -La parodontite chronique	23
1-4 -Les parodontites agressives	24
1-5 Effets des thérapies sur les bactéries sous gingivales	19
1-6 L'utilisation systémique des antibiotiques	21
1-6-1 Critères bactériologiques	22
1-6-2 Critères pharmacologiques	22
1-6-3 Critères pharmacocinétiques	23
1-6-4 Les molécules	24
1-6-4-1 Les bêta-lactamines	24
1-6-4-2 Les macrolides	24
1-6-4-3 les macrolides apparentés	25
1-6-4-4 Les imidazolés	25
1-6-4-5 Les tétracyclines	26
1-7 Parodontites et maladies systémiques	27

2-Etude des prélèvements de flores bactériennes anaérobies sous- gingivales par site ou par pool

2-1 Introduction	36
2-2- Matériels et méthodes	37
2-2-1 Populations étudiées	31
2.2.2- Critères d'inclusion	37

2.2.3- Critères de non inclusion	37
2.2.4- Protocole	31
2.2.4.1- La dispersion de l'échantillon	33
2.2.4.2- La dilution	33
2.2.4.3- La mise en culture	35
2.2.4.4- Milieu non spécifique	35
2.2.4.3.2- Milieu spécifique adapté aux espèces recherchées	35
2.2.4.4- Incubation	36
2.2.4.5- Reconnaissance des bactéries	40
2.2.4.6 – tests de sensibilité aux antibiotiques	41
2-3- Résultats	48
2-4 -Discussion	53
2-5 Conclusion	56

3- PCR en temps réel versus culture bactérienne anaérobie pour l'identification et la quantification des principales bactéries pathogènes parodontales

3-1- Introduction	51
3-2- Matériels et méthodes :	52
3-2-1-Patients et site de prélèvements	52
3-2-1-1 Critère d'inclusion	52
3.2.1.2 Critères de non inclusion	52
3.2.2- Procédures de culture anaérobie	53
3.2.3- PCR en temps réel	54
3.2.4- Statistiques	55
3-3 -Résultats	55
3.3.1-En général	55
3.3.2- Porphyromonas gingivalis	57
3.3.3- Tannerella forsythia	58

3.4 -Discussion	58
3.4.1- Porphyromonas gingivalis	59
3.4.2- Aggregatibacter actinomycetemcomitans	59
3.4.3- Fusobacterium nucleatum et Prevotella intermedia	59
3.4.4- Tannerella forsythia	60
3.4.5- Culture anaérobie versus PCR en temps réel	60
3.4.5- Critères de choix	61
3-5 Conclusion	62

4- Choix de l'antibiothérapie en fonction d'une analyse de flores sous-gingivales par culture bactérienne ou par PCR en temps réel

4-1-Introduction	70
4-2- Matériels et méthodes	71
4-2-1- La population étudiée	65
4-2-2-Tests de sensibilité aux antibiotiques	66
4-3- Résultats	72
4-3-1-Résultats selon les patients	66
4-3-2-1-Groupe présentant Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Fusobacterium nucleatum.	67
4-3-2-2 -choix des antibiotiques	67
4-3-3- Les autres groupes de patients	69
4-3.4- Résultat par famille d'antibiotique	70
4-4- Discussion	77
4-5- Conclusion	80

5-Etude comparative de la sensibilité de onze pathogènes parodontaux in vitro vis-à-vis de l'azithromycine versus érythromycine, spiramycine, clindamycine.

5-1- Introduction	75
5-1-2 Les intérêts de l'azithromycine	76
5-2 -Matériels et méthodes	83
5-2-2 Procédures de cultures anaérobies	77
5-3- Résultats	84
5-3-1-Résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques	78
5.3.2 - Vis-à-vis des pathogènes parodontaux	86
5-4- Discussion	86
5-4-1 Prélèvements significatifs	80
5-4-2 L'azithromycine	80
5-5- Conclusion	87

6- Les profils bactériens

6-1 -Introduction	88
6-2- Matériel et méthode	88
6-2-1 -Patients et site de prélèvement	88
6-2-2 - Le paro-diagnostic ®	83
6-3 -Résultats	90
6-3-1 -Présence des pathogènes	90
6-3-2- Concentration des pathogènes	92
6-4 -Discussion	92
6-5- Conclusion	96

CONCLUSION	91
-------------------	-----------

Références	100
-------------------	------------

Introduction :

Les parodontites sont des maladies infectieuses à manifestations inflammatoires. La principale cause est une infection bactérienne (Slots et al. 1979, Sixou 1991, Haffajee et al. 1994, Socransky et al. 2005) due à une modification de l'équilibre des bactéries du biofilm présentes dans les tissus parodontaux. Les bactéries de ce biofilm (Kolenbrander 2002) sont organisées en complexes formés à la surface de la dent. Lorsque les plus agressives d'entre elles sont présentes ou en quantité trop importante, elles menacent l'intégrité du parodonte physiquement et chimiquement en fonction de la capacité de défense de l'hôte (Tonnetti et al. 1999), ce qui nécessite une prise en charge du patient (Theilade et al. 1966, Baehni et al. 2004). Ces bactéries peuvent être d'origine exogène (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*) et provenir d'une source extérieure (infection primaire) ; ou endogène pour la plus grande part d'entre elles, l'infection sera dite secondaire provenant de pathogènes présents chez l'hôte (Van Winkelhoff et al. 1996).

Selon l'étude de N. Miller en 1991 sur 1005 patients entre 15 et 60 ans, les parodontites se caractérisent par une perte de l'attache parodontale avec des poches moyennes dans 34,1% des cas et profondes dans 10,1% des cas. Hohfeld et al. (1993) ont suggérés la nécessité de traitements complexes dans 54% des cas chez 143 patients en Allemagne entre 45 et 54 ans. Des études plus récentes sur 2144 sujets français de 35 à 64 ans montre que 50% des français présentent un risque de perte d'attache sévère (Bourgeois et al. 2006), avec un risque estimé de perte d'attache $\geq 5\text{mm}$ dans 46,68% des cas et une profondeur de poches $> 5\text{mm}$ dans 10,21% des cas. L'âge et le sexe ne sont pas des critères de prédictibilité fiable de prévalence contrairement au nombre de dents perdues (Bouchard et al. 2006).

L'éradication des pathogènes présents dans le biofilm sur la surface des dents est réalisée le plus souvent par une méthode non spécifique consistant à éliminer physiquement et chimiquement le biofilm. Le contrôle chimique par des bains de bouche et l'hygiène bucco dentaire (Sato et al. 1993, Teles et al. 2006) y compris sur la langue, permettent de réduire la quantité de micro organismes donc de pathogènes et de prévenir la structuration du biofilm pour assurer la pérennité des traitements et le maintien d'une santé parodontale (Axelsson et al. 2004). Le traitement mécanique non chirurgical des surfaces par débridement (Drisko et al. 1996, Mombelli et al. 2000) va permettre une désinfection des surfaces cémentaires

(Petersilka et al. 2002) et permettre la formation d'un épithélium long de jonction. En cas de persistance de poches profondes, une intervention à lambeau permettra l'accès aux surfaces, plus particulièrement les lésions inter radiculaires et éventuellement en fonction des objectifs de traitements réaliser une plastie osseuse (Tuan et al. 2005). Cependant ces thérapeutiques peuvent être insuffisantes (Renvert et al. 1990, Bollen et al. 1998, Mombelli et al. 1994) notamment dans les formes agressives contre les pathogènes pénétrant les tissus parodontaux (Christersson et al. 1985), colonisant les surfaces inaccessibles et pour les pathogènes présents en dehors du parodonte (van Winkelhoff et al. 1988).

Une thérapeutique spécifique plus ciblée sur les agents pathogènes semble alors pertinente pour les parodontites agressives (Haffajee et al. 1997). Le traitement antibiotique par voie systémique en thérapeutique complémentaire représente alors le moyen le plus adapté pour lutter contre l'infection. L'antibiothérapie locale pouvant être indiquée pour des substances toxiques par voie systémique ou pour cibler un site spécifique, mais l'AFSSAPS ne recommande pas ces systèmes pour les thérapeutiques en odonto-stomatologie. L'utilisation de l'antibiothérapie systémique est recommandée lors de pathologies agressives ou pour des patients à risques systémiques, notamment pour les pathogènes très pénétrants (Eickholz et al. 2005) et disséminés dans toute la bouche en incluant les sites non dentaires (Van Winkelhoff et al. 1988). Comment choisir le traitement adapté aux pathogènes présents sans déséquilibrer la flore commensale (Marsh 2003)? Il semble intéressant de définir le diagnostic bactérien du patient pour pouvoir mettre en œuvre une antibiothérapie ciblée.

Plusieurs méthodes de diagnostic bactériologique sont utilisées et peuvent être classées en deux catégories : les méthodes par culture et les méthodes moléculaires.

La méthode de référence est la technique de la culture bactérienne qui permet l'identification des bactéries pathogènes de manière non spécifique et la réalisation d'un test de sensibilité aux antibiotiques (Sixou 2003). Mais la méthode de prélèvement et de transport peut avoir une influence sur les résultats car les bactéries pathogènes doivent être conservées vivantes (Slots 1986).

Quelle méthode de transport doit être privilégiée? La première partie de cette étude compare la méthode de transport des prélèvements par pool ou par sites spécifiques. La méthode de transport par pool étant la mise en commun des sites dans un même flacon. L'objectif est de définir si les prélèvements analysés par culture anaérobie doivent être transportés dans un milieu spécifique à chaque site ou non.

La méthode de culture reste cependant difficile à mettre en œuvre et consommatrice de beaucoup de temps en raison de protocoles lourds, et présente certaines limites.

Les méthodes de diagnostic moléculaire bactérien (hybridation, PCR, PCR en temps réel) sont plus simples et plus rapides d'utilisation pour le praticien et reposent sur une détection de l'ADN bactérien et notamment des séquences spécifiques du matériel génétique des différents pathogènes potentiels (Heid et al. 1996).

La PCR en temps réel semble être, aujourd'hui, la technique la plus sensible et spécifique. Elle permet une identification et une quantification de l'ADN grâce à une analyse entièrement automatisée.

La deuxième partie de ce travail est une étude comparative des diagnostics bactériens réalisés après les prélèvements bactériens par analyse en PCR en temps réel versus culture bactérienne anaérobie sur les mêmes sites de prélèvements chez des patients atteints de parodontites agressives. Il paraît important de définir les objectifs thérapeutiques pour déterminer la méthode d'analyse des pathogènes parodontaux la plus adaptée.

Dans la troisième partie, nous avons comparé le choix de l'antibiothérapie après les prélèvements en fonction des deux méthodes d'analyse. Le patient a-t-il autant de chance d'avoir une antibiothérapie adaptée après une analyse par culture bactérienne anaérobie ou par PCR en temps réel ?

Cette étude a révélé de grandes disparités entre le choix des antibiotiques en fonction du type d'analyse. Cette différence étant due au fait qu'aux cours de ces études, une évolution sur la sensibilité aux antibiotiques a été trouvée en fonctions des pathogènes rencontrés.

L'utilisation des antibiotiques depuis ces 50 dernières années a modifié l'efficacité des antibiotiques notamment par une variation de sensibilité due aux résistances à certaines formes de pathogènes (Quirynen et al. 2003) et à la prolifération de micro-organismes non bactériens.

Une étude plus précise sur la comparaison des macrolides vrais utilisés en parodontologie a été conduite, dans la quatrième partie de ce travail, pour déterminer le niveau d'efficacité des principaux représentants de cette famille (érythromycine, spiramycine, clindamycine) avec une molécule moins utilisée telle que l'azithromycine. Ces résultats sont confrontés avec les

recommandations de la Haute Autorité de Santé qui sont à ce jour les références opposables en France.

Mais nos patients présentent-ils tous les mêmes profils bactériologiques ? Une étude a été élaborée dans la dernière partie pour définir des groupes de patients qui auraient le même profil bactérien à partir de diagnostics bactériens réalisés par PCR en temps réel. Une comparaison en fonction des pays sera réalisée pour évaluer les différences et les similitudes des infections parodontales, et l'implication lors du choix des thérapeutiques.

A la suite de dix années de collaboration et de cinq années de recherche à l'ERT du Pr B. Giumelli de la faculté de chirurgie dentaire de Nantes et le laboratoire « Parodontite et Maladies Générales» de M. Sixou (LU46) de Toulouse , l'intérêt de l'utilisation des prélèvements bactériens lors de la prise en charge des maladies parodontales sera présenté en fonction des objectifs thérapeutiques, définis dans le plan de santé publique de 2004 et déclarés axes prioritaires par l'Organisation Mondiale de la Santé.

1-Les maladies parodontales et les objectifs microbiologiques

Les maladies parodontales le plus souvent sont des maladies infectieuses (Socransky et al 1992), dont l'expression est liée à la susceptibilité du patient (schéma 1.1). Elles se développent selon la nature et la quantité de bactéries présentes en fonction de la capacité du patient à s'en défendre.

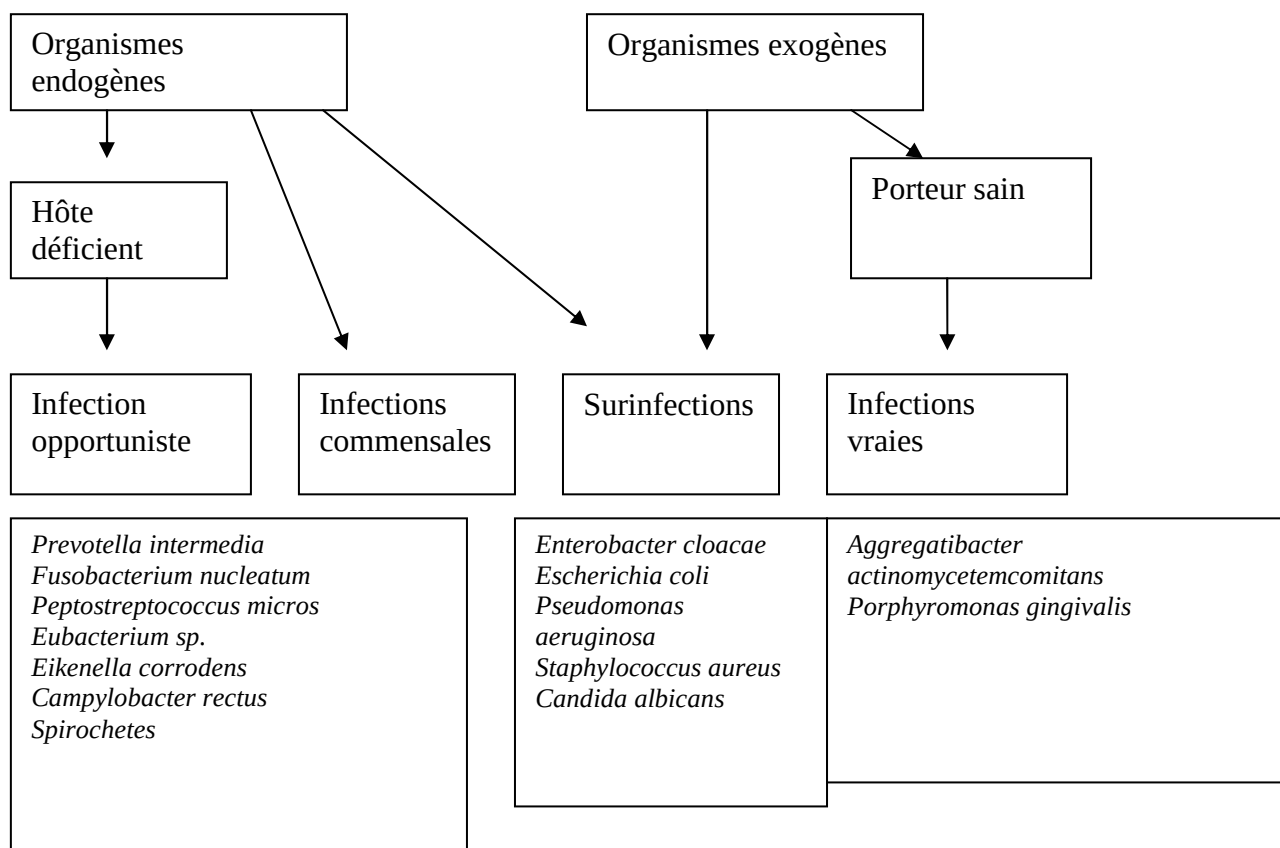


Schéma 1.1 : Les différents types d'infections bactériennes

Les bactéries isolées à partir de lésions parodontales sont en grandes parties responsables du développement de la maladie. La pathogénicité des bactéries est très variable selon les espèces. Aujourd'hui on peut dénombrer près de 400 espèces dans la cavité buccale (Moore et

al.1994, Listgarten et al. 1994), 150 peuvent être détectées et cultivées. Seules à ce jour une vingtaine sont incriminées lors de l'apparition des parodontopathies. Certaines ont la capacité d'adhésion et de colonisation des surfaces dentaires, puis préparent le terrain pour la colonisation d'autres micro-organismes plus virulents.

Les couches ainsi constituées créent le biofilm composé de micro-organismes, de macromolécules extracellulaires et des différents produits de son environnement (la salive, les constituants sulculaires). La structure complexe de ce biofilm (Schéma 1.2, Kolenbrander et al.2002) constitue une barrière physique contre les défenses de l'hôte et chimique par des produits comme le lysosyme, la lactoferrine et IgA ; qui interfèrent aussi sur les substances antimicrobiennes comme les bains de bouches et les antibiotiques en limitant leur efficacité.

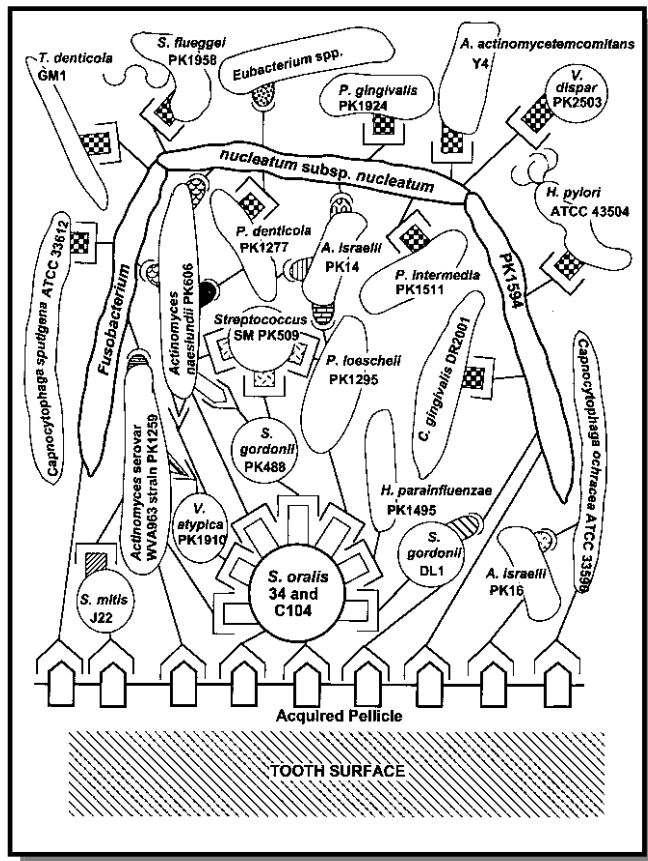


Schéma 1.2 : structure du biofilm d'après Kolenbrander et al. 2002

La présence de bactéries a été démontrée sur la surface radiculaire mais aussi à l'intérieur des tissus mous et dans les cellules épithéliales.

Les infections des micro-organismes sur les surfaces dentaires n'entraînent pas de réponse de ces tissus. Par contre, dans les tissus mous que constituent l'épithélium et le conjonctif gingival, les infections vont entraîner une réaction inflammatoire et une réponse immunitaire face à ces micro-organismes.

La pathogénicité (tableau 1.1) des bactéries va dépendre :

- de leurs capacités de colonisation de l'espace parodontal de l'hôte (adhésion et multiplication)
- des capacités de destruction directe ou indirecte des tissus (toxines, enzymes)
- de la modification des défenses de l'hôte.

La réaction inflammatoire, suite à une agression par la pénétration bactérienne, permet le passage des cellules de défense type polynucléaires neutrophiles, par l'élargissement et la perméabilité des espaces intercellulaires. Ces phénomènes entraînent la formation de la poche parodontale et la colonisation des tissus.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Norskov-Lauritsen et al.2006) et *Porphyromonas gingivalis* présentent une capacité de pénétration inter et intracellulaire importante. Ils sont retrouvés dans le conjonctif gingival, ce qui induit la nécessité de les éliminer par des moyens mécaniques et chimiques conjoints tel que surfaçage et antibiothérapie.

Les destructions tissulaires sont induites directement par les produits d'origine bactérienne développant un arsenal protéolytique (collagénase, hyaluronidase...) et par les réactions des médiateurs de l'inflammation avec une réponse spécifique ou non spécifique (macrophages, neutrophiles ou TNF, Interleukines, MMP...).

Porphyromonas gingivalis active le système de destruction de collagène tissulaire par ses collagénases. Il produit des acides gras très toxiques tels que le butyrate et le propionate qui augmente la perméabilité des muqueuses.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans possède dans ses facteurs de virulence à part des toxines et protéases puissantes, la capacité d'inhiber les fibroblastes, d'empêcher le renouvellement collagénique, de diminuer les défenses de l'hôte en diminuant le

chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et en créant un effet immunosuppresseur des lymphocytes (leucotoxines).

Très forte pathogénicité	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Forte pathogénicité	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Treponema denticola</i>
Pathogénicité reconnue	<i>Capnocytophaga</i> sp. <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Streptococcus intermedius</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Eubacterium</i> sp.

Tableau 1.1 : Présomption de pathogénicité en fonction des espèces
(Socransky et Haffajee 1992)

En 1998 Socransky et Haffajee nous proposent de classer les bactéries en fonction de leur potentiel pathogène dans des groupes appelés complexes (schéma 3). Les complexes rouge et jaune représentant les facteurs étiologiques bactériens de la plupart des maladies parodontales. Les autres groupes représentent les espèces qui vont adhérer initialement à la surface radiculaire, se multiplier, puis modifier l'environnement et permettre la colonisation secondaire et la co-agrégation des bactéries des complexes rouge et orange.

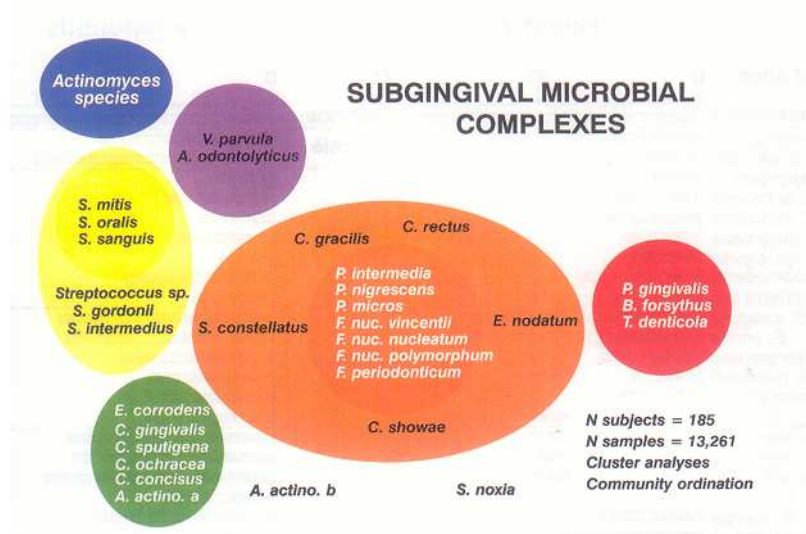


Schéma 1.3 : les complexes bactériens de la plaque de Socransky et al 1998

1-1 -Microbiologie dans les maladies parodontales :

La microbiologie de l'écosystème sous gingival varie considérablement d'un patient à l'autre (Loesche et al. 1994 ; Socransky et al., 1988 ; Van Winkelhoff et al. 1994). Elle est constituée d'organismes sous gingivaux : les bactéries, les levures et les virus. Les espèces bactériennes sont des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, anaérobies facultatives et strictes. Les résultats de la coloration des Gram et le caractère anaérobie de la microflore infectieuse parodontale constituent le premier critère de choix d'un traitement antimicrobien.

