

## LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Complexité canalaire .....	4
<u>Figure 2</u> : les micro-organismes pénètrent les tubuli dentinaires sous forme de chaînes. Ce n'est que fixées aux parois dentinaires canalaire que les bactéries se propagent en direction de l'apex et subissent une phase de sélection, dictée par les conditions environnementales endocanalaire .....	9
<u>Figure 3</u> : Dispositif et Instrument wave One® .....	17
<u>Figure 4</u> : Dent montée sur monobloc en plâtre jaune .....	21
<u>Figure: 5</u> Dent mise sous sachet vapeur (Rexam SPS) .....	21
<u>Figure 6</u> : Autoclave .....	22
<u>Figure 7</u> : Densitomètre : l'inoculum à une densité de 0,5 équivalent à $3,5.10^8$ ufc/ml.....	23
<u>Figure 8</u> : Contamination des dents.....	24
<u>Figure 9</u> : Incubation des dents contaminées pendant 24H à 37° C dans l'étuve	25
<u>Figure 10</u> : Milieu de culture : gélose au sang frais .....	26
<u>Figure 11</u> : Dénombrement avant la préparation de la dent.....	26
<u>Figure 12</u> : Dénombrement après préparation de la dent .....	28

## LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Composition de la flore endodontique (23). .....	8
<u>Tableau II</u> : Population bactérienne avant et après traitement30pour chaque dent .....	30
<u>Tableau III</u> : Moyenne de la population bactérienne avant et après traitement.....	31

## LISTE DES ABREVIATIONS

NiTi      Nickel Titane

NaOCl    Hypochlorite de sodium

EDTA     Acide Ethylène Diamine Tétra  
          Acétique

ufc        unités de colonies formées

log<sub>10</sub>    logarithme 10

*E Faecalis*    *Enterococcus faecalis*

P1    prélèvement 1

P2    prélèvement 2

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	2
<b>PREMIERE PARTIE : RAPPELS SUR L'INFECTION</b>	
<b>ENDODONTIQUE ET SES STRATEGIES DE DESINFECTION</b>	
I- CARACTÉRISTIQUES DE L'ENDODONTE .....	4
II- INFECTION DE L'ENDODONTE .....	5
II - 1- Voies de contamination de l'endodonte .....	5
II - 2- Composition de la flore endocanaulaire .....	6
Tableau: I Composition de la flore endodontique (23).....	8
II-3- Mode de colonisation de l'endodonte.....	8
III- STRATÉGIES DE DÉSINFECTION .....	10
III -1 - Moyens de désinfection.....	10
III - 1-1- Instruments endodontiques .....	10
III-1-2- Irrigants de l'endodonte .....	13
III-2- Méthode mono-instrumentale.....	15
<b>DEUXIEME PARTIE : EVALUATION DE L'ACTION MECANIQUE</b>	
<b>MONO-INSTRUMENTALE (Wave-One®) SUR LA REDUCTION</b>	
<b>BACTERIENNE</b>	
I- JUSTIFICATION DE L'ETUDE .....	18
II- OBJECTIF DE L'ÉTUDE .....	19
III- TYPE ET CADRE D'ÉTUDE.....	19
IV- MATÉRIEL ET METHODES .....	20
IV-1- Collecte des dents.....	20
IV-3- Contrôle de stérilité des dents .....	22
IV-4- Contamination des dents .....	23
IV-5- Prélèvement et dénombrement avant préparation canalaire .....	25
IV-6- Préparation au Wave One® .....	27

IV-7- Prélèvement et dénombrement après préparation canalaire.....	27
IV- 8- Gestion et analyse statistique des données.....	28
IV-RESULTATS.....	29
V-DISCUSSION .....	32
CONCLUSION .....	35
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	36

## INTRODUCTION

Le rôle des bactéries et de leurs métabolites dans la pathogénèse des maladies de la pulpe et du péri apex n'est plus à démontrer aujourd'hui.

La lutte antibactérienne s'impose donc comme un des éléments critiques dans le succès du traitement endodontique qui fait appel à la fois à des moyens mécaniques et chimiques. La mise en forme et le nettoyage canalaire de la dent visent à l'élimination la plus complète possible du contenu pulpaire organique, ou minéral, des bactéries et leurs sous produits par l'élargissement progressif et contrôlé du canal radiculaire. Cette mise en forme est une étape clé du traitement endodontique; lorsqu'elle est effectuée correctement, elle constitue un facteur prédictif de succès (14). Elle ne s'applique qu'au canal principal contenant la majorité de la flore bactérienne et permet aux irrigants endocanalaire de pénétrer les canaux secondaires latéraux et accessoires (28).