Les techniques de cultures ont montré que la flore est complexe, anaérobie, dominée par des micro-organismes à Gram négatif (schéma 1.3). Mais il est important de prendre en compte qu'il faut cibler autant que possible les pathogènes de façon à perturber le moins possible la flore commensale de la cavité buccale.

La prévalence des maladies parodontales est liée à la présence des espèces du complexe rouge (Socransky et al 1998). Mais il a été démontré que différentes entités cliniques parodontales peuvent être associées à différents profils microbiens (tableau 1.2). Certaines bactéries sous gingivales telles que *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) et *Porphyromonas gingivalis* (Pg) peuvent être présentes dans un parodonte sain et sont capables de provoquer des réactions antigènes/anticorps chez des sujets infectés, mais en faible proportion. Ces dernières sont considérées par Slots et van Winkelhoff (1993) comme des bactéries exogènes entraînant des infections vraies (schéma 1.1). Par contre, les infections parodontales par des micro-organismes endogènes sont alors appelées infections endogènes.

Espèces	Parodontites agressives localisées	Parodontites agressives	Parodontite chronique
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	+++	++	++
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	+/-	+++	+++
<i>Prevotella intermedia</i>	++	+++	+++
<i>Tannerella forsythia</i>	+/-	++	+++
<i>Peptostreptococcus micros</i>	+/-	++	+++
<i>Eubacterium sp.</i>	-	+	++
<i>Campylobacter rectus</i>	+	++	++
<i>Capnocytophaga sp.</i>	-	-	-

Tableau 1.2.: Espèces bactériennes associées aux différentes formes cliniques de maladies parodontales.

- (-) peu élevé en comparaison avec la santé parodontale
- (+/-) occasionnellement isolé
- (+) < 10% des patients positifs
- (++) < 50% des patients positifs
- (+++) > 50% des sujets positifs

Les classifications des maladies parodontales ont changé, cependant ce tableau nous confirme que les connaissances actuelles sont en avance sur le type de soins que l'on peut proposer à nos patients. Elles indiqueraient d'éliminer les espèces selon leur pathogénicité et leur répartition, plutôt que des types de maladies.

Les prélèvements bactériens sont le lien entre les connaissances biologiques et la thérapeutique anti-infectieuse.

En fonction des situations cliniques rencontrées, une classification des maladies parodontales a été proposée. Elle insiste sur la rapidité de l'évolution de la maladie et sur la susceptibilité des patients à cette maladie.

1-2 -Classification des parodontites

La classification abrégée selon Armitage 1999 (la classification n'est pas associée à des germes particuliers)

- Parodontite Chronique

 - généralisée

 - localisée

- Parodontite agressive

 - généralisée

 - localisée

- Parodontite liée à des désordres hématologiques

- Parodontite liée à des désordres génétiques

1-3 -La parodontite chronique :

La parodontite chronique est une inflammation parodontale chronique alternant des phases d'activité et de repos aboutissant à la formation de poches et de lyses osseuses. La destruction des tissus est induite par la pénétration des bactéries et leur arsenal enzymatique.

Les réactions de défense de l'hôte jouent un rôle important dans ce mécanisme de destruction.

L'alvéolyse est plus ou moins profonde en fonction de la sévérité de la maladie. La

susceptibilité du patient face à la parodontite, est aggravée par des facteurs de risque soit héréditaires ou acquis comme le stress, le tabagisme.

Lors des phases de destruction la flore bactérienne est polymorphe avec une dominante dans les formes sévères de :

Porphyromonas gingivalis

Treponema denticola

Tannerella forsythia

Fusobacterium nucleatum

Prevotella intermedia

1-4 -Les parodontites agressives :

Lors d'une parodontite agressive, le patient perd les tissus de soutien de ses dents : ligament, os, conjonctif ...très rapidement et peut en cinq ans atteindre une perte de dents spontanée.

Les patients sont souvent jeunes. Ils ne présentent pas beaucoup de plaque et peu de problèmes d'hygiène.

Ces formes de parodontites sont souvent évolutives très rapidement, avec des pathogènes en forte concentration dans les tissus péri-dentaires.

Les parodontites localisées se présentent chez l'adolescent sous forme d'alvéolyses importantes pouvant entraîner des mobilités ou des migrations au niveau des incisives et premières molaires. Les prélèvements bactériens montrent une forte prévalence de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Les parodontites agressives généralisées sont retrouvées chez le sujet adulte jeune de moins de 35 ans. Les pertes d'attache et les alvéolyses sont sévères pouvant entraîner des mobilités, des migrations dentaires. La flore sous gingivale retrouvée est polymorphe :

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Porphyromonas gingivalis

Treponema denticola

Tannerella forsythia

Fusobacterium nucleatum

Prevotella intermedia

Les bactéries recherchées lors des maladies parodontales seront principalement *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Tannerella forsythia* selon le world workshop de 1996 pour les formes les plus destructrice. Pour les autres seront recherchées *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella melaninogenica*, *Peptostreptococcus micros*, *Eubacterium spp.*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella nigrescens*, les spirochètes et incluant *Treponema denticola* et *Campylobacter rectus*.

Cependant les travaux de Haffajee et Socransky en 1994, montrent l'importance de la concentration des pathogènes par rapport au risque de développer une maladie parodontale. Pour *Porphyromonas gingivalis* si il est présent à plus de 10^6 dans le prélèvement, la perte

d'attache sera de 4,1mm dans les deux mois, pour 10^5 ce sera 2,2mm ; pour *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 4,3 mm pour 10^6 et 3,2 mm pour 10^5 .

Pour le complexe rouge (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) il a été trouvé avec des concentrations importantes soit une perte d'ancrage < 1,2mm dans 18% des cas pour le premier, 11% pour le second et 4% pour le troisième. Mais la répartition en bouche est primordiale en fonction du nombre de sites et de leur concentration (Teles et al.2006).

Les objectifs microbiologiques du traitement parodontal seront de diminuer le nombre de pathogènes et le nombre de sites pour avoir une grande majorité de bactéries compatibles avec la santé parodontale pour rétablir l'équilibre en fonction de la capacité de défense de l'hôte.

1-5 Effets des thérapies parodontales sur les bactéries sous gingivales

(Dahlen et al. 1996, Teles et al. 2006)

Le contrôle de plaque par brossage diminue l'inflammation et le flux du fluide gingival ce qui permet une diminution des substances nutritives pour les bactéries pathogènes. Il induit une réduction de la profondeur des poches, et du nombre de pathogènes jusqu'à 3mm de profondeur, pour les poches plus profondes > 6mm le contrôle de plaque n'est pas suffisant pour produire une réponse satisfaisante pour une santé parodontale (Sato 1993). Par contre le contrôle de plaque est indispensable pour la pérennité des thérapeutiques parodontales.

Le débridement d'après Drisko et al.(1996) est la thérapeutique de choix et supplante les surfaçages. Il consiste à enlever les dépôts microbiens des surfaces radiculaires en désorganisant mécaniquement et chimiquement le biofilm. Le traitement non chirurgical est souvent suffisant pour les parodontites les plus fréquemment rencontrées avec au niveau bactérien une réponse favorable pour la plus part des pathogènes selon l'équipe de Egelberg et Quirynen et al.(1999): *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*.

Haffajee (1997) a montré que sur 57 sujets, le traitement non chirurgical entraînait une réduction de pathogènes et notamment du complexe rouge, et une augmentation des bactéries saprophytes. Par contre *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Porphyromonas gingivalis* présentent des résultats fluctuant selon les auteurs à court terme et non significatifs

pour certains tels que l'équipe de Kinane (Darby et al. 2005), et Beikler et al (2004) suggèrent une recontamination en plus par des sites extra dentaires (joues, langue, amygdales...). Mais tous les auteurs s'accordent sur l'efficacité clinique (profondeur de poches) notamment sur les poches inférieures à 6mm, avec un suivi strict. Shiloah et Patters (1996) ont prouvé que 50% des sites traités avec succès, étaient recolonisés à un niveau important sans maintenance 1 ans après par *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, et *Prevotella intermedia*.

Le traitement chirurgical est utilisé pour réaliser des débridements avec un accès plus aisé, notamment sur les lésions inter radiculaires pour réduire la profondeur des poches, et restaurer un espace biologique compatible avec la santé parodontale.

Beaucoup d'études ont montré l'intérêt du traitement chirurgical sur la prévalence des bactéries pathogènes par rapport au débridement surtout pour les profondeurs supérieures à 5mm et sur le *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Mombelli (2000) a montré sur 12 mois que *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* étaient retrouvés moins fréquemment après chirurgie. Quand l'auteur trouve des pathogènes après chirurgie, la prévalence de *Porphyromonas gingivalis* est corrélée avec la présence de site résiduel profond > à 4mm, pour *Prevotella intermedia* elle est corrélée avec des saignements aux sondage selon une étude de 852 sites.

Par contre Tuan avec Nowzari et Slots (2000) ont montré qu'une plastie osseuse permettait de ne plus détecter *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Porphyromonas gingivalis* 6 mois après, que *Tannerella forsythia* était réduit à un très faible niveau et que, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* et *Campylobacter rectus* étaient supprimés.

Certaines bactéries seraient donc plus affectées par la chirurgie que par le traitement non chirurgical.

Les prélèvements bactériens auraient en plus de l'intérêt diagnostique une incidence sur les choix de la mise en œuvre de la thérapeutique chirurgicale ou non.

1-6 L'utilisation systémique des antibiotiques:

« L'antibiothérapie curative a pour but de raccourcir l'évènement clinique dans les situations d'infection bactérienne documentée ou non en accord avec les recommandations thérapeutiques » AFSSAPS, recommandation 2001.

L'utilisation des antibiotiques peut se faire sous deux formes dans les cabinets dentaires : une forme probabiliste ou une forme documentée. La forme probabiliste ne doit pas être réalisée en aveugle mais justifiée par le praticien devant une infection bactérienne et que l'antibiothérapie soit la plus adaptée aux bactéries supposées être impliquées. La prescription documentée sera réalisée après l'utilisation d'une technique pouvant apprécier la situation c'est-à-dire par un prélèvement bactérien et avec la réalisation d'un antibiogramme. Dans les cas des analyses moléculaires le praticien va se trouver dans une situation intermédiaire, avec un profil bactérien mais sans test de sensibilité, il sera donc intéressant de comparer les prescriptions en fonction des deux types d'analyse par culture ou par sondes moléculaires.

Haffajee et Socransky ont montré clairement en 2006 le bénéfice d'utiliser une antibiothérapie lors des traitements parodontaux sur le gain du niveau d'attache, ce qui confirme la méta analyse de Herrera et al. en 2002 particulièrement sur les poches profondes et les parodontites sévères.

En mars 2007 Haffajee et al. présentent les différences de résultats cliniques entre le surfaçage seul ou avec prescription de métronidazole ou d'azithromycine ou de doxycycline sous gingivale lors de parodontite chronique chez 92 patients. Les groupes ayant reçu une antibiothérapie sous une forme systémique ou locale, avaient des résultats significativement meilleurs en terme de gain d'attache et de réduction des profondeurs de poche par rapport au surfaçage seul. Cet article montre l'intérêt d'utiliser des antibiotiques sur des parodontites chroniques alors que la prescription d'antibiotiques est réservée aux parodontites sévères ou aux patients à risques systémiques selon les recommandations de bonnes pratiques de l'AFSSAPS 2001.

Mais les bactéries dans le biofilm sont plus résistantes car elles sont protégées par la structure. L'antibiothérapie n'est donc pas une solution sans débridement non chirurgical ou chirurgical du biofilm.

Quel antibiotique doit être utilisé et quand ? Pour y répondre le choix sera fait selon plusieurs critères orientés par la littérature à notre disposition en fonction des maladies diagnostiquées ou après prélèvement en fonction des bactéries pathogènes rencontrées.

1-6-1 Critères bactériologiques :

- Les bactéries impliquées
- La nature mono ou poly bactérienne de l'infection définira les spectres utilisés
- Le risque d'extension
- L'activité bactéricide (β lactamines) ou bactériostatique (tétracyclines, macrolides) en fonction de la qualité de réponse de l'hôte.

1-6-2 Critères pharmacologiques

La durée du traitement peut varier d'une prise unique (antibioprophylaxie) à 21 jours lors de parodontites agressives.

La classification du rapport juillet 2001 de recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, met en évidence trois types de patients. Un patient est considéré comme sain ou présumé sains et / ou sans risque de greffe bactérienne à distance, ne nécessitant pas des précautions particulières lors de son traitement parodontal. Un patient est déclaré comme patient à risque A, si il a une pathologie associée non équilibrée, évolutive ou en cours d'exploration (diabète, insuffisance rénale..), soit un sujet dénutris (éthylisme, toxicomane..) soit un sujet immunodéprimé. Un patient est déclaré à risque B si il est porteur d'une prothèse (valve cardiaque, prothèse de hanche..) ou si il est classé comme présentant un risque d'Endocardite Infectieuse.

Pour les patients à risque A et B, une antibioprophylaxie (tableau 1.3) sera prescrite une heure avant pour protéger le patient d'éventuelles bactériémies lors de la thérapeutique parodontale.

Prophylaxie standard	Amoxicilline : adulte 3g per os 1h avant enfant 50mg/kg
Allergie aux β -lactamines	Clindamycine adulte : 600mg 1h avant enfant : 15mg/kg Pristinamycine : adulte 1g 1h avant enfant : 25mg/kg

Tableau 1.3 : traitements prophylactiques lors de certains actes dentaires

La durée trop courte d'antibiothérapie sélectionne l'émergence de souches multi résistantes et l'utilisation trop longue peut induire des pathologies digestives. La durée ne doit pas être inférieure à 7 jours sauf pour les macrolides à demi-vie plasmatique longue pouvant aller jusqu'à 20 heures pour l'azithromycine (tableau 4).

Antibiotiques	Demi-vie plasmatique	Catégorie
Pénicilline G	< 1 heure	< 1 heure
céphalosporine		
Acide clavulanique		
Ampicilline	1 heure	Demi-vie très courte 1-2 heures
Amoxicilline	1,5 heure	
Erythromycine	2 heures	
Josamycine	2 heures	
Clindamycine	3 heures	DV courte 2-3 heures
Clarithromycine	3 à 4 heures	3-5 heures
Lincomycine	4 à 5 heures	
Spiramycine	7 heures	5-7 heures
Tétracycline	8 à 10 heures	7-15 heures
Métronidazole	8 heures	
Ornidazole	12 à 14 heures	
Tinidazole	12 à 14 heures	
Doxycycline	16 à 22 heures	15-22 heures
Minocycline	18 heures	
Azithromycine	20 heures	
Téicoplanine	> 30 heures	> 24 heures
Méfloquine	15 à 20 jours	> 7 jours
Clofazimine	70 jours	

Tableau 1.4 : Différents antibiotiques utilisés en fonction de leur demi-vie plasmatique

La dose de l'antibiotique a été souvent insuffisante en dentaire, ce qui explique certains échecs liés à des utilisations de concentrations subinhibitrices. Les recommandations de l'AFSSAPS pour chaque molécule sont donc à suivre pour s'assurer de l'efficacité.

Les associations de deux molécules peuvent être justifiées par la gravité d'une infection et par la difficulté de distribution tissulaire du principe actif ou pour la recherche d'une synergie. Mais les pathologies buccales nécessitent très rarement une association. Une monothérapie de première intention est fortement recommandée (AFSSAPS 2001).

1-6-3 Les critères pharmacocinétiques

L'absorption par le tube digestif, la demi-vie et l'élimination par les voies biliaire, fécale ou urinaire vont permettre d'orienter le choix de la molécule en fonction des patients. De plus certains paramètres comme la distribution peuvent être intéressants en fonction des organes ciblés.

1-6-4 Les molécules (Sixou 2005)

Les principales familles utilisées en odontologie sont au nombre de cinq : les β -lactamines, les macrolides, les macrolides apparentés, les tétracyclines et les imidazoles.

1-6-4-1 Les bêta-lactamines :

Elles sont les plus souvent utilisées en première intention, en odontologie, notamment en ce qui concerne l'amoxicilline et l'ampicilline. Elles ont un spectre incluant les cocci à Gram positif, et négatif, les bacilles à Gram positif, les anaérobies à Gram positif et *Fusobacterium nucleatum*, les spirochètes, *Porphyromonas* sp. et *Prevotella* sp de façon variable. Il est constaté une augmentation des résistances vis-à-vis des anaérobies ; les aminopénicillines sélectionnent les bactéries productrices de β -lactamases, enzymes capables de les dégrader par hydrolyse. C'est pourquoi peut être utilisé un inhibiteur de ces enzymes, l'acide clavulanique. Ces molécules présentent une bonne diffusion tissulaire et leur mode d'action est bactéricide. La synthèse de peptidoglycanes de la membrane plasmique bactérienne est inhibée. La posologie pour un adulte de 70kg est de 2g/jour en trois prises car la demie vie est d'environ une heure pendant au minimum 7 jours, il n'y a pas de consensus sur la durée.

1-6-4-2 Les macrolides :

Les macrolides ne sont pas des antibiotiques de premier choix pour traiter les maladies parodontales car le spectre d'activité est efficace sur les bactéries à Gram positif aéro-anaérobies, ils sont peu ou pas actifs sur les bactéries impliquées dans les maladies parodontales c'est-à-dire les bactéries Gram négatifs. De plus ils présentent de nombreuses interactions avec des médicaments. Le mode d'action est bactériostatique sur la plupart de ces cibles, grâce à une interférence de la synthèse des protéines bactériennes en se fixant sur la sous unité 50S des ribosomes.

Par contre des molécules plus récentes comme l'azithromycine auraient des propriétés pharmacologiques pouvant les rendre plus attractives notamment par une résistance au pH gastrique, par une demi-vie de 20h, et une posologie de 500 mg/j en 1 prise pendant 3 jours.

Ces avantages peuvent susciter un nouvel intérêt pour cette molécule. C'est pourquoi une étude est réalisée lors de ce travail pour comparer l'azithromycine par rapport aux autres macrolides in vitro.

1-6-4-3 Les macrolides apparentés :

Le mode d'action est très proche des macrolides mais avec un spectre d'activité élargi. On retrouve les lincosamides (clindamycine et lincomycine) et les streptogramines (pristinamycine).

Pour les lincosamides et notamment la clindamycine le spectre d'action est élargi aux cocci et bacilles à Gram positif et anaérobies à Gram positif et négatifs. Mais même si ce spectre est adapté aux infections parodontales, ils ne sont pas des molécules de choix compte tenu des problèmes digestifs rencontrés, pouvant engendrer des colites pseudo-membraneuses graves.

Pour les streptogramines (pristinamycine) l'action semble meilleure que les macrolides sur les bactéries anaérobies mais avec un mode de fonctionnement très proche (sous unité 50s ribosomale), peu de résistances bactériennes ont été décrites. Ce sera donc un antibiotique de choix en cas d'allergie aux β -lactamines, en prophylaxie ou en antibiothérapie. La posologie est la même que pour le β -lactamines : 2g/j chez un adulte de 70kg en deux à trois prises.

Les macrolides et apparentés seront donc utilisés en deuxième intention ou en cas d'allergie à la β -lactamines.

1-6-4-6 Les imidazoles :

Les nitro-imidazolés sont très présents dans les prescriptions odontologiques et notamment le métronidazole. Il a une action bactéricide sur les bactéries anaérobies strictes, par la production de radicaux libres par des nitro-réductases, toxiques pour l'ADN bactérien. Cet antibiotique semble attractif pour le traitement des affections parodontales si on se réfère à la littérature. Teles et al.(2006), Loesche et al. (1984) et avant Lindhe et al.(1983) ont trouvé une réduction plus efficace de pathogènes parodontaux du complexe rouge et orange avec le

métronidazole utilisé en thérapeutique de soutien. Cependant les équipes espagnoles de Sanz depuis quelques années trouvent des sensibilités différentes à cet antibiotique. C'est pourquoi nous réaliserons une étude sur les sensibilités de cet antibiotique par rapport aux autres molécules sur les pathogènes parodontales.

Le spectre d'action est réservé aux bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroides sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Prevotella sp.*, mais pas pour les micro-anaérophiles et les capnophiles comme les *Aggregatibacter sp.*, *Eikenella sp.*.

La posologie pour un adulte de 70kg est de 1,5g/jour en trois prises.

1-6-4-7 Les tétracyclines

Les tétracyclines sont des molécules très étudiées et utilisées notamment aux Etats-Unis. La deuxième génération de ces molécules a fait apparaître la doxycycline et la minocycline qui ont augmenté l'efficacité et diminué les effets secondaires.

Ces molécules sont bactériostatiques en inhibant la synthèse de protéines bactériennes en bloquant la sous unité 30S ribosomale. Elles ont un spectre de moins en moins large compte tenu des résistances mais très sélectif et efficace sur les *Aggregatibacter sp.* Cette spécificité nous ouvre une opportunité très précieuse pour ces bactéries notamment dans des pathologies agressives. Compte tenu d'une demi-vie de 20h, la posologie recommandée pour les parodontites agressives localisées par l'AFSSAPS est de 200mg/j pendant 15 à 21 jours.

Certains auteurs comme van Winkelhoff (1996) préconise l'utilisation de deux antibiotiques tels que l'amoxicilline avec ou non l'acide clavulanique en association avec le métronidazole pour avoir un spectre d'action très large intéressant toutes les bactéries parodonto-pathogènes. Les recommandations de l'AFSSAPS de 2001 à ce sujet sont très claires, la monothérapie est la règle de prescription, d'autant plus en première intention.

On pourra retenir un schéma qui nous permet de restreindre l'antibiothérapie probabiliste en fonction des pathogènes supposés être présents (Schéma 4).

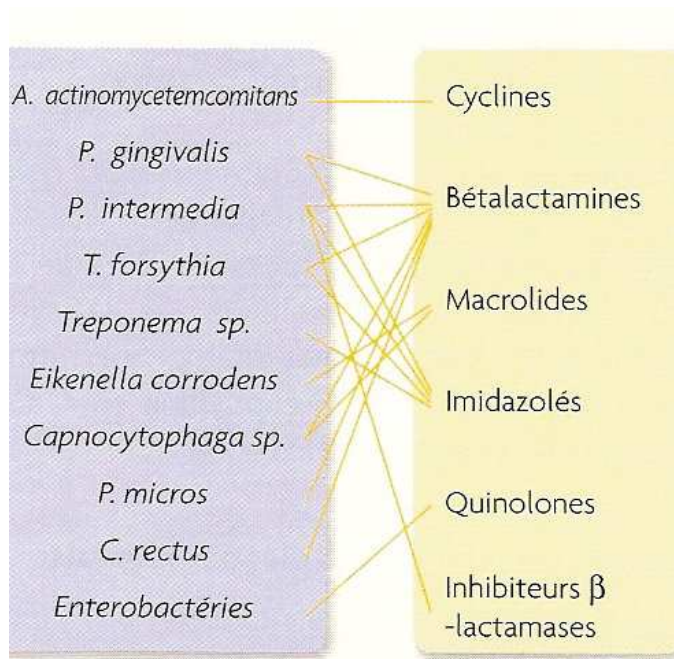


Schéma 1.4 : Quel antibiotique pour quel pathogène ? Sixou 2005

1-7 Parodontites et maladies systémiques

En plus des préjudices dus à la maladie et au traitement sur le parodonte, les infections localisées et de grande surface, ont aussi des répercussions systémiques par greffes bactériennes à distance (schéma 1.5), et des variations sur le métabolisme (immunité...).

Par exemple le diabète est un facteur de risque pour le développement d'une parodontite, mais le contrôle de l'infection parodontale peut améliorer celui du diabète.

La méta analyse réalisée par JN. Vergnes et M. Sixou 2007, sur 17 articles retenus avec 7151 sujets, met en évidence une probable association entre la maladie parodontale et les naissances prématurées et/ou les petits poids des nouveaux nés.

De même les maladies parodontales représentent un facteur de risque potentiel des maladies ischémiques coronariennes et plus particulièrement de l'infarctus du myocarde. Par contre le traitement des maladies parodontales pourrait être susceptible de diminuer l'incidence des cardiopathies ischémiques.

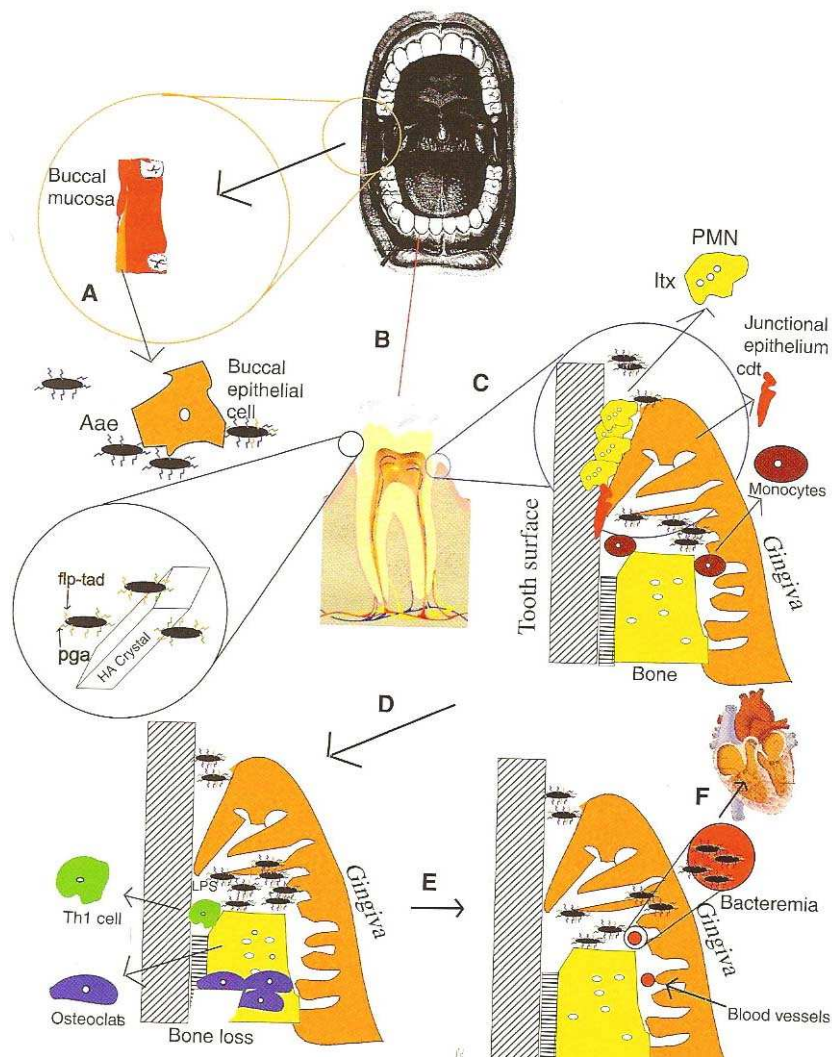


Schéma 1.5 : Illustration par séquence des évènements liés à l'infection par *Aa* sur les tissus parodontaux et le risque de cardiopathies (Fine et al 2006)

Quand un patient est atteint de parodontite agressive, des antibiotiques et antiseptiques sont utilisés sur la base des connaissances scientifiques et des données cliniques. Or une poche parodontale est un site, un écosystème à part entière, différent sur une même dent, d'une dent à une autre, d'un patient à un autre pour une même maladie.

C'est pourquoi nous réalisons des prélèvements bactériens dans les poches parodontales :

- pour connaître les espèces pathogènes existantes (Listgarten et al.1992)
- pour connaître leur réaction face aux antibiotiques (antibiogramme)
- pour prescrire une antibiothérapie si elle est nécessaire
- pour cibler l'antibiothérapie afin de ne pas détruire les bactéries commensales et de ne pas créer de résistance où un autre déséquilibre de la flore.

Or le choix des sites de prélèvement reste pour le praticien aléatoire, ainsi que le choix du mode de prélèvement.

Ces choix aléatoires orientent dès le prélèvement, le résultat de l'examen microbiologique.

Pour améliorer l'efficacité dans le protocole de soins, une étude est réalisée pour vérifier si le mode de prélèvement en pool est utilisable ou si le prélèvement site par site est nécessaire.

2-Etude des prélèvements de flores bactériennes anaérobies par site ou par pool.

2-1 Introduction :

Les maladies parodontales sont des maladies infectieuses opportunistes, sur des hôtes susceptibles. Lors d'une parodontite agressive, le patient perd les tissus de soutien de ses dents pouvant aller jusqu'à la perte spontanée de dents. Ces infections localisées ou de grande étendue ont aussi des répercussions systémiques par des mécanismes encore mal connus.

Quand un patient est atteint de parodontite agressive, des antibiotiques et des antiseptiques sont utilisés sur les bases des connaissances scientifiques et cliniques. Dans la plupart des cas, la gestion de la maladie est traitée dans son ensemble, on parlera de maladie de bouche. Or une poche parodontale est un site, un écosystème spécifique, avec des variations sur une même dent et d'une dent à une autre, d'un patient à un autre pour une même maladie. Peut on parler dès lors de maladie de site ?

Le choix des sites de prélèvement reste pour le clinicien aléatoire, ainsi que le choix du mode de prélèvement. Les sites choisis sont le plus souvent les sites qui semblent les plus actifs par la présence d'une poche profonde, par un saignement au sondage. Personne sauf à titre expérimental ne prélève tous les sites.

Cette étude réalisée grâce au soutien de la Direction des Affaires Médicales de la Stratégie et de la Recherche de l'hôpital de Nantes, a pour objectif de comparer deux modes de transport de prélèvement bactériologique pour une même méthode d'analyse par culture. Elle permet d'évaluer quantitativement et qualitativement la flore sous gingivale des sites prélevés, chez les patients atteints de parodontite agressive en comparant deux méthodes de collecte des prélèvements bactériens en pool, ou site par site. En pool, nous plaçons les prélèvements des différents sites dans un même milieu de transport. En site par site, chaque site a son milieu de transport.

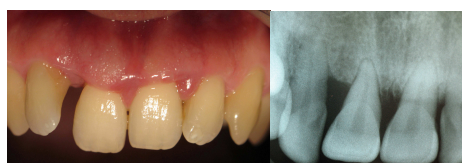


Photo 2.1 : Parodontite agressive (patiente de 26 ans).

2-2- Matériels et méthodes :

2.2.1- Populations étudiées :

Cette étude est réalisée sur 30 patients. Elle est descriptive, comparative, chaque patient étant son propre témoin (chez un même patient entre les prélèvements par pool et par site de ses trois mêmes poches parodontales actives).

Lors de l'examen du protocole par la DRCC de Nantes, notre recherche a été classée hors du champ de la loi HURIET- SERUSCLAT du 20 décembre 1988.

Dans chaque prélèvement seront recherchées les principales bactéries impliquées dans l'étiopathogénie des parodontites. Chaque espèce identifiée sera quantifiée.

Trois sites actifs sont choisis selon les critères cliniques et radiologiques déterminant habituellement l'activité (poche de 5 mm, œdème, saignement au sondage...) (Slots 1986).

2.2.2- Critères d'inclusions :

-Les patients se présentant en consultation avec un diagnostic de parodontite agressive avec des poches de 5mm confirmées à l'examen clinique et radiologique, habituellement réalisé.

-Les patients ayant accepté de participer au protocole étaient tous âgés de 18 à 65 ans.

2.2.3- Critères de non inclusion

-patients ayant subi un traitement antibiotique ou parodontal depuis moins de six mois (qui pourrait fausser les antibiogrammes).

-patients n'ayant pas trois sites distincts en activité.

2.2.4- Protocole :

Les prélèvements ont été traités selon la méthode d'identification de Slots 1986. Deux cônes de papier fin stériles type MYNOL ® Regular Style- Fine sont insérés, maintenus à l'aide de précelles stériles dans chaque site pendant 20s. Un cône ira dans un milieu de transport commun avec les autres sites, et l'autre, prélevé en même temps et au même endroit, dans un milieu de transport spécifique pour chaque site. Le milieu de transport doit pouvoir protéger

les bactéries anaérobies de la toxicité de l'oxygène et de la dessiccation, éviter la multiplication des bactéries tout en permettant leur survie.

Le milieu de transport choisi et utilisé est constitué de 2ml de VGMA III (Möller 1966 modifié par Slots en 1986).

C'est un milieu semi gélifié, pré réduit, contenant des facteurs nutritionnels et des agents inhibiteurs de croissance :

0,5g de bacto-agar (bioMerieux), 225ml d'eau distillée, 12,5g de gélatine (Sigma), 0,125g de tryptose (Sigma), 0,125g de bio-thone (bioMerieux), 125µl/l d'acide thioglycolique (Sigma), 10 gouttes/l de NaOH 1N pH 7 (Sigma), 0,125 g de cystéine délayée dans 2ml d'H₂O (Sigma) 25ml de solution saline IV, contenant :

0,03g/l d'acide phenylmercurique (Sigma), 0,24g/l de CaCl₂H₂O (Sigma), 0,42 g/l KCl (Sigma), 0,1g/l de MgSO₄7H₂O (Sigma), 10g/l de glycérophosphate de sodium (Sigma), 0,002 g/l de bleu de méthylène (Sigma).



Photo 2.2 : Flacon de transport

Le milieu est réparti sous hotte à flux laminaire (Techgen® International, Italia) dans les flacons en verre stériles de 2ml (Wheaton® New Jersey, USA). Ces flacons contiennent 7 billes de verre de 2mm de diamètre (PGC Scientifics® Maryland, USA) nécessaire à l'homogénéisation du milieu.

Pendant 48 h, les prélèvements sont conservés à l'abri de l'air sans problème de perte, ni pour les espèces capnophiles, ni pour les anaérobies (Sixou 1991).

Si une fois transportés, l'analyse des prélèvements au laboratoire de Toulouse montre plus de 10⁵ bactéries par ml, les prélèvements sont déclarés significatifs ; les bactéries seront cultivées, puis reconnues et mises en culture sur un test de sensibilité aux antibiotiques.

Le seuil significatif de présence et de pathogénicité des tests, est le seuil bactérien de 10³ par ml.

L'analyse de la présence des bactéries se fait grâce à la technique de Slots (1986) modifiée par Sixou (1991) sur des milieux de cultures spécifiques et non spécifiques.

Nous ferons une analyse descriptive et comparative du nombre de bactéries sur un même site des résultats séparés en site par site ou regroupés en pool, puis nous évaluerons sur un antibiogramme les réactions des différentes souches cultivées selon le diamètre d'inhibition calculé autour de disques de papier imbibé d'antibiotique.

Les phases de laboratoires amenant à l'identification des bactéries sont :

- La dispersion de l'échantillon
- La dilution
- La mise en culture
- L'incubation
- L'identification

2.2.4.1- La dispersion de l'échantillon :

La dispersion doit être efficace mais aussi doit conserver la vitalité des bactéries présentes dans l'échantillon.

Le flacon de transport est réchauffé à sec à 37°C pendant 15mn (Bioblock) pour liquéfier le milieu de transport



Photo 2.3 : Bioblock

Les prélèvements sont homogénéisés grâce à un vortex (Topmix Heidolph) à puissance maximale pendant une minute.



Photo 2.4 : Vortex

2.2.4.2- La dilution :

Le prélèvement d'un patient atteint de maladie parodontale peut présenter 10^7 à 10^9 bactéries /ml. La dilution va permettre de réaliser la culture primaire avec une densité moins importante et donc analysable.

Les prélèvements après être homogénéisés sont placés dans un tube stérile avec 900µl de bouillon WILKINS-CHALGREN pour 100µl à l'aide d'une pipette automatique.

Nous obtiendrons 1ml de solution à concentration 10^{-1} . La manipulation est renouvelée pour 10^{-2} , puis 10^{-3} et ainsi de suites (schéma 4).

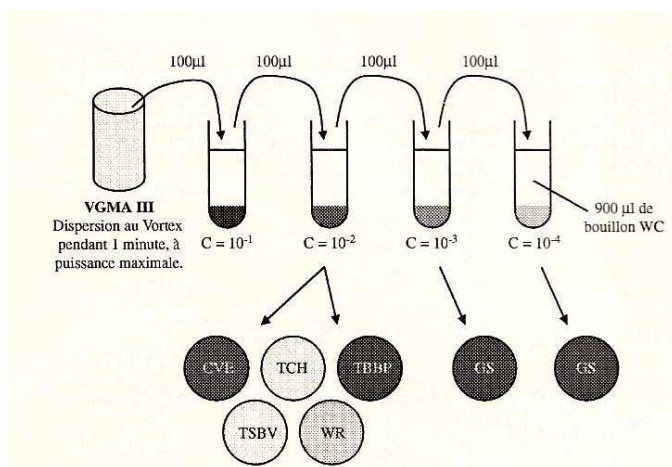


Schéma 4 : protocole de dilution et mise en culture.



Pour le protocole de Slots 1986, nous utilisons des concentrations à 10^{-2} pour permettre la croissance spécifique de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga sp.*, *Eikenella corrodens* et *Fusobacterium nucleatum*.

Nous utiliserons les solutions 10^{-3} puis 10^{-4} ensemencées par étalement sur des géloses au sang non spécifique ; ceci nous permettra de réaliser un dénombrement globale, et des *Bacteroides*

- à pigment noir :
 - *Prevotella intermedia*
 - *Porphyromonas gingivalis*
- bactéroïdes non pigmentés : *Tannerella forsythia*.

2.2.4.3- La mise en culture :

Les dilutions étant réalisées, 100µl sontensemencés sur un milieu de culture gélosé.

La mise en culture est réalisée sur des géloses spécifiques et non spécifiques pour une espèce bactérienne donnée.

Photo 2.5 : ensemencement sur milieu gélosé



2.2.4.3.1- Milieu non spécifique:

Ce milieu est réalisé pour la culture de *Prevotella intermedia* et *Porphyromonas gingivalis* (Holdman 1977)

Des géloses au sang sont réalisées à partir de 40g/l de tryptocaséine-soja (BioMerieux), 1g/l d'extraits de levure (Diagnostics Pasteur). Le pH est ajusté à 7.2. Puis passage à l'autoclave pendant 20 mn à 120°. Refroidissement à 56°. Ajout de 5% de sang de mouton stérile (Diagnostics pasteur), 0,4% d'hémine (Sigma), 0,0002% de ménadione (Menadione Sodium Bisulfite, Sigma). Les milieux sont répartis en boîte de Pétri.

Une fois étalé le milieu est placé sous la hotte avec la boîte légèrement ouverte pour éviter la condensation, puis une fois refroidi il est placé au réfrigérateur (on peut le conserver 3 semaines).

2.2.4.3.2- Milieu spécifique adapté aux souches recherchées:

Pour *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:

Préparation milieu TSBV (Slots 1982)180ml : 40g/l tryptocaséine de soja, 1g/l extraits de levure. Le pH est à 7.2, la solution est autoclavée à 120° pendant 20mn, puis refroidi à 56°C, est ajouté 10% de sérum de cheval stérile, et un mélange de 75µg/l de bacitracine (Sigma) et 5µg/l de vancomycine (Sigma).

Pour *Capnocytophaga* sp.

Préparation milieu TBBP (Mashimoo 1983) : 40g/l tryptocaséine de soja, 1g/l extrait de levure. Après refroidissement à 56 °, on ajoute 5% de sang de mouton, 5% de bacitracine (Sigma) et 10% de polymyxine B sulfate (Sigma)

Pour *Eikenella corrodens*

Préparation de milieu TCH (Slee 1979) : 30g/l de bouillon Todd-Hewittt, 14g/l d'agar. Après passage à l'autoclavage on ajoute 2mg/ml de nitrate de potassium (Sigma), 5% d'hémine (Sigma) et 5% de clindamycine (Sigma).

Pour *Campylobacter rectus*

Préparation du milieu WR (Hammond 1988) 200ml : 0,4g Na formate (Sigma), 0,6g de Na fumarate (Sigma), 2g de levure, 10,4g Bouillon coeur cerveau (Biomérieux), 0,6g de Na thiosulfate, 0,05g sulfate de Fer, 3g agar. Puis est rajouté:

2ml d'hémine (diluée avec quelques gouttes de NaOH), 40ml ménadione, 72µl de vancomycine.

Pour *Fusobacterium nucleatum*

Préparation de milieu CVE 200ml (Walker 1979). Dans de l'eau distillée stérile 1% de bio potasse (bioMerieux), 0,02% tryptophane (Sgima), 1,5% d'agar, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% de Chlorure de sodium, 0,2% de glucose. Après passage à l'autoclave à 120° pendant 20mn puis refroidi à 56°C. On y ajoute 5% de sang de mouton, 4µl /ml d'érythromycine et 5µl/ml de cristal violet.

La préparation des boîtes de géloses se fait sous les hottes à flux laminaire, la gélose se solidifie à température ambiante puis est stockée à 4°C et séchée 24 heures avant ensemencement.

2.2.4.4- Incubation :

L'incubation des préparations est réalisée pendant 5 jours à 37°C dans des jarres d'anaérobiose (80% de N₂, 10% CO₂, 10% H₂) contrôlées par des bandelettes de bleu de méthylène virant au blanc en absence d'oxygène.

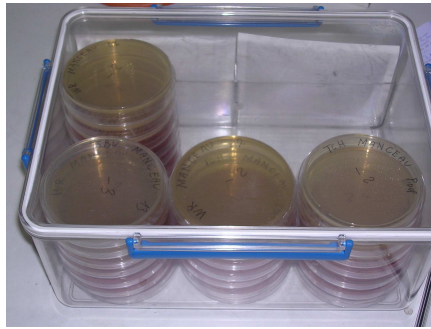


Photo 2.6 .1 : Jarres d'anaérobiose



Photo 2.6.2 : Station d'anaérobiose :

Identification des bactéries :

Les CFU peuvent se différencier par leur aspect et par leur réaction spécifique à des substrats (tests enzymatiques ou biochimiques).

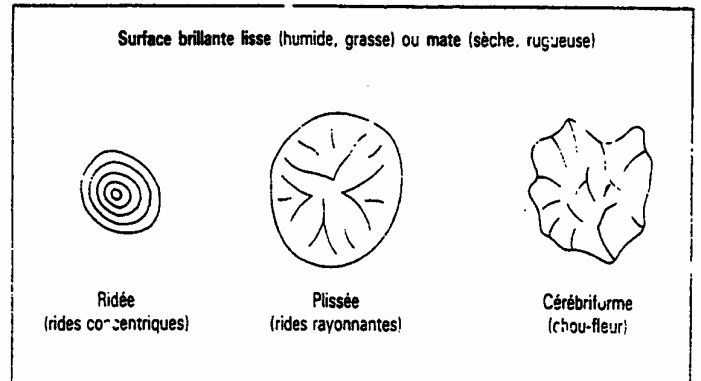
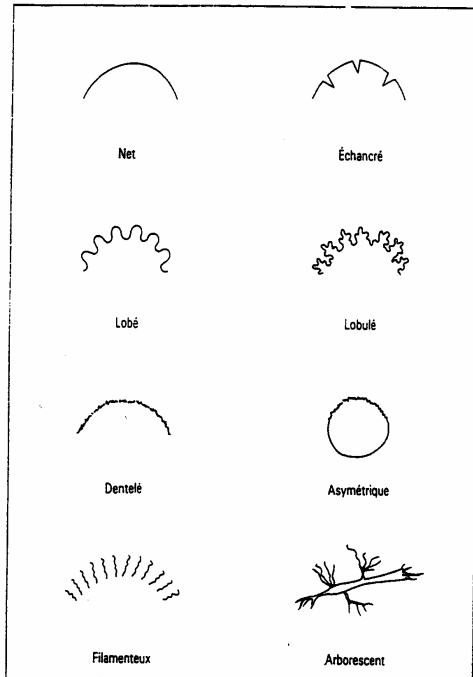
Aspect :

Les bactéries structurées en CFU sur les milieux de cultures se caractérisent tout d'abord par la forme, la surface, la consistance, la couleur et la transmission de la lumière. Cette différenciation peut tout d'abord se faire :

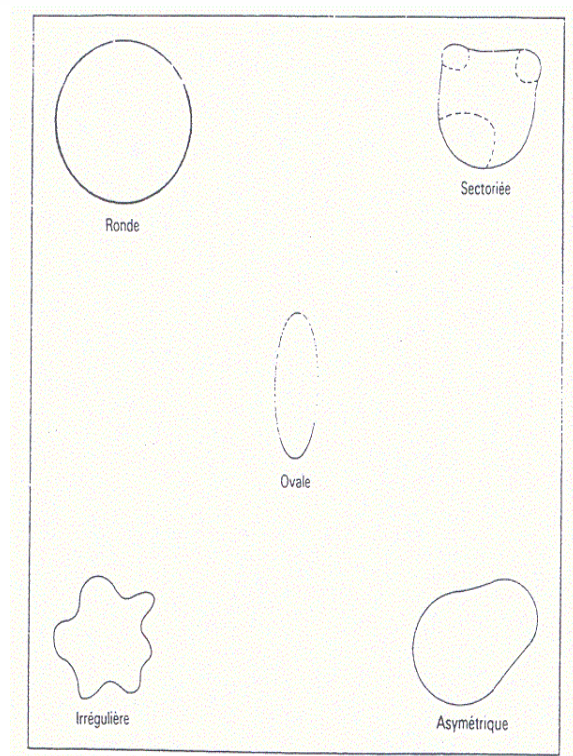
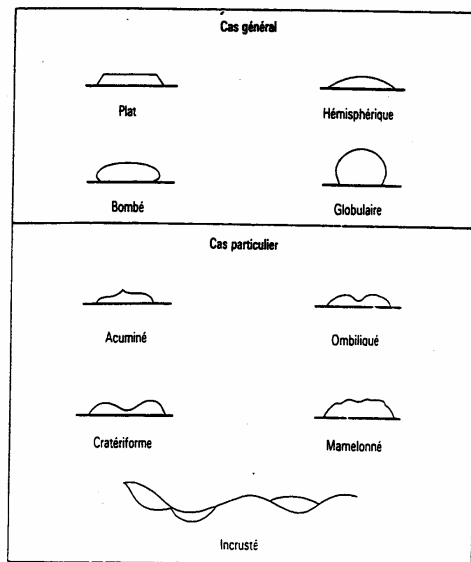


- à l'œil nu, puis a la loupe binoculaire : Photo 2.7

- Contour :

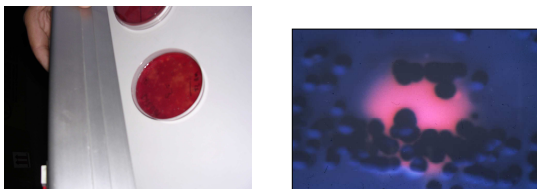


-Relief:



- sous lumière ultraviolette ($\lambda=366\text{nm}$)

Photos 2.7



- sous microscope à immersion pour voir la mobilité de certaine espèces.

- par la coloration de Gram et test KOH :

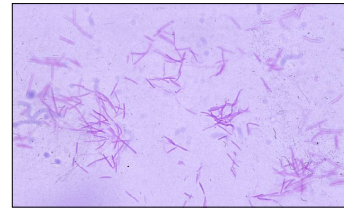


Photo 2.8 : *Fusobacterium nucleatum* en coloration de Gram.