Les études ont montré que l'instrumentation réduit les bactéries dans le canal de 90%, sans irrigation antibactérienne. Plus on instrumente, plus on élimine les bactéries (3,16). Cet objectif peut être difficile à réaliser en utilisant les instruments manuels en acier inoxydable (36). Ainsi, l'introduction de la rotation continue avec les instruments en nickel-titane (NiTi) a été une étape importante dans la mise en forme optimale du canal radiculaire (13). Cette approche est plus rapide, plus sûre et plus reproductible, avec un faible risque d'erreurs de procédure par rapport à l'instrumentation manuelle (31). Aujourd'hui, des instruments uniques de mise en forme canalaire sont mis sur le marché avec comme objectifs de simplifier les protocoles d'utilisation et de réduire le temps passé pour la mise en forme canalaire et la désinfection, tout en conservant ou en améliorant les résultats. La revue de la littérature concernant la mise en forme canalaire avec un instrument unique montre que les recherches sont surtout axées sur le gain de temps (4), la fracture de l'instrument (21),

l'extrusion de débris dans le péri apex (11). Il en résulte également que peu d'études ont évalué leur capacité à réduire le nombre de micro organismes dans les canaux des dents infectées.

Ainsi cette étude *in vitro* a été menée dans le but d'évaluer la réduction bactérienne par le système mono instrument: le Wave-One® avec comme solution d'irrigation du sérum physiologique.

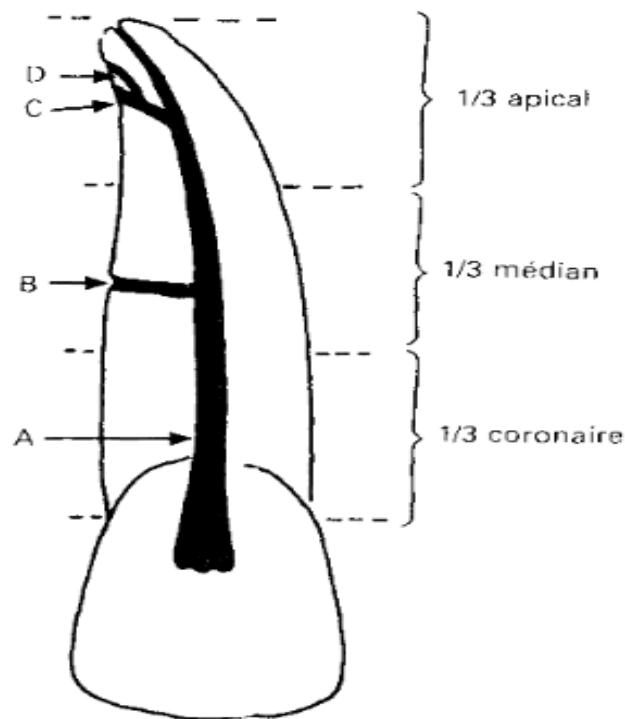
Pour atteindre cet objectif, ce travail sera divisé en deux parties :

- la première partie axée sur les rappels concernant les caractéristiques de l'endodonte, l'infection de l'endodonte, les stratégies de désinfection avec ses moyens et méthodes.
- la seconde partie consacrée à l'étude expérimentale *in vitro* sur des dents extraitesensemencées puis préparées avec le Wave-One® et du sérum physiologique.

## I- CARACTÉRISTIQUES DE L'ENDODONTE

Depuis les travaux de **Vertucci 1984 (34)**, il est établi qu'une racine avec un canal cylindro-conique unique et un foramen apical unique est une exception.

Actuellement, tous les auteurs s'accordent sur la complexité de l'anatomie du canal radiculaire. Une représentation tridimensionnelle amène les auteurs à parler de système canalaire ou réseau canalaire. Pour rendre compte de cette complexité, on distingue : (figure 1)



***Figure 1 : Complexité canalaire***

- canal principal ; (A)
- canal latéral ; (B)
- canal secondaire ; (C)
- canal accessoire. (D)



Les canaux secondaires, latéraux et accessoires présentent un diamètre plus petit que les canaux principaux (2). Bien souvent, seule la morphologie canalaire principale est visible à la radiographie. En effet, la définition des clichés radiographiques est insuffisante pour apprécier précisément les canaux secondaires, latéraux et accessoires. Cependant, le biofilm bactérien endodontique pénètre à la fois les canaux principaux, latéraux, secondaires, accessoires, deltaïques et les tubulis dentinaires. Sur le plan pratique, il ne faut pas espérer, devant une telle complexité anatomique, procéder à une extirpation complète de la pulpe. La totalité du système canalaire ne peut être mise en forme, nettoyée et désinfectée. Le parage canalaire à l'aide de des instruments manuels ou mécaniques ne peut être réalisé qu'au niveau des canaux principaux. Seule l'utilisation d'agents chimiques permet de désinfecter en partie les canaux latéraux et secondaires, à condition que ceux-ci atteignent le biofilm bactérien qui s'y est glissé. On parle de détersion chimique. L'expérience montre malgré tout, l'efficacité des traitements endodontiques qui ne sont basés que sur la désinfection et la mise en forme du canal principal (2).