- Le test Gram permet de différencier les microorganismes en deux catégories d'après les composants du cells-coat des bactéries, soit en rose pour les Gram négatifs, soit en violet pour les Gram positifs.
- Le test KOH permet de confirmer le test de Gram quand celui ci est difficile à différencier. Le test permet de mettre en évidence un aspect sirupeux ou visqueux à l'anse pour les Gram négatifs après ajout d'une à deux gouttes de KOH à 3% et fluide pour les Gram positifs.

Les tests enzymatiques :

La catalase : sa présence est mise en évidence grâce à une solution d'eau oxygénée, placée sur les colonies. Un dégagement de bulles visionné par microscope binoculaire donne une réponse positive.

Les oxydases : La présence d'oxydase, comme pour *Eikenella corrodens* est révélée par une coloration bleue violet d'un papier imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine (Photo 2.9).



Photo 2.9 :

MUG : Ce test permet de mettre en évidence la fermentation du lactose par la β -galactosidase bactérienne. Le 4-methylumbelliferone, produit de dégradation d'un substrat fluorogénique, le 4-Methyl Umbelliferyl β -DGalactopyranoside 5MUG) par la β - galatosidase est détecté par sa fluorescence sous lumière ultra-violette(366nm).

Indole : La production d'indole par certaines espèces bactérienne est mise en évidence en faisant réagir, sur une plaque de verre, une UFC avec une goutte de dimethyleaminocinnamaldéhyde.

2.2.4.5- Identification des bactéries

L'Aggregatibacter actinomycetemcomitans

C'est un coccobacille à Gram négatif, capnophile, non mobile, adhérent fortement à la gélose, translucide, non fluorescent. Son organisation se fait en deux types :

- Petites colonies de 0.5mm bombées, lisses, brillantes irrégulières.
- Colonie de 0.5-1mm de diamètre à surface rugueuse, aux contours irréguliers, en forme de grain de sable, avec une structure étoilée centrale.

Tests biochimiques : Catalase positif, oxydase négatif, indole négatif, MUG négatif

Capnocytophaga sp.

Bacilles à Gram négatif, capnophile.

Aspect : deux types de colonies :

2-5mm de diamètre rose ou jaune-orangé, étalées à bords irréguliers

1-2mm bombées, brillantes translucides ou pigmentées rose/ jaune/ blanc.

Grasses, glisses sur la gélose

Tests biochimiques : Catalase négatif, oxydase négatif, indole négatif (MASHIMO et coll., 1980)

Eikenella corrodens :

Bacille à Gram négatif

Aspect : colonies étendues de 2-4mm en gagnant 1mm par jour. Comme un œuf au plat, contour irrégulier rugueuses, odeur de chlore.

Tests biochimiques : Catalase négatif, oxydase positif, indole négatif (SLEE et TANZER, 1978).

Fusobactérium nucléatum :

Long bacille, Gram -, anaérobie strict.

Aspect sur la gélose : colonie de 2-4mm, bleues violacées, mouchetées, bords irréguliers, grasses avec production d'un suintement de gélatinase.

Tests biochimiques : Catalase négatif, oxydase négatif, indole positif.

Porphyromonas gingivalis :

Bacille petite taille à Gram négatif, anaérobie strict, asaccharolytique, non sporulé et immobile.

Aspect : colonie de 1-3mm, rondes, crémeuses, bords irréguliers, lisses, hémolytiques, hydrophobes, marron, se pigmente au bout de 4-5 jours sur la gélose au sang, pas de fluorescence

Tests biochimiques : Catalase négatif, oxydase négatif, MUG négatif.

Prevotella intermedia :

Bacille à Gram négatif Anaérobie strict, saccharolytique, non sporulé non mobile.

Aspect : Colonies 1-4mm, lisses, bombées à bords irrégulier, hydrophobe, non hémolytiques, beige foncé, opaques, coloration noire après 4-5 jours dans la gélose au sang. Fluorescence rouge brique à la lumière UV ($\lambda=366\text{nm}$).

Tannerella forsythia :

Bacille fusiforme à Gram négatif, anaérobie strict, non sporulé, non mobile, asaccharolytique.

Aspect : colonies de rondes, jaunâtres, jaune sous la lumière UV ($\lambda=366\text{nm}$).

Tests biochimiques : Catalase négatif, trypsine-like positif, oxydase négatif, indole négatif, MUG négatif.

2.2.4.6 – tests de sensibilité aux antibiotiques :

Le DDS- test (méthode de Kirby- Bauer modifié pour les bactéries anaérobies) est un test par diffusion en milieu gélosé. Il consiste à placer des disques stériles en papier (Sanofi® Diagnostics Pasteur) contenant une concentration déterminée d'un antibiotique. Ces disques pré chargés sont disposés sur la surface de la gélose préalablement ensemencée par l'inoculum bactérien à étudier. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition en millimètres est mesuré. La résistance correspond à une culture des souches ayant un diamètre d'inhibition inférieur à 10mm par rapport au disque. La résistance intermédiaire correspondant aux diamètres intermédiaires d'inhibition sur la gélose c'est-à-dire un diamètre entre 10 et 15mm autour du disque antibiotique sans culture. La sensibilité des bactéries à un antibiotique est donc mesurée par une culture à une distance supérieure à 15mm depuis le disque d'antibiotique.

9 antibiotiques ont été testés :

Pénicilline (Pen), ampicilline (Amp), amoxicilline (Amox), céfalosporine (Cefa), tétracycline (Tétra), doxycycline (Doxy), minocycline (Mino), spiramycine (Spir), métronidazole (Métro).

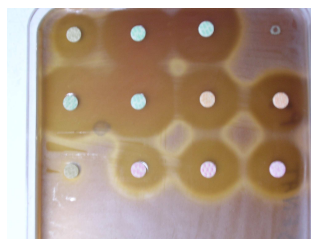


Photo 2.10 : Antibiogramme

In fine, l'intérêt thérapeutique découlant de cette étude, est de pouvoir choisir un antibiotique mieux ciblé et adapté aux souches rencontrées. Si l'analyse site par site nous permet de mettre en évidence plus de souches pathogènes, les antibiogrammes nous permettront de choisir un antibiotique, si nécessaire, le plus adapté, le mieux ciblé et le moins iatrogène.

2-3- Résultats :

Nous avons réalisé 120 prélèvements sur 30 patients différents. 113 ont pu être exploités totalement. Une série de prélèvements complets d'un patient a été égarée lors de l'acheminement, ce qui représente 4 prélèvements (trois sites et un pool). Un autre patient a eu trois milieux de transport des sites spécifiques brisés au cours de l'acheminement postal. Nous avons classé tous les « bactéroïdes pigmentés en noirs » qui ne sont pas des *Porphyromonas gingivalis* ni *Prevotella intermedia* sous l'appellation générique de *Bacteroides melaninogenicus*.

Pour chacun des prélèvements analysés, la titration bactérienne a mis en évidence des quantifications importantes allant de 2 à 1000 fois la normale par prélèvements. Les valeurs normales par la méthode utilisée sont de 1 à 2×10^5 bactéries /ml de milieu de transport.

61,53% des prélèvements ont présenté des résultats différents entre les pools et les sites spécifiques, avec une proportion supérieure de 10% de différence dans 92,30% des cas et des nombres de CFU supérieures à 10^2 de différence dans 15,38% des cas. Au cumul des résultats, un patient sur trente soit 3,33% des cas présente tous les résultats des sites et des pools concordants (tableau 2.1). Donc **96,67% des patients ont des résultats différents.**

Il est possible de regrouper les patients en trois catégories en fonction des résultats :

Patient Type I Absence dans le pool d'un ou de plusieurs pathogènes présents dans les sites spécifiques, avec une réaction aux antibiotiques proche ou identique. (Tableau 2.2 et 2.3)

Patient Type II: absence dans le pool, réaction aux antibiotiques différents. (Tableau 2.4 et 2.5)

Patient Type III : Existe dans le pool pas dans les sites spécifiques (un seul patient, tableau 2.6 et 2.7).

Tableau 2.1 : Résultat identique entre le pool et les sites spécifiques: 1 patient sur 30

espèces	Site16	Site 27	Site 31	pool
<i>Tannerella forsythia</i>	20%	0	0	20%
Nbre	5.10^6	3.10^5	2.10^7	6.10^6
facteur	50	3	200	10

Tableau 2.2:

Patient Type I : absence des espèces dans le pool par rapport aux sites spécifiques, avec des résultats proches pour les antibiotiques ou identiques

Espèces	Site 43	Site 26	Site 16	Pool
<i>Bacteroides melanogenicus</i>	0	<0,1%	0	0
<i>Capnocytophaga sp.</i>	0	9%	0	3,8%
<i>Eikenella corrodens</i>	0	<0,1%	0	0,8%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	0	40%	0
Quantification	$5,1.10^6$	3.10^6	$3,4.10^7$	4.10^7
Facteur	50	30	340	200

Tableau 2.3:

Résultats des antibiogrammes par site et par pool: sensible (S) ou résistant (R)

Forte résistance identique aux antibiotiques testés :

Pénicilline (Pen), ampicilline (Amp), amoxicilline (Amox), cephalosporine (Cefa), tétracycline (Tétra), doxycycline (Doxy), minocycline (Mino), spiramycine (Spir), métronidazole (Métro).

Site16 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Site 26 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Capnocytophaga sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Eikenella corrodens</i>	R	S	S	S	R	R	R	R	R

Site Pool espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Capnocytophaga sp.</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
<i>Eikenella corrodens</i>	R	S	S	S	R	R	R	R	R

Tableau 2 .4:

Patient type II: absence des espèces dans le pool par rapport aux sites spécifiques, avec une sensibilité aux antibiotiques différente

Espèces	Site12	Site 41	Site 24	Pool
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	2,5%	0,8%	0	12%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	4%	0	20%	0
Quantification	3.10^7	4.10^6	1.10^6	9.10^6
Facteur	300	40	40	90

Tableau 2.5:

Résultats des antibiogrammes par site et par pool du patient type II, avec une résistance variable pour la même souche aux antibiotiques testés

Site12 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	R	S	S	S	R	R	R	S	S
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Site 41 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Pool	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Tableau 2.6:

Patient type III : Les pathogènes existent dans le pool pas dans les sites spécifiques (1)

Espèces	Site 36	Site 26	Site 16	Pool
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0	0	0	0,4%
<i>Prevotella intermedia</i>	9,7%	0	0,7%	8%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0	6%	0	0,2%
Quantification	5,1.10 ⁷	1.10 ⁸	7.10 ⁷	8.10 ⁸
Facteur	500	1000	500	800

Tableau 2.7:

Résultats des antibiogrammes par site et par pool: sensible (**S**)ou résistant (**R**)

Sensibilités différentes pour une même souche, Antibiotiques testés : pénicilline (Pen), ampicilline (Amp), amoxicilline (Amx), céphalosporine (Cefa), tétracycline (Tétra), doxycycline (Doxy), minocycline (Mino), spiramycine (Spir), métronidazole (Métro).

Site16 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Prevotella intermedia</i>	R	S	S	S	R	R	R	S	S

Site36 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Prevotella intermedia</i>	R	S	S	S	R	R	R	S	S

Site26 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R

Pool espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
<i>Prevotella intermedia</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	R
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	S	S	S	S	R	R	R	S	S

2-4 -Discussion :

Les résultats montrent dans tous les cas une titration bactérienne élevée allant de 2 à 1000 fois supérieure à la normale, et la mise en évidence de micro-organismes :

Pathogènes vrais (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*) et pathogènes opportunistes (*Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens*) traduisant un déséquilibre de la flore. (Pour certains un potentiel évolutif de la maladie sera supposé avec perte osseuse par synthèse de phosphatase) et ainsi que la présence d'entérobactéries.

Une disparité entre les prélèvements spécifiques et les prélèvements en pool existe sur un plan quantitatif et qualitatif.

Il a été mis en évidence :

- Une grande variation de sensibilité *in vitro* entre les cultures bactériennes et les neuf antibiotiques testés.
- Une variation de sensibilité aux antibiotiques entre les espèces bactériennes rencontrées et les sites de prélèvements.
- Une variation de sensibilité aux antibiotiques entre les espèces bactériennes rencontrées et le mode de prélèvement, mais aussi pour une même espèce.

Par exemple *Fusobacterium nucleatum* présente de grandes différences de sensibilité aux antibiotiques en fonction du site de prélèvement. La littérature montre classiquement une résistance connue à la clindamycine et aux macrolides, mais dans cette étude une forte disparité est retrouvée. Il paraît sensible aux différents antibiotiques dans les prélèvements par sites et par pool, sauf pour le site 26. Dans cette situation, il n'est sensible qu'aux pénicillines (tableau 2.7).

Les variations importantes retrouvées peuvent être dues à notre méthode de prélèvement, mais les prélèvements sont réalisés avec exactement le même protocole, au même moment, au même endroit, avec les mêmes cônes de papier. Cependant, le fait de mettre les deux cônes représente un volume d'imbibition important pour la poche. Mais avec deux milieux de transports différents, il fallait deux supports différents et on s'aperçoit qu'après avoir enlevé les deux cônes si on en remet un troisième, ce dernier est aussi imbibé.

De plus, on peut penser que les deux cônes ont bénéficié de la même information même si le volume imbibé pouvait être faible. Une forte attention a été portée sur le fait que les deux

cônes soient bien imprégnés. L'utilisation des cônes l'un après l'autre, même si une recolonisation du fluide peut se faire ne paraissent pas intéressante pour la conservation des informations bactériennes car on peut supposer que le premier cône pouvait vider le contenu en quantité suffisante pour modifier les résultats ou prélever sélectivement un type de bactéries que l'on pourrait qualifier de plus superficielles.

Tableau 2.8: Variations de sensibilité des souches selon les sites pour un même pathogène.

Résultats des antibiogrammes par site et par pool: sensible (S) ou résistant (R)

Antibiotiques testés : pénicilline (Pen), ampicilline (Amp), amoxicilline (Amox), céphalosporine (Cefa), tétracycline (Tetra), doxycycline (Doxy), minocycline (Mino), spiramycine (Spir), métronidazole (Métro).

Site pool espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Site12 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	S

Site16 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tetra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Site26 espèces	Pen	Amp	Amx	Cefa	Tertra	Doxy	Mino	Spir	Metro
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R

Compétition bactérienne dans un même milieu :

Lorsque les prélèvements sont mis en commun dans un même milieu de transport, des modifications sont observées sur les cultures. Ces modifications sont le plus souvent des pertes d'informations. Les bactéries étant vivantes, on peut supposer qu'il existe des interactions entre elles, qui peuvent aboutir à la perte de certaines espèces bactériennes. Mais on s'aperçoit aussi que des espèces restantes donnent des résultats différents sur l'antibiogramme. Donc nous devons avoir une modification des espèces en fonction des sites, avec éventuellement une possibilité d'échange par proximité dans le milieu de transport.

Il est à noter que l'on peut trouver des similitudes de résultats des cultures avec un des sites. En effet plusieurs résultats des pools présentent des résultats très proches avec un site spécifique particulier du patient. On peut penser que les espèces de ce site prédominent, et prennent le pas par compétition sur les autres.

Il peut exister deux moments où la compétition peut se jouer, dans le milieu de transport, alors qu'il contient un inhibiteur de croissance (le phenyl mercurique) ; ou sur le premier ensemencement non spécifique sur la gélose au sang.

Cette compétition peut induire des variations pouvant aller jusqu'à la mort bactérienne de certaines espèces. Dans ce cas les bactéries ne peuvent plus être cultivées.

Intérêt de la PCR en temps réel :

Les cultures bactériennes semblent provoquer des pertes d'information. La sensibilité faible de cette méthode en est peut être la raison (de l'ordre de 10^4 bactéries). Les techniques de biologie moléculaire et en particulier la PCR en temps réel semble présenter des avantages par rapport aux limites des cultures. Le seuil de détection pour l'utilisation d'une PCR en temps réel type Meridol ® paro-diagnostic est de 10^2 copies d'ADN et l'analyse moléculaire permet de mettre en évidence la présence des bactéries même mortes. Il semble donc intéressant de comparer les résultats pour une même poche avec une analyse par site par une PCR en temps réel et par la culture.

2-5 Conclusion :

Le mode de prélèvement bactérien par site donne des résultats plus précis et plus complets que par pool pour la conservation des informations bactériennes des prélèvements. Il est donc préférable de réaliser des prélèvements avec un milieu de transport spécifique par site pour avoir la meilleure corrélation possible entre la situation clinique et la culture en laboratoire.

L'utilisation des prélèvements bactériens sur les sites spécifiques permet de connaître les bactéries impliquées dans les maladies parodontales concernées et non supposées être présentes avec des différences en fonction des sites. Une antibiothérapie adaptée et ciblée soit sur les pathogènes les plus agressifs soit sur la cible la mieux adaptée à l'ensemble des sites sera alors possible et diminue le taux d'erreur par rapport à une antibiothérapie probabiliste.

Son utilisation va permettre aux praticiens de réduire les erreurs de thérapeutiques anti-infectieuses non adaptées, de ne pas créer d'autres résistances et de réduire les pathologies réfractaires aux traitements conventionnels.

Cependant cette technique de référence présente certaines limitations pour une démocratisation à grande échelle de son utilisation. Les dernières techniques moléculaires sembleraient présenter un intérêt dans leur facilité d'utilisation pour le praticien.

Une étude comparative avec une analyse par PCR en temps réel versus culture bactérienne anaérobie par site, permettrait de comparer la capacité d'identification et de quantification des principales bactéries.

3-PCR en temps réel versus culture bactérienne anaérobie pour l'identification et la quantification des principales bactéries pathogènes parodontales

3-1 - Introduction

Les parodontites sont des maladies infectieuses opportunistes, dont l'expression est liée à la susceptibilité du patient. La méthode de référence, pour isoler et identifier les bactéries pathogènes impliquées dans les maladies parodontales est la méthode de culture bactérienne en condition d'anaérobiose stricte. A côté de la culture en anaérobiose, l'utilisation des techniques moléculaires permet l'identification des bactéries anaérobies (Haffajee 1992, Loesch 1992, Sixou 1991).

La PCR en temps réel s'est avérée une méthode sensible et rapide pour la détection et la quantification des différentes espèces microbiennes bactériennes (Heid 1996, Lyons 2000, Martin 2002, Nadkarni 2002, Reischl 2002). Les laboratoires GABA International® ont développé un concept de diagnostic moléculaire par l'utilisation de la PCR en temps réel ciblée sur six pathogènes parodontaux : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola*. Ces micro-organismes sont considérés comme les principaux pathogènes impliqués ou associés aux parodontites et aux péri-implantites (Dzink 1985, Haffajee 1994 ; Listgarten 1976, 1992, 1994 ; Mombelli 1992, 1994, Slots 1979, 1988 ; Socransky 1998, 2005).

L'objectif de cette étude est de comparer la culture bactérienne anaérobie versus la PCR en temps réel (*Meridol®* Paro-diagnostic) dans l'analyse quantitative et qualitative de prélèvements de flore sous gingivale de patients présentant une parodontite agressive.

3-2 - Matériel et méthodes

3.2.1-Patients et site de prélèvement

3.2.1.1–critère d’inclusion

La population est composée de 18 patients consultants à l’hôpital de Nantes dans le service d’odontologie conservatrice pour une parodontite agressive confirmée par l'examen clinique et radiologique, et n’ayant reçu aucune antibiothérapie au cours des trois derniers mois. Les patients ayant accepté de rentrer dans le protocole étaient âgés entre 18 et 65 ans.

3.2.1.2- critères de non inclusion

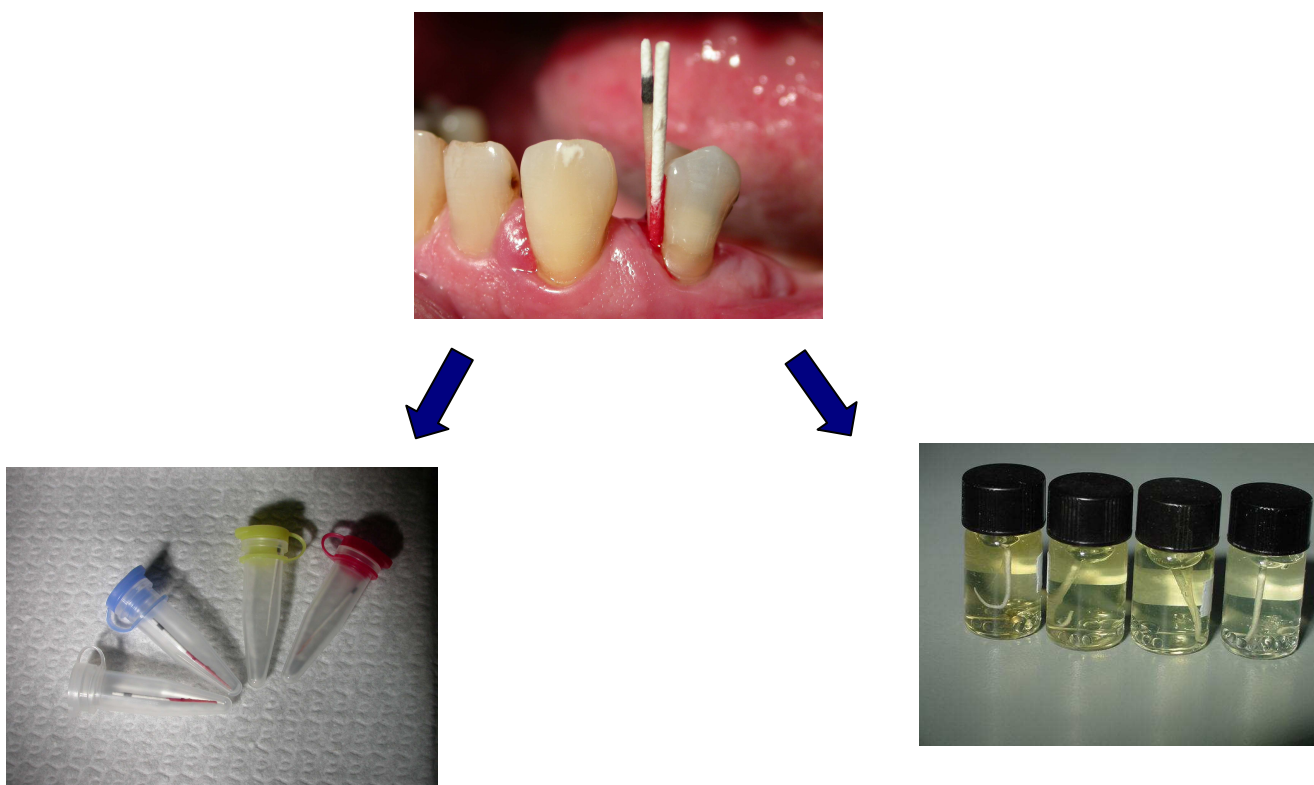
Les critères de non inclusion étaient des traitements antibiotiques et/ou parodontaux pendant les trois mois précédents l’analyse (qui pourraient modifier les données de l’antibiogramme), et des patients ayant moins de quatre sites actifs distincts.

Quatre sites actifs avec des poches d’au moins 5mm de profondeur ont été choisis pour réaliser cette étude. Après un examen radiographique, la poche parodontale la plus profonde a été choisie dans chaque secteur (Mombelli 1991). Le même type de sonde parodontale a été utilisé pour calculer la profondeur de poche, mais avec une sonde stérile à chaque site, pour éviter les transferts de pathogènes de poche en poche. Les critères de choix des sites étaient les signes habituels de l'activité de la maladie : saignement spontané, perte d'attache, suppuration de poche, inflammation gingivale.

Le site choisi a été nettoyé au sérum et à la compresse stérile pour enlever le biofilm bactérien supra gingival et séché à la seringue à air. Les échantillons ont été prélevés avec les pointes de papier stériles endodontiques (Modèle Fine régular de MYNOL®) tenus avec des précelles stériles (Sixou 1991) : deux pointes de papier ont été insérées, sans forcer, dans la poche choisie pendant 20S, jusqu'à la résistance à la pression.

Une des deux pointes de papier a été alors placée dans un flacon de 2 ml du milieu pré-réduit VGMA-III de Möller 1966, l'autre dans un tube sec spécifique pour l'analyse en PCR en temps réel du laboratoire moléculaire spécialisé Carpegen (Carpegen® GmbH, Münster, Allemagne).

Les quantités et les qualités des bactéries prélevées par chaque méthode ont été examinées.



PHOTOS 3.1 : Prélèvements répartis dans les milieux de transport pour la culture et dans les tubes pour la PCR.

3.2.2 Procédures de culture anaérobies

Les protocoles de culture ont été effectués dans le Laboratoire « Parodontite et Maladies Générales » LU46(faculté de chirurgie dentaire, Toulouse). Le milieu de transport pré-réduit utilisé était le VGMA-III de Möller modifié.

Des bactéries ont été cultivées sur différents milieux de culture sélectifs et non sélectifs. Après la méthode rapide d'identification (Slots 1986), les dilutions appropriées (10^{-2} et 10^{-3}) ont été réalisées pour permettre la croissance spécifique et l'isolement de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (milieu de TSBV) Slots (1982) et *Fusobacterium nucleatum* (milieu de CVE). Cent μ l des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} ont été étalés sur un milieu gélosé non spécifique au sang (Holdeman 1977) complété avec 0,0002% de bisulfite de sodium de ménadione, 0,4%

de chlorure d'hémine et 10mg/l d'acide N-acétyl-muraminic. Ceci a permis une quantification des bactéries totales, la culture et l'identification des *Bacteroides* pigmentés en noir (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*) et des *Bacteroides* non pigmentés (*Tannerella forsythia*).

Les boîtes de Pétriensemencées ont été placées dans une station d'anaérobiose pendant 7 à 15 jours à 37°C (N₂ 80%, CO₂ 10%, H₂ 10%). L'identification des bactéries anaérobies a été effectuée selon les critères du Bergey's Manuel comme suit : la morphologie des colonies (CFU), la couleur des CFU, la fluorescence des CFU aux UV 366nm, mobilité et morphologie des cellules en microscopie optique, coloration de Gram, et les tests biochimiques : catalase, oxydase. Cette identification était tout d'abord réalisée à l'oeil nu, puis avec une loupe binoculaire et, enfin, à l'aide d'un microscope optique (à immersion dans l'huile) pour clarifier tous les doutes sur l'identification d'espèces.

Les prélèvements étaient considérés comme analysables lorsque la quantification sur milieu non sélectif mettait en évidence un nombre d'UFC supérieur à 10⁵ bactéries par ml de milieu de transport.

3.2.3-PCR en temps réel

Cette méthode détecte l'ADN bactérien de six pathogènes parodontaux, vivants ou morts : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola*. En plus de cette détermination, la charge bactérienne totale des échantillons a été également évaluée.

Comme précédemment expliqué, nous avons employé exactement la même technique d'échantillonnage que pour la méthode de culture, en insérant des cônes de papier en même temps et dans le même site. Nous avons directement déposé les cônes de prélèvement dans les tubes transports de SARSTEDT AG et de CO®. Les échantillons de plaque ont été envoyés au laboratoire de biologie moléculaire (Carpegen GmbH, Münster, Allemagne). Les cellules ont été soumises au processus automatisé de l'analyse *Meridol*® *Paro-diagnostic* (GABA international, Münschenstein, Suisse).

L'ADN génomique bactérien a été isolé et purifié selon les instructions du fabricant. Les amorces et les sondes pour *Meridol*® *Paro-diagnostic* ont été conçues pour être fortement spécifiques pour l'ADN ribosomal (rDNA) des pathogènes parodontaux ciblés.

La PCR en temps réel a été effectuée avec 2µl d'ADN extraits, mélangé à l'ensemble approprié de sonde, d'amorce et le mélange universel de TaqMan® PCR (Lau 2004, Reischl 2002). Le seuil de détection de la méthode de PCR en temps réel est de 100 copies d'ADN cible avec un coefficient de variation de 15%. Deux jours à une semaine après échantillonnage, nous recevons un rapport de l'analyse indiquant les espèces bactériennes identifiées par ml, le nombre de micro-organismes détectés et la charge bactérienne totale.

3.2.4- Statistiques

Le seuil de détection est de 10^2 bactéries pour l'analyse de PCR en temps réel, alors que celui de la culture anaérobie était seulement de 10^3 à 10^4 . Ainsi, pour comparer les deux méthodes, nous avons analysé les résultats originaux et avons ajusté les données sur le niveau (10^3) du protocole de culture anaérobie (tableau 3.2). Le logiciel Excel® a été employé pour classer les résultats et pour calculer les moyennes et les écarts-type. Les résultats de types descriptifs sont présentés sous forme d'histogrammes et de tableaux.

3-3 Résultats

3.3.1-En général :

Les résultats obtenus avec chaque méthode ont été analysés en fonction de chaque espèce bactérienne, et comparés à la flore totale. A partir des 18 patients inclus dans cette étude, nous avons obtenu 72 analyses par la culture bactérienne et 72 analyses par PCR en temps réel analysables.

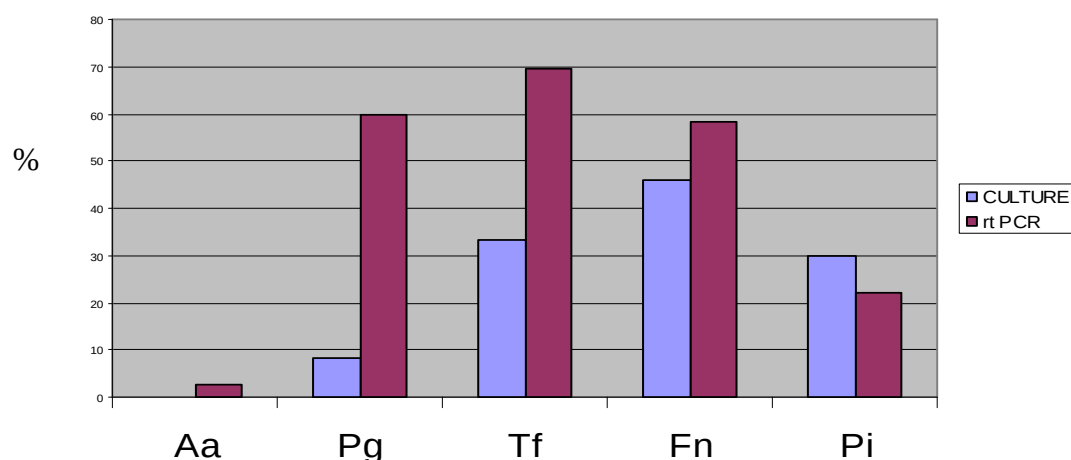


Diagramme 3.1: Pourcentage de présence des pathogènes en fonction des types d'analyses PCR real time versus culture (Verner 2006)

Pour tous les pathogènes parodontaux visés, la technique moléculaire a donné des résultats indiquant un plus grand nombre de bactéries que la culture, excepté pour *Prevotella intermedia*. Des similitudes ont été trouvées pour *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Fusobacterium nucleatum* (tableau 1). Cependant, une grande différence a été notée pour les *Porphyromonas gingivalis* (51%). En ce qui concerne le *Tannerella forsythia*, la technique moléculaire a permis d'identifier un plus grand nombre de bactéries que la méthode par culture (36,11%).

Pour *Treponema denticola*, qui est naturellement absent dans la culture (cette dernière bactérie ne forme pas de colonies) a été présent dans 70% des prélèvements par PCR rt.

Tableau 3.1: Tableau comparatif des deux méthodes d'analyse. Le pourcentage de présence de chacune des 6 bactéries pathogènes est exprimé en fonction de la méthode d'identification et de quantification (culture ou PCR rt).

	Culture			PCR rt			
	Nbre par site	Proportion	Moyenne	Nbre par site	Proportion	Moyenne	Nbre >10 ³
Aa	0	0	0	24	0,08%	0,02	2
Pg	6	2,99%	6,69	61	4,91%	8	43
Tf	24	6,39%	6,9	54	3,92%	5,74	50
Td	0	0	0	58	3,64%	5,24	51
Fn	33	9,21%	15,54	56	0,41%	0,91	42
Pi	22	12,06%	21,08	26	1,06%	2,49	16

Tableau 3.2: Pathogènes identifiés par les cultures et non recherchés par la PCR en temps réel
Proportion des pathogènes en fonction des méthodes de prélèvement.

	Nbre de site	Proportion	Moyenne
<i>Capnocytophaga</i> <i>ochracea</i>	9	1,45%	3,59
<i>Campylobacter</i> <i>rectus</i>	13	6,13%	10,19
<i>Candida albicans</i>	3	38,33%	14,01
<i>Eikenela corrodens</i>	5	0,10%	0
<i>Enterobacter</i> <i>cloacae</i>	2	Np	Np

3.3.2- *Porphyromonas gingivalis*

La présence détectée de *Porphyromonas gingivalis* était très variable : une différence de 51,39% entre les deux méthodes a été trouvée. Elle est considérable compte tenu de la pathogénicité de cette bactérie. Cependant il faut considérer que *Porphyromonas gingivalis* ne représentait que 2,99% de toute la flore cultivable, contre 4,91% avec les sondes (5,99% dans des données corrigées).

L'écart type était de 3 avec une petite variation comparée à la moyenne.

Un prélèvement a donné un résultat strictement identique par les deux techniques. Deux prélèvements étaient très proches. Trois prélèvements ont présentés un pourcentage élevé de *Porphyromonas gingivalis* avec les sondes et bas avec les cultures. Pour ces patients, les sondes ont pu détecter les pathogènes, mais pas les cultures.

3.3.3- *Tannerella forsythia*

Comme mentionné ci-dessus, une différence de 36,11% a été trouvée entre les deux méthodes pour le *Tannerella forsythia*, ce qui est considérable. Cependant, de grandes variations ont pu être observées :

- 16 sites montrent une similitude élevée (différence < 0,5%) dont 1 identique.
- 12 sites donnent divers résultats, y compris 10 sites pour lesquels la détection par la culture était plus importante que par PCR rt (24% de la différence).
- 7 sites présentent une proportion inférieure à 1% pour les sondes, 20% pour les cultures y compris deux poches avec *Tannerella forsythia* absent pour les sondes, et présents avec une proportion de 15 à 24% pour les cultures.

Dans les derniers cas, les bactéries ont été identifiées dans des concentrations élevées tandis que les sondes ne les avaient pas détectées. On peut se demander si le prélèvement était valide. Mais étant significatif pour les autres bactéries pathogènes, nous pouvons donc le considérer comme tel.

3-4 Discussion :

Tous les échantillons ont été analysés et présentaient une importante flore totale quantitativement pour les deux méthodes. Ce résultat valide chacun des prélèvements vis à vis de leur concentration. Les pathogènes parodontaux identifiés semblent correspondre à la flore microbienne généralement décrite dans la littérature (Jespens 2005).

On peut observer une différence dans la distribution des pathogènes parodontaux d'un patient à l'autre. Mais aucun lien direct n'a été observé entre la sévérité de la maladie et la présence des bactéries pathogènes : quelques patients souffraient d'une parodontite agressive avec peu de pathogènes; tandis que d'autres réagissaient seulement à un biofilm trop important. Les espèces pathogènes doivent être présentes pour que la parodontite se développe mais la maladie ne se manifesterait pas nécessairement tant que la bactérie n'excède pas un seuil déterminé et spécifique pour chaque site (Bradg 1987, Slots 1988) et chaque individu.

Généralement les résultats site par site de l'identification bactérienne par les deux techniques (culture et PCR rt) sont différents. Cependant, la titration de la flore totale (charge totale) est relativement semblable avec les deux techniques. Bien que très variable (0% à 12%), le

pourcentage de présence des pathogènes parodontaux est faible une fois comparé à la flore totale par les deux techniques.

3.4.1- *Porphyromonas gingivalis*

Les résultats semblent très différents pour *Porphyromonas gingivalis* mais quand on considère sa concentration par rapport à la flore totale, une bonne corrélation apparaît entre les deux techniques pour ce pathogène. Cependant ce *Bacteroides* pigmenté en noir anaérobie est extrêmement sensible à l'oxygène et on peut se demander si les cultures n'ont pas perdu des informations par mort des bactéries pendant le prélèvement, le transport et le repiquage.

3.4.2- *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Nous avons trouvé des résultats comparables pour *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, avec une différence seulement de 2,77% entre les deux méthodes.

La quantité d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est très faible comparée à toute la flore: 0,08% pour la PCR rt et 0% pour la culture. Ces résultats sont très différents des résultats de Jervøe-Donnent et al 2005 , mais semblables à ceux de Lau et al 2004 . La quantité de cette bactérie pathogène capnophile ne semble pas avoir atteint le plus souvent le seuil de la détection de la culture. En outre, dans la population étudiée, seuls des patients caucasiens ont été étudiés (sans que cela soit un critère d'inclusion). Haubek et al (1995, 1996, 2004) et Poulsen 2003 ont démontré que les *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sont un pathogène très rare en Europe du nord. Cette distribution bactérienne géographique et ethnique peut expliquer la présence très faible de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dans notre étude.

3.4.3- *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella intermedia*

Des résultats différents ont été trouvés pour *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella intermedia*. La PCR rt n'a pas détecté ces pathogènes tandis que la culture a présenté une titration élevée dans 10% des cas. Pour ces deux espèces, la question se pose quant à la fiabilité de la détection, par la PCR rt ou par la culture conventionnelle.

L'hypothèse la plus probable est liée au fait que le milieu de culture n'est pas spécifique pour *Prevotella intermedia* ou le *Prevotella negrescenci*. Ces deux bactéries sont très semblables, elles ont un métabolisme proche, et montrent peu de différence de pathogénicité. Considérant

que les sondes sont fortement spécifiques pour *Prevotella intermedia* elles doivent différencier les deux pathogènes, alors que les cultures ne les différencient pas du tout. Nous pouvons avoir ainsi un résultat élevé de titration pour une culture et une absence pour les sondes.

De la même manière, pour *Fusobacterium nucleatum* et *Fusobacterium periodonticum*, le milieu de culture n'est pas spécifique (bien qu'il reste possible d'améliorer l'identification en observant les colonies en lumière UV 366nm). L'analyse peut induire une surestimation par la confusion des colonies (UFC), ce qui n'est pas le cas pour les sondes.

3.4.4- Tannerella forsythia

La différence est de 36,11% dans la détection de *Tannerella forsythia* entre la culture et la technique PCR en temps réel. Elle est certainement due au fait que cette bactérie est très difficile à cultiver (Ezzo 2003) et qu'elle est en très faible quantité dans cet échantillon.

3.4.5- Culture anaérobie contre PCR en temps réel

La culture bactérienne de micro-organismes anaérobies est basée sur la capacité à maintenir en vie et en croissance ces organismes fragiles et exigeants. Cette technique nous permet d'identifier des micro-organismes présents d'une manière non spécifique. Cette non-spécificité est relative et liée aux capacités et condition de cultures des micro-organismes présents. Cependant la culture bactérienne reste la technique de référence. Des CFU inattendues de bactéries pathogènes peuvent apparaître pendant la culture, tandis que les sondes courantes lors de la PCR rt ne peuvent pas les détecter car elles ne les ciblent pas. Ce fait peut être important, en particulier en présence d'infections à *Candida albicans*, à *Enterobacter cloacae* ou à *Pseudomonas aeruginosa* (Slots 1988).

Si des antibiotiques ont été prescrits dans le passé sans résultat, cela va aggraver la situation si une nouvelle antibiothérapie non adaptée est conduite.

Grâce aux résultats des cultures, les fluoroquinolones pour les entérobactéries responsables de formes atypiques de parodontites ou les antifongiques pour les infections à *Candida* seront les prescriptions les plus appropriées.

Comparé aux sondes, nous notons que nous avons une perte d'information pour des concentrations faibles dans les cultures. Cela peut s'expliquer par un seuil de détection de 10^3 à 10^4 pour la culture et de 10^2 pour la technique moléculaire (Lau 2004).

La perte d'information peut être également due à la mort des bactéries pendant le prélèvement ou le transport. Mais cela représente sûrement une quantité faible parce que la charge bactérienne totale évaluée par les deux techniques est comparable. Ce résultat est en faveur d'une mortalité faible du prélèvement à l'identification.

Concernant des analyses par PCR en temps réel, les sondes et/ou les amorces permettent de détecter l'ADN des bactéries vivantes et mortes. Cette différence principale pourrait expliquer la négativité de certaines cultures et les résultats positifs des sondes. Si cette hypothèse est correcte, les sondes nous permettent d'améliorer la qualité des informations concernant les bactéries vivantes et mortes présentes dans la poche. On pourra parler de concepts d'« histoire de la maladie », pour les bactéries pathogènes ciblées puisque la prise d'information n'est pas uniquement au jour J du prélèvement mais aussi sur une période précédente.

3.4. 6- Critères de choix

Quelle technique est le meilleur reflet de la situation clinique ? Soit les bactéries présentes sont recherchées dans la poche et cultivées ; soit les traces d'ADN de bactéries vivantes et mortes ciblées sont recherchées.

La culture anaérobie semble donner une idée plus claire du potentiel d'évolution de la poche tandis que la PCR en temps réel pourrait être le reflet de l'histoire de la maladie.

La technique moléculaire ne donne aucune indication sur le moment où les bactéries sont mortes dans la poche. Il ne peut être déduit aucune chronologie de la dernière activité de la maladie. Par contre, les sondes nous permettent d'identifier les bactéries les plus pathogènes qui existent ou ont existé dans l'échantillon, même si la concentration en est faible.

Par conséquent, pour les pathogènes ciblés, et seulement pour ceux là, nous avons une meilleure sensibilité avec la PCR en temps réel.

La durée de l'analyse dépend de la technique de détection utilisée. La PCR en temps réel peut fournir des résultats en deux heures, tandis que la culture anaérobie a besoin de 15 à 21 jours

pour confirmer la présence des pathogènes (et presque une semaine supplémentaire pour les données de l'antibiogramme).

Par contre, les cultures ont l'avantage important de permettre de réaliser un test de sensibilité aux antibiotiques.

Bien que l'intérêt de cette technique *in vitro* présente des limites par rapport aux conditions *in vivo*, en raison de la présence du biofilm et de la complexité de la flore buccale (Socransky 1993,1998), aucune autre méthode ne peut analyser les sensibilités des bactéries pathogènes aux antibiotiques.

L'utilisation des sondes exige de se référer à la littérature scientifique pour prescrire l'antibiotique le plus approprié. Il s'agit d'une antibiothérapie probabiliste. Ces références sont généralement basées sur des évaluations statistiques des résultats de culture de différents laboratoires de plusieurs pays. Mellado et al. 2001, 2003, Lakhssassi et al. 2005, et particulièrement Lakhssassi et Sixou (2004, 2005), ont mis en évidence les variations interindividuelles et, surtout, intra individuelles élevées de la susceptibilité de quelques pathogènes aux antibiotiques, en particulier pour *Prevotella intermedia*. Ce fait souligne l'importance de la culture et de l'antibiogramme conventionnel pour les patients présentant une parodontite agressive.

3-5 Conclusion :

Ce travail a permis de trouver une similitude entre les deux méthodes d'analyse en objectivant la présence des six bactéries pathogènes parodontales ciblées (après correction de concentration).

Les limitations techniques intrinsèques des cultures bactériennes anaérobies causent une perte d'information quantitative, 10^3 pathogènes sont exigés pour leur détection. Cependant, cette technique de référence a deux avantages importants : la détection bactérienne n'est pas ciblée elle est non spécifique, et nous pouvons effectuer un test de sensibilité aux antibiotiques. Ainsi, la culture anaérobie apporte plus d'informations et permet l'utilisation d'antibiothérapie ciblée et adaptée.

La technique de PCR en temps réel a donné des résultats relativement semblables, avec des variations avérées pouvant être liées au seuil inférieur de détection (10^2). Cette technique peut

permettre de détecter la présence de *Treponema denticola* tandis que la culture ne le peut pas. Pour *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* et *Prevotella intermedia*, la PCR en temps réel semble plus sensible et plus sélective que la culture anaérobie. Tenant compte de ces résultats, la fiabilité de la détection moléculaire des six bactéries pathogènes visées autorise sa généralisation grâce à sa simplicité d'utilisation, sa rapidité et sa reproductibilité. Nous espérons que le nombre et la qualité de sondes et d'amorces augmenteront pour couvrir l'ensemble des bactéries impliquées dans l'étiologie des maladies parodontales.

Cette étude montre que les techniques conventionnelles et moléculaires sont complémentaires. Elles permettent d'établir un diagnostic bactériologique précis, à condition qu'elles soient employées selon des objectifs thérapeutiques définis.

La PCR en temps réel est la technique la plus appropriée pour la détection et la quantification des pathogènes ciblés lors du diagnostic pour orienter notre plan de traitement et la thérapie anti-infectieuse, puis lors de la maintenance pour la réévaluation (Sixou 2003).

4- Choix de l'antibiothérapie en fonction d'une analyse de flore sous gingivale par culture bactérienne ou par PCR en temps réel



4-1-Introduction :

Le choix de l'antibiothérapie lors des traitements parodontaux est probabiliste en fonction des pathogènes supposés être présents d'après les critères cliniques et de la littérature. A l'aide des prélèvements bactériens dans la poche parodontale, la présence des bactéries pathogènes peut être mise en évidence par la méthode de culture bactérienne ou par une méthode moléculaire. Lors de l'analyse des prélèvements par culture, un antibiogramme peut être réalisé pour connaître la sensibilité des espèces cultivées *in vitro*, aux différents antibiotiques.

Le choix de la prescription se porte soit sur le résultat de l'antibiogramme site par site en ciblant l'antibiotique le mieux adapté, soit dans la globalité des sites en utilisant l'antibiotique le mieux adapté à l'ensemble des pathogènes les plus agressifs.

En revanche lors de l'analyse moléculaire, les espèces rencontrées sont mises en évidence par leur ADN, seules les informations sur leur présence et leur quantité sont obtenues. Le choix de l'antibiotique se fait grâce au diagnostic bactérien, donc à la présence de certaines espèces bactériennes rencontrées en fonction des recommandations de la littérature, la référence en France étant les recommandations de l'AFSSAPS juillet 2001.

Cette étude a pour objectif de comparer les recommandations d'utilisation des antibiotiques de l'AFSSAPS par rapport aux résultats d'un test de sensibilité aux antibiotiques dans le cadre de prélèvement de flore sous gingivale chez des sujets atteints de parodontite.

4-2- Matériels et méthodes

4-2-1 La population étudiée

La population est composée des 18 patients ayant participé à l'étude précédente. Les tests de sensibilité aux antibiotiques seront réalisés dans le cadre de cette étude. Ces patients consultaient pour une parodontite agressive, confirmée par l'examen clinique et radiologique. L'âge n'était pas un critère de sélection puisque l'étude concerne simplement la qualité des méthodes de prélèvement. Quatre sites actifs avec des poches d'au moins 5mm de profondeur ont été choisis pour chaque patient comme critères d'inclusion.

Nous avons rassemblé 72 analyses par la culture bactérienne et 72 analyses par PCR en temps réel.

Les critères de non inclusion des patients étaient : traitements antibiotiques reçus et/ou parodontaux pendant les trois mois précédents l'analyse (qui pourrait modifier les données de l'antibiogramme) ; patients ayant moins de quatre sites actifs distincts.

Nous avons en fonction des résultats obtenus par PCR en temps réel, adapté le choix des antibiotiques selon les recommandations de l'AFSSAPS et comparé avec les résultats en cultures avec test de sensibilité aux antibiotiques des mêmes sites.

AFSSAPS 2001	<i>Pg</i>	<i>Tf</i>	<i>Td</i>	<i>Fn</i>	<i>Pi</i>	<i>Aa</i>
Amox	S	R	S	S	15-30% R	S
Méto	S	S	S	S	S	R
Méto+Spi	S	S	S	S	S	R
Clin	S	5-30% R	ND	R	S	R
Prist	S	10-15% R	S	S	S	S
Macro	20-40% R	20-40% R	S	R	20-40% R	R
Tetra	S	ND	S	40-60% R	60% R	S

Tableau 4.1 : Recommandation AFSSAP 2001(S : sensible, ND non déterminé, R : résistant)

amoxicilline (Amox), tétracycline (Tétra), spiramycine (Spir), métronidazole (Méto), Clindamycine (Clin), Pristinamycine (Prist), Macrolides (Macro)

4-2-2 –Tests de sensibilité aux antibiotiques

Après les protocoles de culture effectués dans le Laboratoire parodontite et maladies générales LU46 (faculté de chirurgie dentaire, Toulouse) analysés dans le précédent chapitre. Les bactéries isolées et identifiées ont été mises en culture secondaire et un test de susceptibilité aux antibiotiques (antibiogramme) a été réalisé.

Le DDS- test (méthode de Kirby- Bauer modifié pour les bactéries anaérobies) est un test par diffusion en milieu gélosé. Il consiste à placer des disques stériles en papier buvard (Sanofi® Diagnostics Pasteur) contenant une concentration déterminée d'un antibiotique. Ces disques pré chargés sont disposés sur la surface de la gélose préalablement ensemencée par l'inoculum bactérien à étudier. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, le diamètre d'inhibition en millimètres est mesuré. La résistance correspond à une culture des bactéries ayant un diamètre d'inhibition inférieur à 10mm par rapport au disque. La sensibilité intermédiaire correspondant aux diamètres intermédiaires d'inhibition sur la gélose c'est-à-dire un diamètre entre 10 et 15mm autour du disque antibiotique sans culture. La sensibilité des bactéries à un antibiotique est donc mesurée par une culture à une distance supérieure à 15mm depuis le disque d'antibiotique.

9 antibiotiques ont été testés :

Pénicilline (Pen), ampicilline (Amp), amoxicilline (Amox), cephalosporine (Cefa), tétracycline (Tétra), doxycycline (Doxy), minocycline (Mino), spiramycine (Spir), métronidazole (Métro).

4-3- Résultats :

4-3.1- Résultats selon les patients:

Sur les 18 patients, deux seulement présentent de bactéries cultivées n'ayant aucune résistance aux antibiotiques, tous les disques d'antibiotiques testés présentent un diamètre d'inhibition d'au moins 15mm. Pour les autres, il existe des résistances et des résistances intermédiaires.

Nous avons regroupé les patients qui présentent tous les mêmes bactéries pathogènes mise en évidence par la PCR en temps réel. Cela représente 6 groupes. Le tableau 2 présente les

corrélations retrouvées entre les résultats de PCR en temps réel et de culture. Il n'est retrouvé au final que 18% de corrélation entre les résultats constatés sur les 18 patients et les recommandations de l'AFSSAPS sur les antibiotiques

Tableau 4.2 : Pourcentage de corrélations entre les deux méthodes pour les six groupes

Pathogènes présents par PCR rt chez un même patient	Nbre de patients	% de résultats identiques entre les deux méthodes
<i>Aa, Pg, Tf, Td, Fn</i>	2	0
<i>Pg, Tf, Td, Fn</i>	11	18%
<i>Pg, Tf, Fn, Pi</i>	1	0
<i>Pg, Tf, Td:</i>	1	0
<i>Pg, Tf, Td, Fn, Pi:</i>	2	0
<i>Tf, Td, Fn:</i>	1	0

4-3-2- 1-Groupe présentant *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*.

Dans le groupe des 11 patients présentant *Pg, Tf, Td, Fn*, les résultats des antibiogrammes sont présentés en fonction des résistances trouvées (Tableau 4.3).

La résistance intermédiaire correspondant aux diamètres intermédiaires d'inhibition sur la gélose c'est-à-dire un diamètre entre 10 et 15mm autour du disque antibiotique sans culture et une résistance vraie correspond à une culture des bactéries avec un diamètre d'inhibition inférieur à 10mm.

4-3-2-2- Choix de l'antibiotique :

Selon l'AFSSAPS, le métronidazole ou l'association métronidazole + spiramycine pourraient être prescrits en fonction des bactéries pathogènes présentes.

Ce choix semble, si on compare les résultats avec l'antibiogramme, convenable pour 2 patients sur 11 soit 18%. Ce qui signifie que 92% des prescriptions probabilistes ne conviendrait pas aux traitements des infections de ces sites.

Les autres sont résistants au métronidazole avec dans 54% une sensibilité intermédiaire à la Spiramycine.

Pour les autres antibiotiques les résultats sont proches et on constate une sensibilité intermédiaire de 45% à la doxycycline et de 36% pour la mynocyline.

Tableau 4.3 : Résultats des antibiogrammes du deuxième groupe présentant tous: *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*.

11 Patients	Résistance aux antibiotiques	Résistance intermédiaire aux antibiotiques
N°1	métronidazole	doxy, mino, ery, spi, josa, clin
N°2	métronidazole	clin, spi, tetra
N°3	métronidazole	ery, clin
N°4	métronidazole	tetra, doxy, mino, ery, spi,clin
N°5	métronidazole	tetra, doxy, min, spi
N°6	métronidazole	cip
N°7	métronidazole	doxy, min, ery, spi, cip, tetra
N°8	métronidazole	cip
N°9	métronidazole	tetra, doxy, ery, spi, cip
N°10	0	0
N°11	0	0

4-3-3 Les autres groupes de patients

Selon l'AFSSAPS en fonction des bactéries pathogènes présentes pour tous les prochains patients le métronidazole ou métronidazole et spiramycine sembleraient convenir lors d'une antibiothérapie.

Un patient présente: *Pg, Tf, Fn, Pi:*

Le patient présente une résistance à érythromycine, clindamycine, métronidazole et une sensibilité intermédiaire à la spiramycine.

Deux patients présentent: *Pg, Tf, Td, Fn et Pi:*

tableau 4.4 : Résultats des antibiogrammes

Patients	Résistance aux antibiotiques	Résistance intermédiaire aux antibiotiques
N°1	métronidazole	mino, ery, cip
N°2	métronidazole	0

Les patients présentent une résistance au métronidazole et une sensibilité intermédiaire à la mynocyline, érythromycine, ciprofloxacine, pour l'un des deux.

Un patient présentant : *Pg Tf Td:*

Tableau 4. 5 : Résultats des antibiogrammes

Résistance aux antibiotiques	Résistance intermédiaire aux antibiotiques
métro, clin, ery, spi	doxy, tétra

Le patient présente une résistance à l'érythromycine, clindamycine, métronidazole, spiramycine et une sensibilité intermédiaire à la doxycycline et la tétracycline.

Un patient présente: *Tf, Td, Fn:*

Tableau 4.6 : Résultats des antibiogrammes

Résistance aux antibiotiques	Résistance intermédiaire aux antibiotiques
métro, tetra, doxy, min, cip,	0

Le patient présente une résistance à tétracycline, doxycycline, minocycline, ciprofloxacine et au métronidazole .

Deux patients présentent : *Aa, Pg, Tf, Td, Fn:*

Tableau 4.7 : Résultats des antibiogrammes

Patients	Résistance aux antibiotiques	Résistance intermédiaire aux antibiotiques
N°1	métronidazole	cip, spi, tetra, doxy, ery
N°2	métronidazole	spi, clin

Les patients présentent une résistance au métronidazole et une sensibilité intermédiaire à ciprofloxacine, tétracycline, doxycycline, érythromycine, spiramycine pour le premier et spiramycine, clindamycine pour le second.

4-3-4- Résultat par famille d'antibiotique :

Tableau 4.8 : Résistance aux antibiotiques en % constaté avec l'antibiogramme chez les 18 patients.

Antibiotique	Amox	Metro	Spi	Doxy	Tétra	Ery	Clin	Min	Cip
Résistance	0	89%	11%	5%	5,5%	11%	11%	5,5%	5,5%
Résistance intermédiaire	0	0	55%	44%	39%	39%	28%	28%	28%

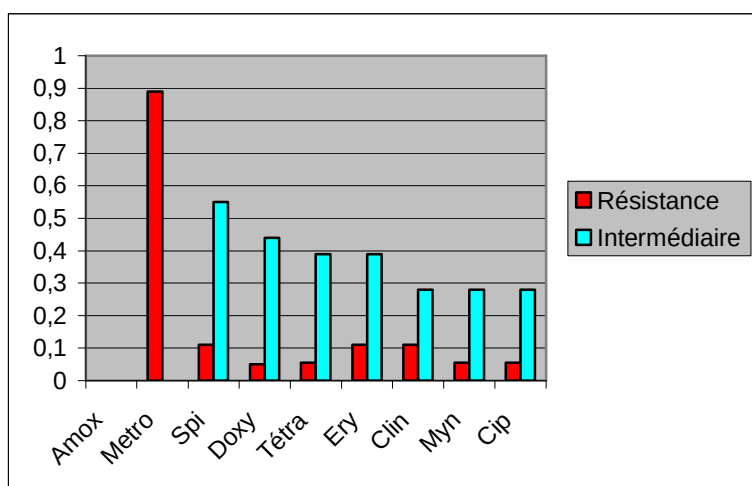


Diagramme 4.1 : Résistance aux antibiotiques en % chez les 18 patients

Une différence de choix d'antibiotique existe dans 89% des cas. Avec une résistance au métronidazole chez 16 patients sur 18. Il est à noter qu'aucune sensibilité intermédiaire n'a été trouvée pour cet antibiotique.

Une résistance pour la spiramycine de 11% des cas étudiés et une sensibilité intermédiaire dans 50% des cas.

Pour la doxycycline, une résistance de 5% et une sensibilité intermédiaire de 44% ont été mises en évidence, et pour la tétracycline 5,5% de résistance, 39% de sensibilité intermédiaire.

Pour la clindamycine il existe 28% de sensibilité intermédiaire et 11 % de résistance.

Pour l'érythromycine 39 % de sensibilité intermédiaire et 11% de résistance ont été trouvées.

Seulement 28% de sensibilité intermédiaire et 5,5 % de résistance ont été mises en évidence pour la minocycline, et pour la ciprofloxacine, une résistance de 5,5% et 28% de sensibilité intermédiaire.

4-4- Discussion :

Chaque prélèvement a été analysé dans le respect strict des protocoles utilisés dans le laboratoire. Les prélèvements analysés par PCR en temps réel, ont utilisé selon les règles de bonnes pratiques du laboratoire Carpegen® (à Munster, Germany) un protocole automatisé.

Les résultats à comparer sont donc établis à partir de protocoles parfaitement codifiés.

Chaque prélèvement a été effectué en même temps, au même site, en utilisant les mêmes cônes de papier, précautions qui permettent de réduire les variations à celles de la méthode d'analyse.

Une très forte proportion de résistance au métronidazole est à noter pour les bactéries prélevées. Elle représente 89 % des cas rencontrés dans cette étude. Ces résultats vont dans le même sens que ceux des études présentées à Europerio 2006 à Madrid :

« Microbiological pattern and periodontal pathogens resistance to metronidazole in patients needing prosthetic treatment » de Di Leo et « Microbiological testing: changing the target.

Exploring antibiotic resistences in a sample of periodontal patients in Spain. » de Pordomingo de l'équipe de Sanz.

Feres et al en 2002, avait déjà présenté des résultats de résistances des pathogènes parodontaux au métronidazole dans plus de 53% des cas étudiés en moyenne et pouvant aller jusqu'à 79%. Pour l'amoxicilline, une résistance des bactéries a été décrite à 0,5 %. Son étude était plus particulièrement orientée sur la résistance des bactéries pendant l'utilisation des antibiotiques à 3, 7, 14 et 90 jours. Elle montrait que la résistance augmentait pendant cette période, puis redescendait à sa valeur initiale. Si on projette cette hypothèse sur les bactéries de notre étude, les résultats trouvés sont très proches, et la résistance devrait encore augmenter pendant l'utilisation du métronidazole chez nos patients.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- un problème d'évolution de la sensibilité au métronidazole lié au protocole des cultures. Mais des tests de contrôle, par une méthode de détermination de la CMI en milieu liquide, nous ont confirmés les résultats de la méthode des disques. Cette technique d'antibiogramme consiste à inoculer dans 50µl d'un bouillon bactérien dense, successivement des solutions contenant des concentrations antibiotiques croissantes (de 0,25µg/ml à 128µg/ml) à 37°C pendant 72heures. La mesure de la Concentration Minimale Inhibitrice est la concentration antibiotique la plus faible pour laquelle aucune croissance bactérienne ne parvient à troubler visuellement la solution. Elle est définie par une analyse visuelle de l'opacité de la solution à l'œil nu et contrôlée par une mesure par un spectromètre (Colorimeter®6051, Jenway,USA). Les valeurs de densité optique inférieure à 0,24 sont considérées comme négatives.
- La réalisation des cultures suit les principes de bonnes pratiques qui font référence dans le domaine. Existe-t-il une possibilité d'interaction entre les antibiotiques utilisés pour

sélectionner les milieux et les bactéries incriminées ? La culture de *Fusobacterium nucleatum* nécessite la présence d'érythromycine dans le milieu de culture gélosé qui a un spectre proche de la spiramycine. Pour tous les autres milieux les composants n'interfèrent pas avec les pathogènes recherchés (cristal violet, bleu de méthylène...) et les autres antibiotiques sont utilisés pour détruire les bactéries à Gram positif.

- les patients de cette étude présentent des bactéries résistantes à cet antibiotique.
- il peut exister une variation de sensibilité à un antibiotique très prescrit aux cours des années dans une population.

Les niveaux de sensibilités intermédiaires semblent ne pas représenter une forte proportion pour les autres antibiotiques. Ces résultats sont en corrélation avec la littérature et les recommandations de l'AFSSAPS de juillet 2001, sauf pour la spiramycine où des sensibilités intermédiaires ont été retrouvées dans 50% des cas. Pour la doxycycline la résistance n'est que de 5% par contre les sensibilités intermédiaires sont de 44% ce qui semble être un résultat important, très proche de la tétracycline quand le cumul des deux résultats, résistance et résistance intermédiaire, est réalisé.

En effet, lors de la prescription des antibiotiques, les sensibilités intermédiaires seront considérées comme des résistances. Les variations de sensibilité induisant des variations de l'effet sur les bactéries pathogènes chez un patient seraient trop importantes et non prévisibles. Nous corrigeons donc les résultats en vue de prescription.

Le métronidazole présente une résistance de 89%, et donc le pourcentage de résistance passe pour la spiramycine à 61%, 50% pour l'érythromycine et 49% pour la doxycycline et pour la tétracycline 44,5% sur les pathogènes cultivés.

Pour avoir la possibilité d'avoir une activité anti-infectieuse prévisible sur plus d'un patient sur deux, pour les bactéries rencontrées, seules la clindamycine, la minocycline et la ciprofloxacine auraient ces capacités, ainsi que l'amoxicilline avec une sensibilité très supérieure.

En effet, 39% de résistance ont été mis en évidence pour la clindamycine, 33,5% pour la minocycline comme pour la ciprofloxacine, qui sont des antibiotiques moins utilisés dans l'arsenal anti-infectieux des parodontistes français.

Par contre chez les patients étudiés, l'amoxicilline ne présente que peu de résistance réelle et de sensibilité intermédiaire. Ce résultat est surprenant car c'est un antibiotique qui a été

beaucoup prescrit dans la population. Or l'utilisation à grande échelle engendre le plus souvent des résistances dans cette population.

4-5- Conclusion :

Il existe une forte différence de choix lorsque les prescriptions d'un antibiotique sont réalisées après utilisation d'un test de sensibilité aux antibiotiques par rapport au choix, en fonction des recommandations de l'AFSSAPS 2001, selon la présence des bactéries après analyse avec la PCR en temps réel. Seulement 18% de corrélation existe entre les deux méthodes soit deux patients sur 18.

Cette différence très significative est due à des variations de sensibilité aux antibiotiques par rapport aux références de l'AFSSAPS. Le métronidazole présente 89% de résistance sur les antibiogrammes après culture, 61% pour la spiramycine, mais aussi 49% pour la doxycycline. Pour les antibiotiques moins souvent utilisés en parodontologie en France, les résistances sont plus faibles : 39% pour la clindamycine ce qui correspond aux recommandations. Mais les résultats semblent plus favorables avec seulement 33,5% de résistance pour la ciprofloxacine et la minocycline.

Les bactéries rencontrées présentent le moins de résistance réelle et de sensibilité intermédiaire pour l'amoxicilline. Elle paraît être la molécule de choix notamment pour l'antibiothérapie de première intention sauf pour les patients présentant des allergies aux β -lactamines.

.

5-Etude comparative de la sensibilité de onze pathogènes parodontaux in vitro vis-à-vis de l'azithromycine versus érythromycine, spiramycine, clindamycine.



5-1-Introduction :

Selon les recommandations de l'AFSSAPS juillet 2001, les antibiotiques peuvent être utilisés pour les traitements des maladies parodontales chez les patients à risque et lors de parodontites agressives ou récidivantes. Les critères de choix d'un antibiotique sont orientés par les critères bactériologiques selon la nature de l'infection, les critères pharmacologiques tels que le spectre, la bactéricidie, la durée, la dose, les critères pharmacodynamiques comme l'absorption, la demie vie. Les macrolides jusqu'à présent présentent un intérêt en cas d'allergie aux pénicillines, mais ne sont pas des molécules de choix vis-à-vis des principales bactéries impliqués dans les maladies parodontales. La mise en œuvre des tests de sensibilité aux antibiotiques a montré que l'azithromycine présenterait une bonne efficacité et une bonne tolérance.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de l'azithromycine par rapport à l'érythromycine, la spiramycine, et la clindamycine chez des patients atteints de parodontites agressives.

L'utilisation d'antibiotiques ciblés vis-à-vis des pathogènes parodontaux impose l'identification de ces bactéries pathogènes et la réalisation d'un antibiogramme. Cette technique sera utilisée pour comparer la concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'azithromycine à l'érythromycine, la clindamycine et la spiramycine.

5-2 Les intérêts de l'azithromycine :

L'utilisation des macrolides présente un intérêt lors d'allergie aux pénicillines lors d'une antibiothérapie ou d'une antibioprophylaxie. Mais les macrolides ne sont pas des molécules de choix vis-à-vis des cibles des pathogènes parodontaux, avec des résistances importantes et différents problèmes d'interactions médicamenteuses (dérivés de l'ergot de seigle, cisapride, pimozide...), de risque d'interaction avec certains contraceptifs oraux; des problèmes de passage des membranes (bacille Gram-) et de perte d'affinité sur le site de fixation sur la sous unité 50S.

Aujourd'hui, de nouvelles molécules sont prescrites avec de nouvelles propriétés. L'azithromycine est une molécule qui présente une bonne tolérance avec une faible toxicité. Elle présente des avantages au niveau métabolique : notamment avec un métabolisme hépatique très faible (environ 5 %), une élimination principalement sous forme inchangée. La voie principale d'élimination est biliaire (60 à 70 %), avec un cycle entéro-hépatique, son élimination urinaire est faible (10 à 20 %)

Ces propriétés différentes seraient imputées à l'ajout d'une fonction amine en C9 qui permettrait en milieu acide une meilleure stabilité, une bonne lipophilie et une bonne pénétration à travers les membranes.

L'activité sur les bactéries se fait par blocage de la synthèse protéique (ss50S) et sa demi-vie est très longue de 20h en comparaison aux autres (tableau 5.1). Toutes ses propriétés mettent en évidence un intérêt pour l'azithromycine.

Antibiotique	Demi-vie	Forme liée
Erythromycine	2h: 1à 3g /j 10j	65%
Spiramycine	7h: 6 à 9 millions d'UI/j	10%
Clindamycine	3h : 600 mg /j	80-94%
Azithromycine	20h: 500 mg/j 3 j	20%

Tableau 5.1 : Propriétés pharmaco-dynamiques des antibiotiques

5-2 -Matériels et méthodes :

Les critères de non-inclusion sont des patients ayant subi des traitements antibiotiques et/ou parodontaux pendant les trois mois précédant l'analyse (qui pourraient modifier les données de l'antibiogramme).

Les critères d'inclusion sont les patients ayant moins de quatre sites actifs distincts. Quatre sites actifs avec des poches d'au moins 5mm de profondeur ont été choisis pour chaque patient comme critère d'inclusion. Les critères de choix des sites étaient les signes habituels de l'activité de la maladie : saignement spontané, perte d'attache, suppuration de poche, inflammation gingivale.

Nous avons utilisé les cultures destinées aux tests de sensibilité aux antibiotiques des patients atteints de maladies parodontales agressives de l'étude initiale (l'analyse des prélèvements par site ou par pool), pour réaliser cette étude. Les tests de sensibilité aux antibiotiques ont été réalisés après isolement et identification des bactéries pathogènes par la méthode de diffusion en milieu gélosé à partir de disques.

5-2.2- Procédures de culture anaérobies

Les protocoles de culture ont été effectués dans le laboratoire de parodontite et maladies générales LU46 (Faculté de chirurgie dentaire, Toulouse,) selon le protocole déjà décrit dans la seconde partie lors de l'étude des prélèvements par site ou par pool.

La validation d'un prélèvement nécessite une quantification sur milieu non sélectif supérieur à 10^5 bactéries par millilitre de milieu de transport. Le repiquage des CFU caractéristiques a permis de réaliser des cultures sur milieu sélectif afin de terminer leur identification. Ces subcultures ont permis la réalisation des tests de sensibilité aux antibiotiques lorsque l'identification était positive et la pureté du repiquage confirmée par l'aspect visuel et une coloration de Gram.

Les principales molécules antibiotiques testées et la charge testée étaient :

Erythromycine 15UI

Spiramycine 100µg

Clindamycine 2UI

Azithromycine 4µg

La résistance à une molécule antibiotique évaluée par un test de sensibilité en milieu gélosé correspond à une culture bactérienne avec un diamètre d'inhibition inférieur à 10mm autour du disque. La sensibilité intermédiaire correspondant aux diamètres intermédiaires d'inhibition sur la gélose c'est-à-dire un diamètre entre 10 et 15mm autour du disque antibiotique sans culture. La sensibilité des bactéries à un antibiotique est donc pour une culture à une distance de 15 à 30mm autour du disque d'antibiotique.

5-3- Résultats

Sur 120 prélèvements réalisés, 113 ont pu être exploités pour l'étude des prélèvements par site et par pool et 87 repiquages ont pu être utilisés pour réaliser et analyser cette étude. L'étude de comparaison s'est faite sur ces 87 prélèvements représentant 22 patients.

5-3-1-Résultats des tests de sensibilité en fonction des antibiotiques

	87 prélèvements	%
Sensibles	43	49,4%
Résistants	20	24,1%
Sensibilités intermédiaires	24	27,5%

Tableau 5.2 : résultats des tests de sensibilité des bactéries cultivées à l'azithromycine.

Sur les 87 prélèvements réalisés, les bactéries cultivées présentent une sensibilité à l'azithromycine dans 49,4% des cas et une résistance dans 24,1% des cas.

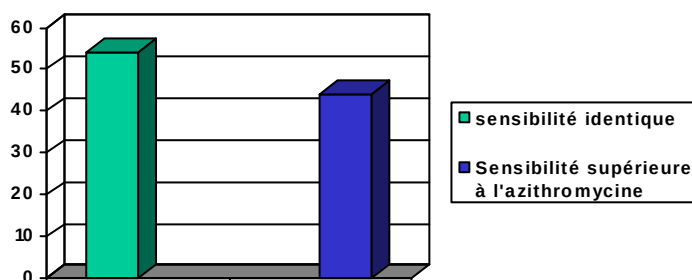


Diagramme 5.1 : Pourcentage de différence de sensibilité de l'azithromycine par rapport aux autres macrolides

- 54% des résultats sont identiques (diagramme 5.1) pour les trois antibiotiques que ce soit pour les résistances ou les sensibilités.
- 44% des prélèvements montrent que l'azithromycine est sensible ou présente une sensibilité intermédiaire alors que les bactéries cultivées sont résistantes aux autres antibiotiques.
- 2% des prélèvements sont sensibles à la clindamycine seule.

Si l'on ne considère que les sites où l'azithromycine est efficace contre les pathogènes parodontaux il existe 10 sites où les bactéries sont résistantes (soit 71 %, des cas) aux autres antibiotiques.

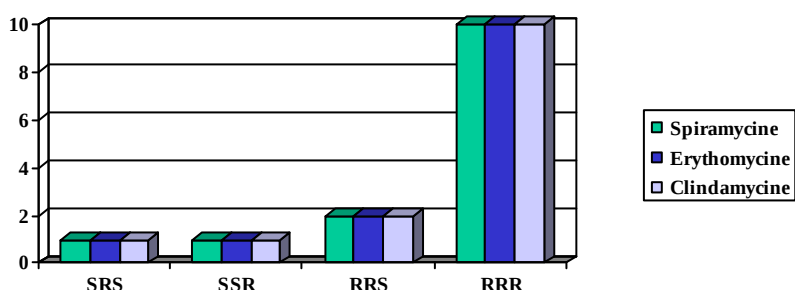


Diagramme 5.2 : Répartition de la sensibilité des autres macrolides sur les sites sensibles à l'azithromycine. (R : sites résistants et S : sites sensibles)

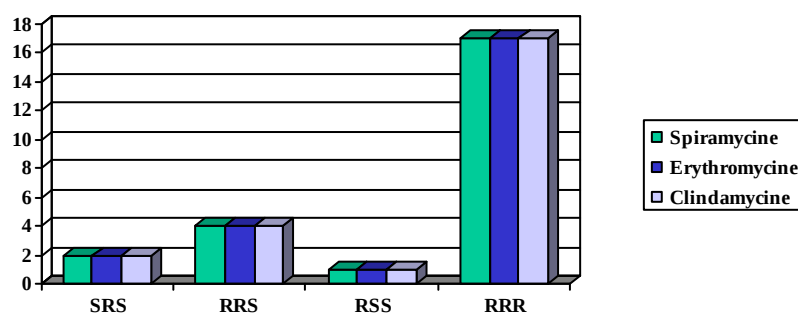


Diagramme 5.3: Répartition de la sensibilité des autres macrolides sur les sites de sensibilité intermédiaire à l'azithromycine.

Sur 24 sites de sensibilité intermédiaire pour l'azithromycine, il existe 17 sites soit **70,83%** des cas, où les bactéries sont résistantes à tous les autres antibiotiques. Par contre la clindamycine est active pour chaque prélèvement quand au moins un des deux autres est résistant.

5-3-2- Vis-à-vis des pathogènes parodontaux

Nous présentons les résultats de l'azithromycine seule vis-à-vis des pathogènes parodontaux cultivés. Répartition des 87 prélèvements sur 22 patients.

	<i>Aa</i>	<i>Pg</i>	<i>Pi</i>	<i>Bm</i>	<i>Cap</i>	<i>Ec</i>	<i>Fn</i>	<i>Cr</i>	<i>Pn</i>	<i>Tf</i>	<i>Fj</i>
Nbre	0	16	13	1	7	6	20	2	1	10	11
Sensible	0	6	7	1	3	1	9	0	0	6	3
Résistant	0	2	3	0	1	2	5	0	1	3	4
intermédiaire	0	9	3	0	3	3	6	2	0	1	4

Tableau 5.4 : Nombre de sites sensibles à l'azithromycine en fonction des différentes bactéries pathogènes rencontrées.

5-4- Discussion

5-4-1 Prélèvements significatifs :

Le nombre et la qualité des bactéries rencontrées semblent corrélés aux examens cliniques et à la littérature. Si certains pathogènes étaient en faible quantité, la flore totale était importante. Cela montre que le prélèvement a été réalisé dans de bonnes conditions ainsi que la culture. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* n'a jamais été isolé. Soit les patients ne présentaient pas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* soit nous avons été dans l'incapacité de le prélever ou de le cultiver. Cependant, il est à noter que la population de l'étude est représentée par des caucasiens, qui ne présentent que rarement *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

5-4-2- L'azithromycine :

Dans 44% des cas, l'azithromycine présente une activité inhibitrice plus efficace que l'érythromycine, la clindamycine et la spiramycine après l'analyse des antibiogrammes sur les souches étudiées. Ce résultat est significatif et favorable pour l'azithromycine par rapport aux autres macrolides.

De plus vis-à-vis des pathogènes parodontaux, il n'existe que 24,1% de résistance sur les prélèvements étudiés ce qui est peu pour cette famille d'antibiotiques. Mais il faut rajouter 27,5 % de sensibilités intermédiaires qui seront considérées comme résistantes.

L'azithromycine présenterait une efficacité *in vitro* supérieure aux autres macrolides. In vivo, des qualités pharmacodynamiques, notamment grâce à sa demi vie longue lui permettent une efficacité plus importante et un spectre adapté aux souches pathogènes étudiées (concentration effective longue).

Ces caractéristiques induisent un aspect négatif. En effet, la demi-vie longue est responsable d'un temps de maintien à une concentration sub-inhibitrice longue et génératrice de conditions favorables au développement de microorganismes résistants. Mais compte tenu des propriétés de cet antibiotique des précautions doivent être prises pour les patients sous anticoagulants oraux, sachant que ces patients sont de plus en plus nombreux.

La posologie par contre est nettement en faveur de son utilisation, car seulement trois jours de prescriptions suffisent au traitement avec une prise quotidienne. Ce mode de prescription va forcément augmenter la qualité de l'observance par les patients.

5-5- Conclusion

L'azithromycine semble présenter des avantages au niveau de son activité par rapport à l'érythromycine, la spiramycine et la clindamycine. Elle présente donc une activité inhibitrice plus importante et un spectre plus adapté aux micro-organismes pathogènes étudiés avec une. Son mode de prescription pouvant favoriser son observance auprès des patients, elle permettrait une souplesse nouvelle lors des prescriptions d'une antibiothérapie notamment en cas d'allergie aux β lactamines.

6- Les profils bactériens

6-1 Introduction

Lors des différentes études sur les prélèvements bactériens réalisés par culture au Laboratoire de « parodontite et maladies générales » de Toulouse, il est apparu sur une population de trente patients, que la présence de pathogènes parodontaux pouvait permettre de constituer des groupes de patients. La détermination du profil permettrait de mettre en place des protocoles de prises en charge clinique en fonction de l'appartenance à ces profils.

L'objectif de cette étude est de définir des profils bactériens à partir de l'analyse par PCR en temps réel de prélèvements effectués chez 157 sujets. Seul le diagnostic bactérien est recherché dans cette étude. La méthode de prélèvement et d'analyse utilisée est le *Paro-diagnostic* de chez GABA® analysé par le laboratoire Carpegen® (Munster, Allemagne).

6-2- Matériel et méthode :

6-2-1 Patients et sites de prélèvement

La population est composée de 157 sujets consultant pour une parodontite active au centre de soins de la faculté de chirurgie dentaire et en cabinet privé. Le diagnostic est confirmé par l'examen clinique et radiologique. Ces patients n'ont pas subi d'antibiothérapie les trois mois précédant la consultation. L'âge n'était pas un critère de sélection.

Les critères de non-inclusion des patients sont :

- des patients ayant eu des traitements antibiotiques et/ou parodontaux pendant les trois mois précédant l'analyse (qui pourraient modifier les données de l'antibiogramme),
- des patients ayant moins de quatre sites actifs distincts.

Quatre sites actifs avec des poches d'au moins 5mm de profondeur ont été choisis pour chaque patient. Après un examen radiographique, la poche parodontale la plus profonde a été choisie dans chaque secteur.

Le même type de sonde parodontale a été utilisé pour calculer la profondeur des différentes poches. Pour éviter les transferts de pathogènes d'une poche à une autre avec la même sonde, nous avons utilisé des sondes stériles à chaque site de prélèvement.

Les critères de choix des sites étaient les signes habituels de l'activité de la maladie : saignement spontané, perte d'attache, suppuration de poche, inflammation gingivale.

Le site choisi a été nettoyé au sérum physiologique et à la compresse stérile pour éliminer le biofilm bactérien supra gingival, et séché avec la seringue à air. Des échantillons ont été prélevés avec les pointes de papier stériles endodontiques tenus avec une précelle stérile: une seule pointe de papier a été insérée, sans forcer, dans la poche choisie pendant 10s, jusqu'à la résistance de la pression.

Elle a été alors placée dans un tube avec les autres prélèvements des sites sélectionnés par patient. Les prélèvements ont été envoyés pour l'analyse en PCR en temps réel au laboratoire spécialisé (Carpegen® GmbH, Münster, Allemagne).

6-2-2- Le Paro-diagnostic Meridol® :

Ce kit est très facile d'accès pour tous les praticiens, aussi bien par sa disponibilité que son utilisation. Cette méthode précédemment utilisée dans ce travail, détecte l'ADN bactérien de six pathogènes parodontaux, vivants ou morts : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola*. En plus de cette identification, la charge bactérienne totale des échantillons a été également évaluée.

Nous avons employé la même technique de prélèvement de transport et de répartition que pour la méthode de culture, en insérant un cône ROEKO® dans quatre sites et tous directement déposés dans les tubes de transport de SARSTEDT AG et de CO®. Les échantillons de plaque ont été envoyés au laboratoire (Carpegen GmbH, Münster, Allemagne). Les cellules ont été soumises au processus automatisé de l'analyse du test *Meridol® Paro-diagnostic* (GABA international, Münschenstein, Suisse).

L'ADN génomique bactérien a été isolé et purifié selon les instructions du fabricant. Les amorces et les sondes du système *Meridol® Paro-diagnostic* ont été sélectionnées pour être fortement spécifiques pour l'ADN ribosomal (rDNA) des pathogènes parodontaux ciblés.

La PCR en temps réel a été effectuée avec 2µl de l'ADN extrait comme calibre dans un mélange de la réaction contenant les ensembles appropriés de sonde, d'amorce et le mélange universel de TaqMan® PCR.

Deux jours après l'envoi des prélèvements, un rapport d'analyse est reçu et montre le nombre de micro-organismes détectés et la charge bactérienne par fax ou une semaine à dix jours par courrier.

6-3 Résultats :

6-3-1 -Présence des pathogènes

Sur 157 patients, tous les prélèvements ont été analysés et pris en compte dans cette étude. Aucun des prélèvements n'a été endommagé ou perdu.

Certains profils de patients sont apparus lors de l'analyse des prélèvements bactériens. Les profils les plus importants ont été retenus avec une représentativité supérieure à 2% sur les 157 patients.

Le profil majoritaire représentant 53,5% des cas de l'ensemble de ces patients contient les pathogènes suivants : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*,

Puis une forte diminution de la prévalence des profils est notée, puisque le profil suivant ne représente que 13% des cas, avec *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*.

Tous les pathogènes ciblés par cette méthode ont été retrouvés dans 9,5% des cas.

Aggregatibacter actinomycetemcomitans n'a été retrouvé que dans 9,5% des cas en association avec tous les autres pathogènes mais il est présent avec d'autres pathogènes dans des profils particuliers représentant des proportions faibles inférieures à 2%.

Profils bactériens	Pourcentage (%)
Profil 1: <i>Pg, Tf, Td, Fn Pi</i>	53,5%
Profil 2: <i>Pg, Tf, Td, Fn</i>	13%
Profil 3: <i>Aa, Pg, Tf, Td, Fn, Pi</i>	9,5%
Profil 4: <i>Tf, Td, Fn, Pi</i>	6,3%
Profil 5: <i>Tf, Td, Fn</i>	3,82%

Tableau 6.1 : 5 profils de patients les plus fréquents en fonction du pourcentage de leur présence

La prévalence de chaque pathogène pris individuellement est comparée, des fortes proportions de présence sont constatées. *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* et *Fusobacterium nucleatum* sont présents pratiquement dans chaque prélèvement. Puis *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* sont un peu moins présents mais restent à de forts pourcentages et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est en beaucoup plus faible représentation avec seulement 17% de présence.

Bactéries pathogènes	Pourcentage (%)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	17%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	84%
<i>Tannerella forsythia</i>	100%
<i>Treponema denticola</i>	92%
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	99%
<i>Prevotella intermedia</i>	72%

Tableau 6.2 : Pourcentage de présence des bactéries pathogènes

La présence des bactéries pathogènes est un résultat important, mais il est impératif de mettre en évidence la concentration de ces pathogènes, car la technique avec la PCR en temps réel permet de mettre en évidence des bactéries pathogènes à partir d'un seuil de 100 copies

d'ADN. Cela est extrêmement faible et la pathogénicité de ces bactéries à cette concentration peut être discutée.

6-3-2 -Concentration des pathogènes

Le diagramme 6.1 permet de visualiser la quantification moyenne de chaque bactérie pathogène.

Porphyromonas gingivalis, *Treponema denticola*, *Tannerella Forsythia* sont les bactéries pathogènes les plus présentes. Elles sont présentes à des concentrations importantes, mais avec des écarts types pouvant être importants, alors que *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* représentent des concentrations plus faibles et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* très faible, mais avec peu d'écart entre les différentes valeurs.

Les écarts types nous permettent d'évaluer la variation de quantification dans chaque groupe.

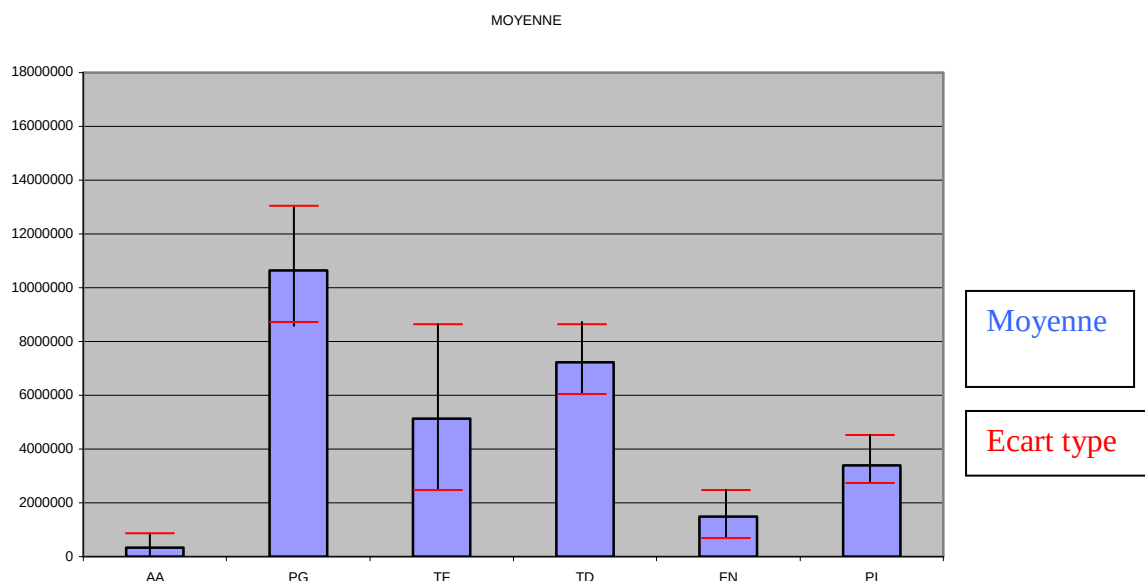


Diagramme 6.1 : Moyenne et écart type en fonction des bactéries pathogènes ciblées

6-4 Discussion :

Le choix du laboratoire Carpegen® (GmbH, Münster, Allemagne) s'est imposé naturellement en raison de la disponibilité de ce laboratoire pour traiter des prélèvements en nombre importants. De plus notre équipe a validé la technique de cette analyse par PCR en temps réel,

par rapport à la technique de culture en conditions anaérobies. Les bactéries pathogènes et les concentrations rencontrées valident la qualité des prélèvements et des transports.

L'utilisation des sondes nous expose à un ciblage de la recherche des bactéries pathogènes. Ce ciblage est réalisé sur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola*. Cela ne veut pas dire qu'il n'existe pas d'autres pathogènes présents. Il faudrait avoir plus de sondes ciblées sur plus de pathogènes. Mais déjà dans le ciblage de cette étude, des profils bien différents ont été définis.

La première remarque est que les pathogènes sont très présents dans tous les prélèvements sauf *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Cependant 17% des patients présentent *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ce qui peut paraître un résultat important car il caractérise de maladies parodontales agressives, notamment sur de jeunes patients.

Nous pouvons avoir une technique présentant trop de faux positifs, mais cette technique a été comparée dans une précédente étude. Cette comparaison a montré des résultats proches avec la technique de référence, la culture bactérienne. Par contre en analysant les concentrations, des pathogènes n'auraient pas été mis en évidence par la culture à cause du seuil de détection qui est de 10^3 pathogènes (Teles et al. 2006).

Les prélèvements ont été proposés à des patients présentant des parodontites actives avec des poches supérieures à 5mm. On peut donc penser que l'agressivité de la forme clinique s'exprime par les fortes présences de pathogènes parodontaux chez ces patients.

Pour *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, ces pathogènes sont présents et avec une prévalence importante et une forte concentration, ce qui suppose une virulence importante (Teles et al.2006).

Les prévalences de bactéries pathogènes peuvent être comparées en fonction des régions géographiques avec des analyses reportées dans l'article de Socransky et al 2005, avec 58 patients du Brésil, 26 du Chili, 114 de Boston, 101 de Suède en fonction de la composition du biofilm. Nous pouvons d'abord constater que notre échantillon est plus important puisque notre étude porte sur 157 patients.

Lors de l'étude de Socransky, 39 espèces différentes ont été étudiées. Dans notre étude, seulement 6 espèces sont étudiées car seulement 6 cibles sont définies par le kit de prélèvement Meridol® *Paro-diagnostic*. Quoi qu'il en soit, si les pathogènes sont présents lors des détections par sondes, qu'on analyse 39 ou 6 espèces, la prévalence de ces bactéries reste toujours la même, seule la proportion globale change.

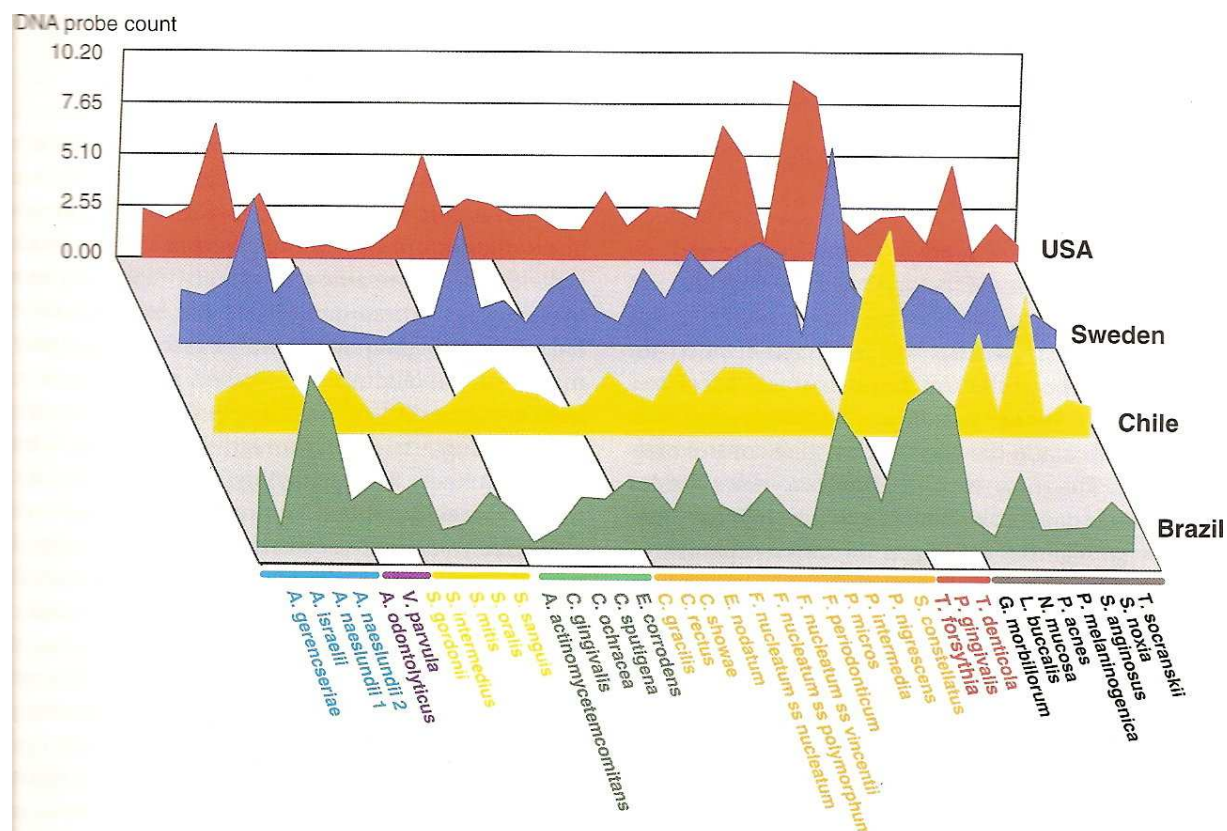


Diagramme 6.3 : tiré de l'article d'Haffajee et Socransky Periodontology 2000 vol. 38, 2005.

Si on compare les bactéries pathogènes étudiées dans notre étude et plus particulièrement le complexe rouge (*Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*), les américains, les suédois, les chiliens, et les brésiliens présentent une forte proportion de *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, et *Tannerella forsythia* mais ne dépassant pas les 10% en pourcentage corrigé. Une plus forte titration pour les suédois avait été trouvée,

en comparaison des autres, et une plus grande proportion de *Porphyromonas gingivalis* pour les chiliens et de *Treponema denticola* pour les brésiliens.

Mais notre étude présente une plus forte prévalence de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, et *Tannerella forsythia*, et de très loin, puisque la prévalence monte jusqu'à 70% des cas étudiés.

Pour *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, les américains et les suédois dans l'étude de Socransky présente 5 à 7% de prévalence alors que les brésiliens sont en dessous de 2%. Pour *Fusobacterium nucleatum* les proportions restent identiques en fonction des populations vers 3%. Pour *Prevotella intermedia* les groupes semblent identiques pour les brésiliens et les américains qui présentent 6%, les chiliens 2% et les suédois 4 à 5% des pathogènes présents.

Les différences rencontrées peuvent être dues aux habitudes d'hygiène bucco-dentaires des pays, aux traditions culinaires, aux habitudes de vie mais aussi aux pourcentages de fumeurs. Dans l'étude de Socransky, les auteurs mettent en évidence 2% de fumeur dans la population étudiée au Brésil, pour 62% en Suède. Sachant que ces comportements influencent la prévalence des Bactéroïdes, une variation de l'écologie bactérienne peut être liée à ce paramètre.

Les différences de biofilm entre les pays pour les sujets étudiés sont importantes alors que les signes cliniques semblent être identiques. Cela peut avoir une influence sur le type de thérapeutique indiquée et leur résultat. Par exemple, Almaguer-Flores et al. 2006, ont étudié une population mexicaine atteinte de parodontite. Ils se sont aperçus que les mexicains réagissaient très bien aux différentes thérapeutiques et présentaient peu de résistances aux antibiotiques. Il semblerait donc que la faible fréquence et le faible nombre de prise en charge anti-infectieuse de ces patients pendant leur vie, leur permettent une meilleure efficacité des thérapeutiques.

Si une différence existe entre les continents, des différences existent aussi entre pays d'un même continent. Une étude présentée à l'IADR 2005 à Amsterdam comparait les profils bactériens et les résistances aux antibiotiques en Espagne avec l'équipe de Sanz et en Hollande avec l'équipe de van Winkelhoff (2005). Les auteurs ont conclu à une différence de susceptibilité aux bactéries pathogènes ainsi qu'à une différence de sensibilité aux antibiotiques entre les deux pays. Cette étude montre qu'il n'est pas possible de développer un

protocole uniforme à l'usage des antibiotiques et aux traitements des maladies parodontales entre ces deux pays.

6-5 Conclusion

Les sujets inclus et analysés dans le cadre de cette étude présentaient des profils bactériens avec de fortes similitudes. Ces similitudes ont permis de les classer en 5 catégories. Un profil contenant *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* et *Fusobacterium nucleatum*, prédomine avec 53,5% de présence chez les 157 patients étudiés.

La prévalence des bactéries pathogènes du complexe rouge par rapport à celles rencontrées dans d'autres pays, semble dominer dans notre étude. Par contre les autres bactéries pathogènes présentent une prévalence proche de celles décrites dans le monde. Ces résultats orientent la prise en charge des maladies parodontales vers la réalisation de protocole adapté à chaque pays. Des thérapeutiques différentes seront donc mises en place en fonction des profils rencontrés, mais aussi en fonction des différences liées aux variations d'écologie, d'habitudes de vie et de thérapeutiques.

Conclusion :

Les prélèvements bactériens que ce soit par la technique moléculaire par PCR en temps réel ou par la technique d'analyse par la culture en conditions anaérobies, semblent présenter un grand intérêt lors de la prise en charge des maladies parodontales.

La mise en évidence de certaines espèces bactériennes permet aux praticiens de classer les patients dans des degrés de risques infectieux et d'activités plus ou moins importantes de la maladie. Le profil bactérien étant établi, l'équipe soignante peut alors définir la thérapeutique la mieux adaptée et notamment la prise en charge anti-infectieuse. L'antibiothérapie des patients atteints de maladie parodontale sera prescrite en fonction de chaque patient et le choix d'une molécule et d'une posologie sera adapté en fonction des diagnostics bactériens rencontrés.

Les cultures permettent une étude non spécifique des pathogènes parodontaux avec la possibilité de réaliser un test de sensibilité aux antibiotiques (antibiogramme), ce qui reste aux vues des résultats, la technique de référence, notamment avec l'utilisation de milieux de transport spécifique à chaque site. En effet, l'étude menée sur la technique de prélèvement et de transport nous oriente vers la technique par culture, à utiliser des milieux de transport spécifique à un site donné. Dans 61,53% des cas nous n'avons pas trouvé le même résultat entre les pools et les sites spécifiques. Cela entraîne une grande variation de sensibilité *in vitro* entre les cultures bactériennes et les neuf antibiotiques testés en fonction des espèces analysées et montre la variation de sensibilité des espèces selon les sites pour une même espèce de bactérie.

Cependant la limitation liée aux prélèvements et à l'analyse des bactéries pathogènes vivantes donne tout son sens à une analyse moléculaire. L'étude sur la comparaison des diagnostics bactériens après utilisation des cultures anaérobies et de la PCR en temps réel montre que ces techniques permettent d'établir un diagnostic bactériologique proche de la technique de référence avec une précision plus importante grâce à son seuil de détection et à l'affinité des sondes aux bactéries ciblées. La PCR en temps réel semble être la technique la plus appropriée pour la détection et la quantification des pathogènes ciblés lors du diagnostic et lors de la maintenance. Cela va permettre la démocratisation de l'utilisation des prélèvements pour le diagnostic bactérien dans les cabinets dentaires, et diminuer la part probabiliste des prescriptions d'antibiotiques. Mais dans notre travail seul un nombre restreint de sondes

ciblées sur les bactéries pathogènes les plus importantes a pu être utilisé, car les kits à la disposition des cabinets présentent un nombre restreint de cibles. Le développement de nouvelles sondes permettrait un diagnostic plus large.

Par contre, seules les techniques conventionnelles de culture permettent la réalisation d'un test de sensibilité aux antibiotiques. La PCR en temps réel s'appuie sur les données de la littérature et notamment les recommandations de l'AFSSAPS pour établir les prescriptions des antibiotiques en fonction des bactéries pathogènes retrouvées. La prescription est donc basée sur une moyenne de sensibilité des antibiotiques face à des bactéries pathogènes dans une population. Cela diminue la part probabiliste de la prescription, ce qui est déjà très intéressant au regard des pratiques actuelles, mais elle n'est pas adaptée à chaque sensibilité des bactéries de chaque patient.

Or de grandes différences ont été retrouvées entre les données de la littérature et les populations étudiées dans ce travail. La méthode par culture pour les macrolides et macrolides apparentés sur les patients analysés présente une augmentation des résistances. Cette différence est très significative pour le métronidazole, 89% des bactéries présentent des résistances à cet antibiotique, 61% d'entre elles présentent une résistance pour la spiramycine, mais aussi pour la doxycycline dans 49% des cas.

Pour la tétracycline et la clindamycine les résultats correspondent aux recommandations. Pour les antibiotiques moins souvent utilisés en parodontologie en France, les résultats semblent plus favorables avec seulement 33,5% des bactéries étudiées présentent des résistances à la ciprofloxacine et à la minocycline.

Par contre, de très bonnes sensibilités ont été décrites pour l'amoxicilline en fonction des bactéries étudiées.

A ce niveau, seules les cultures seraient, malgré leurs limitations, indiquées pour orienter une prescription d'antibiotiques adaptées aux sensibilités bactériennes de chaque patient.

Ces résultats confirmés par d'autres équipes européennes comme celle de Sanz, nous orienteraient à réévaluer les recommandations des prescriptions d'antibiotiques en fonction des bactéries pathogènes rencontrées pour permettre une utilisation plus rationnelle de la PCR en temps réel.

Ces variations de sensibilités aux macrolides ont orientées notre travail vers une analyse et une comparaison d'une molécule récente peu utilisée telle que l'azithromycine avec les autres macrolides. L'étude *in vitro* de comparaisons des sensibilités des bactéries pathogènes entre

l'azithromycine versus érythromycine, spiramycine, et clindamycine, a montré que dans 44% des cas, l'azithromycine présente une activité inhibitrice plus efficace que l'érythromycine, la clindamycine et la spiramycine après l'analyse des antibiogrammes sur les souches étudiées.

L'azithromycine semble présenter des avantages tant au niveau de son activité que de sa pharmacodynamique, lui permettant une efficacité plus importante et un spectre plus adapté aux bactéries pathogènes étudiées avec une bonne tolérance.

Après avoir travaillé sur les moyens diagnostics bactériens et la compatibilité avec une prescription antibiotique, il est apparu intéressant de mettre en évidence les profils bactériens de nos patients par rapport aux résultats obtenus dans d'autre pays. Une étude sur le diagnostic bactérien grâce à la PCR en temps réel, a permis de classer 157 patients dans des groupes en fonction des bactéries présentes. Cinq groupes ont été mis en évidence. Un groupe contenant *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* et *Fusobacterium nucleatum*, prédomine avec 53,5% de présence. En analysant chaque bactérie, notre population présentait pour le complexe rouge une fréquence et une concentration importante, en comparaison avec les études de Socransky et al 2005, qui comparait les prévalences des pathogènes chez des patients de Boston, avec ceux du Brésil, de la Suède, et du Chili.

Ce profil majoritaire suppose un risque d'aggravation de la maladie, et justifie un traitement mécanique associé à une antibiothérapie complémentaire. Mais la notion de profil de patient atteint de maladie parodontale semble introduire une incapacité à uniformiser les patients et les traitements en fonction des pays. Des nouveaux profils de patients actuellement rencontrés en France pourraient être donc proposés pour avoir un outil de recommandation thérapeutique plus adapté.

L'adéquation entre les patients, aussi bien sur leur profil bactérien que les sensibilités des bactéries pathogènes aujourd'hui présentes, et la grande fiabilité de la PCR en temps réel pourrait être réalisée. Cette corrélation permettrait d'utiliser ces techniques adaptées pour le plus grand nombre de praticiens. Elle permettrait de diminuer la part probabiliste et iatrogène dans le choix des antibiotiques ainsi que la validité des plans de traitements, même si la technique de culture anaérobie reste malgré ces limitations la technique de référence. Ainsi, l'utilisation des prélèvements bactériens lors de la prise en charge des maladies parodontales permet une plus grande qualité et fiabilité de la prise en charge de nos patients.

Références

1. AFSSAPS : Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie recommandations et argumentaires, juillet 2001
2. Almaguer-Flores A, Moreno-Borjas J-Y, Salgado-Martinez A, Sanchez-Reyes MA, Alcantara-Maruri E, Ximenez-Fyvie L. Proportion of antibiotic resistance in subgingival plaque samples from Mexican subjects. J Clin Periodontol 2006 ;**33** (10) : 743–748.
3. Armitage GC. Developpment of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol 1999;**4**: 1-6.
4. Axelsson P, Nystrom B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. J Clin Periodontology, 2004: **31**(9): 749-54
5. Baehni P., Giovannoli JL. Patient profile and decision-making in periodontal practice . Periodontology 2000 2004;**36**:27-34
6. Beickler T, Abdeen G, Schnitzer S, Salzer S, Ehmke B, Heinecke A, Fleming TF. Microbiological shifts in intra and extra habitats following mechanical periodontal therapy. J Clin Periodontol 2004;**31**:777-783.
7. Bollen CM, Mongardini C, Papaioannou W, van Steenberghe D, Quirynen M. The effect of one-stage 6 full-mouth disinfection on different intra-oral niches. Clinical and microbiological observations. J Clin periodontol 1998;**25**:56-66.
8. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. J Periodont Res 2006;**41**:252-258.
9. Bouchard P, Boutouyrie P, Catherine Mattout C, Bourgeois D. Risk Factors for Severe Periodontal Attachment Loss. J Periodontol 2006 :**77** (3): 479-489
10. Bragd L, Dahlén G, Wikström M, Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. J Clin Periodontol 1987: **14**(2): 95-99.

11. Christerson LA, Slots J, Zambon JJ, GencoRJ. Transmission and colonisation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. J Periodontol 1985;**56**:127-131.

12. Dahlen G, Wilkstrom M, Renvert S. Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. A 5-year follow-up individual patterns. J periodontal 1996;**67**:979-887.

13. Darby IB, Hodge PJ, Riggio MP, Kinane DF. Clinical and microbiological effect of scaling and root planing in smoker and nonsmoker chronic and aggressive periodontitis patients. J Clin Periodontol 2005;**32**:200-206.

14. Drisko CH, Lewis LH. Ultrasonic instruments and antimicrobial agents in supportive periodontal treatment and retreatment of recurrent or refractory periodontitis. Periodontol 2000. 1996; **12** : 90-115.

15. Dzink JL, Tanner ACR, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. J Clin Periodontol 1985; **12**: 648-659.

16. Eickholz P, Dannewitz B, Ti-sun K. Antibiotics in periodontal therapy. Perio 2005; **4**:235-251.

17. Ezzo PJ, Cutler CW. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. Periodontol 2000. 2003; **32**: 24-35.

18. Feres M, Haffaje A. D., Allard K., Som S., Goodson J. M. , Socransky S. S. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy J Clin Periodontol 2002;**29** (8):724–735.

19. Fine DH, Kaplan JB, Kachlany SC, Schreiner HC. How we got attached to: a model for infectious diseases periodontal 2000 2006;**42**:114-157.

20. Haffajee AD, Torresyap G, Socransky SS. Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1-year results. J Clin Periodontol 2007;**34**:243-253.

21. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. *Periodontol 2000* 2006;**43**: 7-12
22. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;**24**:324-334.
23. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994; **5**: 78-111.
24. Haffajee AD, Socransky SS, Smith C, Dibart S. The use of DNA probes to examine the distribution of subgingival species in subjects with different levels of periodontal destruction. *J Clin Periodontol* 1992; **19**: 84-91.
25. Haubek D, Poulsen K, Asikainen S, Kilian M. Evidence for absence in northern Europe of especially virulent clonal types of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(2): 395-401.
26. Haubek D, Poulsen K, Westergaard J, Dahlen G, Kilian M. Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *J Clin Microbiol* 1996; **34**(6): 1576-1578.
27. Haubek D, Westergaard J. Detection of a highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (JP2) in a Moroccan immigrant family with multiple cases of localized aggressive periodontitis. *Int J Paediatr Dent* 2004; **14**(1): 41-48.
28. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; **6**(10): 986-994.
29. Herrera D, Sanz M, Jepsen S, Needleman I, Roldan S, A systematic review on the effect of systemic antimicrobials as an adjunct to scaling and root planning in periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 2002;29(Suppl.3):136-159
30. Hohfeld M, Bernimoulin JP. Application of the Community Periodontal Index of Treatment Needs (CPITN) in a group of 45–54 year- old German Factory Workers. *J Periodontol* 1993; **20**: 551–556.

31. Holdman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia: 1977.
32. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT & Williams ST. *Bergey's Manual® of Determinative Bacteriology*, 9th ed., Baltimore: Williams & Wilkins: 1994: 787.
33. Jenkins WMM, MacFarlane T. W. , Gilmou W. H. r, Ramsay I, MacKenzie D. Systemic metronidazole in the treatment of periodontitis J Clin Periodontol 1989;**16** (7): 443–450.
34. Jervøe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen J. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2005: **32**: 778-783.
35. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ JR. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Rev 2002: **66**: 486-505.
36. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. Oral Microbiol Immunol 2005: **20**: 244–252.
37. Lakhssassi N, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual and intraindividual variability study. Abstract 425/81P of 6th European Congress of Chemotherapy and Infections. December 1-3, Paris. Int J Antimicrob Agents 2004: **24**(Suppl.2): S151.
38. Lakhssassi N, Sixou M. Efficacy variation of erythromycin and spiramycin on periopathogens in aggressive periodontitis. An in vitro comparative study. Pathol Biol 2005: **53**(8-9):527-535.
39. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martin C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparaison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forthyensis* in subgingival plaque samples. J Clin Periodontol 2004: **31**: 1061-1069.
40. Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B. Effect of long-term tetracycline therapy on human periodontal disease. J clin Periodontol 1983;**10**:590-601.

41. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. J Periodontol 1976; **47**(1): 1-18.
42. Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. J Periodontol 1992; **63**(4 Suppl): 332-337.
43. Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontol 2000. 1994; **5**: 52-65.
44. Loesch WJ, Lopatin DE, Stoll J, Van Poperin N, Hujoel PP. Comparaison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? J Clin Microbiol 1992; **30**: 418-426.
45. Loesch WJ, Syed SA, Morison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll. Metronidazole in periodontitis. I Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. J periodontal 1984; **55**:325-335.
46. Lyons SR, Griffen AL, Leys EJ. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. J Clin Microbiol. 2000; **38**(6): 2362-2365.
47. Mashimo PA, Yamamoto Y, Nakamura M, Slots J. Selective recovery of oral *Capnocytophaga* spp. with sheep blood agar containing bacitracin and polymyxin B. J Clin Microbiol 1983;17(2):187-191.
48. Marsh PD, Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub-and supra gingival environment. Oral Dis 2003;**9**:16-22.
49. Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. J Clin Microbiol 2002; **40**(5): 1698-1704.
50. Mellado JR, Freedman AL, Salkin LM, Stein MD, Schneider DB & Cutler RH. The clinical relevance of microbiologic testing: a comparative analysis of microbiologic samples secured from the same sites and cultured in two independent laboratories. Int J Periodontics Restorative Dent 2001; **21**(3): 232-239.
51. Mellado JR, Freedman AL, Mellado JR, Stein MD, Schneider DB, Butler L. The clinical relevance of microbiologic testing. Part 2: a comparative analysis of microbiologic samples

secured simultaneously from the same sites and cultured in the same laboratory. Int J Periodontics Restorative Dent 2003; **23**(2): 121-127.

52. Mombelli A, McNabb H, Lang NP. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. I. Topographic distribution in the human dentition. J Periodontal Res 1991; **26**(4): 301-307.
53. Mombelli A. Do new diagnostic tests improve the differential diagnosis and therapy of periodontitis? A review. Schweiz Monatsschr Zahnmed 1992; **102**(2): 163-171.
54. Mombelli A. Parodontaldiagnostik. Die rolle der Mikrobiologie. Schweiz Monatsschr Zahnmed 1994; **104**: 49-54.
55. Mombelli A, Schmit B, Rutar A, Lang NP. Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* after mechanical therapy of periodntoal disease. J Periodontol 2000;**71**:14-21.
56. Moore WEC, Moore LVH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontal 2000 1994;**5**:66-77.
57. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. Microbiology 2002; **148**(Pt1): 257-266.
58. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen.non., comb.nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. Nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiolo **56**(2006),2135-2146.
59. Petresilka Gj, Ehmke B, Flemming TF. Antimicrobial effects of mechanical debridement. Periodontol 2000 2002;**28**:56-71.
60. Poulsen K, Ennibi OK, Haubek D. Improved PCR for detection of the highly leukotoxic JP2 clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque samples. J Clin Microbiol 2003; **41**(10): 4829-4832.

61. Quirynen M , Teughels W, van Steenberghe D. Microbial shifts after subgingival debridement and formation of bacterial resistance when combined with local or systemic antimicrobials Oral Diseases 2003;**9** (s1), 30–37.
62. Quirynen M, Mongardini C, Pauwels M, Bollen, CM Van Eldere J, Van Steenberg D. One stage full-versus partial mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. II Long term impact on microbial load. J Periodontol 1999;70:646-656.
63. Reischl U, Wittwer C, Cockerill F. Rapid cycle Real-Time PCR: Methods and applications. Microbiology and food analysis. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002: 258.
64. Renvert S, Wikström M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pokets. J clin Periodontol 1990;**17**:345-350.
65. Sato K, Yoneyama T, Okamoto H, Dahlen G, Lindhe J. The effect of subgingival debridement on periodontal disease parameters and the subgingival microbiota. J Clin Periodontol 1993;**20**:359-365.
66. Shiloah J, Patters MR. Repopulation of periodontal pokets by microbial pathogens in the absence of supportive therapy. J periodontol 1996;**67**:130-139.
67. Sixou M, Duffaut-Lagarrigue D, Lodter JP. A comparison between 4 subgingival bacteriologic sampling technics. J Biol Buccale 1991; **19**(1): 16-21.
68. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. Oral Dis 2003; **9**(Suppl.1): 54-62. Review.
69. Sixou M. Prescire en odontologie. Paris éditions Cdp 2005.
70. Slee AM, Tanzer JM. Elective medium for isolation of *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. J Clin Microbiol 1978;8(4):459-493.
71. Slots J. Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol 1979; **6**: 351-382.

72. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Microbiol 1982; **15**(4): 606-609.
73. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Immunol 1986a; **1**(1): 48-57.
74. Slots J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of recent work. J Clin Periodontol 1986b; **13**(10): 912-917.
75. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 1988; **15**(2): 85-93.
76. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1988; **3**(2): 47-52.
77. Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. J Periodontol 1992; **63**(4 Suppl.): 322-331.
78. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. J Periodontol 1993; **64**(8 Suppl): 754-759.
79. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent Jr RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol 1998; **25**(2): 134-144.
80. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; **28**: 12-55.
81. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontol 2000. 2005; **38**: 135-187.
82. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Loe H, experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. J Periodontal Res 1966;**1**: 1-13.
83. Teles RP, Haffajee AD, Socransky SS. Microbiological goals of periodontal therapy. Periodontol 2000 2006; **42**: 180-218.

84. Tuan MC, Nowsari H, Slots J; Clinical and microbiologic study of periodontal surgery by means of apically positioned flaps with and without osseous recontouring. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2005;**20**:468-475.
85. Tonnetti MS, Mombelli A. Early onset periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;**4**:39-53.
86. Van Winkelhoff AJ, van der Velden U, de Graff J. Microbial sucession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. *J Clin Periodontol* 1988; **15**:116-122.
87. Van Winkelhoff AJ, Rodenburg JP, Goene RJ, Abbas F, Winkel EG, de Graaf J. Metronidazole plus amoxicillin in treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* associated periodontitis. *J Clin Periodontol* 1989;**16**:128-131.
88. Van Winkelhoff AJ, Rams TE Slots J Systémic antibiotic thérapy in periondontitis. *Periodontol 2000* 1996;**10**:45-78.
89. Van Winkelhoff A.J., Herrera D., Oteo A., Sanz M., Antimicrobial profiles of periodontal pathogens from The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;**32**(8):891-892.
90. Vergnes JL, Sixou M. Pretrem low birthweight and maternal periodontal status: A meta-analysis. *American Journal of obstetrics and Gynecology* 2007;**196**(2):135e1-137e7.
91. Verner C., Lemaitre P., Daniel A., Giumelli B., Lakhssassi N ; Sixou M. *Carpegen®* real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiology and Immunology* 2006;**21**:6, 341–346.
92. Walker CB, Ratliff D, Muller D, Mandell R, Socransky SS. Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* from human periodontal pockets. *J Clin Microbiol* 1979; **10**(6): 44–849.
-

Annexes :

-Article publié

C. Verner, P. Lemaitre, A. Daniel, B. Giumelli, N. Lakhssassi, M. Sixou. *Carpegen®* real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. Oral Microbiology and Immunology 2006;**21**:6, 341–346

- Poster IADR 2005 Amsterdam

Comparative study of bacteriological sampling: real time PCR versus culture for six periodontal pathogens

- Poster RICA I 2005 Paris

Evaluation de l'activité in vitro de l'Azithromycine par rapport à L'érythromycine, la spiyamycine et la clindamycine selon 11 pathogènes parodontaux

- Poster Europerio 2006 Madrid

The choice for antibiotic after sampling by culture and real time PCR

- Poster de poster SFPIO La Baule 2007

Etude des sensibilités aux antibiotiques après analyse de flore sous gingivale par culture bactérienne anaérobie.

- Poster de recherche Société Française de Parodontologie 2001 Marrackech

Prélèvements bactériens localisés ou généralisés

- Attestation :

1^{er} prix de communication de recherche fondamentale au congrès international SFPIO Versailles 2006

2^{ème} prix de poster de recherche congrès international SFPIO LaBaule 2007

2^{ème} prix de poster de recherche congrès international de la Société Française de Parodontologie 2001

VERNER (Christian).- Utilisations des prélèvements bactériens lors de la prise en charge des maladies parodontales. 123 f., ill., graph., (Thèse de doctorat ; Nantes ; 2007) – N°

Plusieurs méthodes de diagnostic bactériens sont utilisées en parodontologie et peuvent être classées en deux catégories : les méthodes par culture et les méthodes moléculaires.

La technique de culture bactérienne permet l'identification des pathogènes de manière non spécifique avec la réalisation d'un antibiogramme. Mais la méthode de prélèvement et de transport peut avoir une influence sur les résultats car les pathogènes sont vivants.

La PCR en temps réel permet une identification et une quantification précise de l'ADN à 10^2 .

Mais cette méthode ne détecte qu'un faible nombre d'espèces bactériennes car elle est spécifique et ciblée par des sondes prédéterminées. Nous avons comparé les diagnostics bactériens selon les types de prélèvements et le choix de l'antibiothérapie en fonction des différentes méthodes. Ces résultats ont été confrontés aux recommandations de l'AFSSAPS qui sont à ce jour les références pour les thérapeutiques en odonto-stomatologie.

Les utilisations des différents prélèvements bactériens peuvent avoir des incidences cliniques. La technique choisie en fonction des objectifs de diagnostic peut changer à ce jour la prise en charge anti-infectieuse, mais l'utilisation des prélèvements bactériens permet une plus grande qualité et fiabilité de la prise en charge de nos patients.

Rubrique de classement : Parodontologie

Mots clés :

Prélèvements bactériens, Culture, PCR en temps réel, antibiotique

Mesh :

bacterial sampling, culture, PCR real time, antibiotic

Jury:

Le Président : Pr Jacques DOURY
Les assesseurs : Pr Jean Louis SAFFAR
Pr Martine BONNAURE-MALLET
Membres du jury : Dr David SPRATT
Dr Assem SOUEIDAN

Adresse de l'auteur

Christian VERNER
3 place E. Sarradin
44000 NANTES