## **II- INFECTION DE L'ENDODONTE**

### **II - 1- Voies de contamination de l'endodonte**

Les tissus durs de la dent agissent comme une barrière mécanique qui évite l'invasion microbienne vers la pulpe. Quand cette barrière est détruite, de façon partielle ou complète, les micro-organismes peuvent pénétrer et induire une inflammation pulpaire, puis une nécrose avec la possibilité d'atteindre les structures périapicales. Au stade de la nécrose pulpaire, les bactéries vont coloniser l'endodonte. Plusieurs voies d'accès endodontiques sont possibles:

#### **- Par ouverture de la chambre pulpaire**

La voie la plus fréquente de pénétration des micro-organismes de la flore buccale est transcoronaire ; elle permet aux bactéries de la salive et de la plaque

dentaire d'accéder directement à l'endodonte, par l'intermédiaire d'une carie d'un traumatisme concernant la pulpe ou d'une manœuvre iatrogène.

**- Par des anomalies de la dent**

La pénétration bactérienne peut aussi se faire par des fêlures, fissures, érosions, abrasions de l'émail ou de la dentine et engendrer des répercussions pulpaires plus ou moins directes.

**- Par une lésion du parodonte**

Les bactéries présentes dans la poche parodontale peuvent théoriquement rejoindre l'endodonte par l'intermédiaire des canaux accessoires et/ou du foramen apical.

**- Par voie générale, via la circulation sanguine, par anachorèse.**

Une bactériémie transitoire peut être produite par des traumatismes, des procédures parodontales, au cours desquels les micro- organismes circulants sont attirés vers le tissu pulpaire déjà enflammé et peuvent le coloniser.

**II - 2- Composition de la flore endocanalaire**

La flore bactérienne envahissant les tubulis dentinaires radiculaires présente de nombreuses similitudes avec la flore mise en évidence dans la couche profonde de la carie dentinaire coronaire. Il s'agit essentiellement de bactéries anaérobies facultatives (30). *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Propionibacterium* sont les composants principaux de cette flore. Les cocci à Gram + anaérobies tels que *Veillonella* ou *Eubacterium* sont présents en nombre plus faible. *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* et

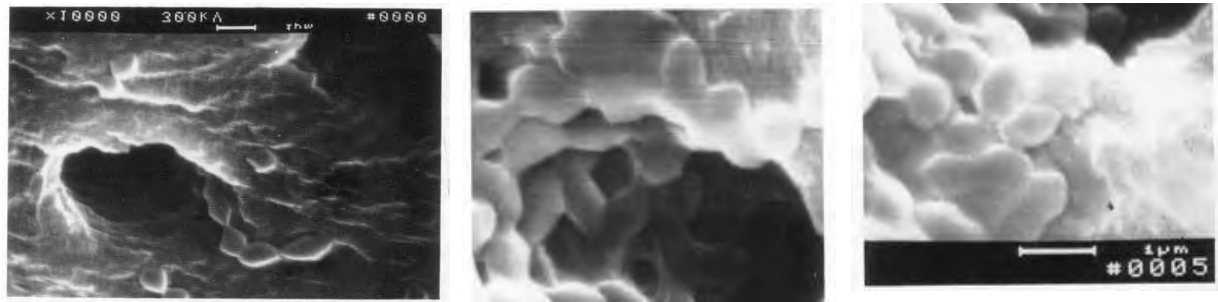
*Prevotella intermedia* sont des bactéries anaérobies strictes à Gram – présentent en nombre variable. *Enterococcus faecalis*, bactérie anaérobie facultative est caractéristique de l'échec du traitement endodontique, il est le marqueur de l'infection endodontique secondaire (8). Certaines études ont montré qu'*Enterococcus faecalis* serait capable, seul d'adhérer au collagène dentinaire, coloniser la surface intra-radriculaire, envahir les tubuli dentinaires afin de former un biofilm monobactérien. *Enterococcus faecalis* serait capable de survivre dans des conditions environnementales difficiles sans l'aide d'autres espèces bactériennes. *Enterococcus faecalis* présente des filaments et une capsule polysaccharidique lui permettant d'adhérer à la surface dentinaire (5). Il exprime également une protéine particulière (Ace), dans des conditions de stress environnementales, afin de se fixer au collagène dentinaire de type I. Ainsi, la bactérie exprime ces divers mécanismes de virulence et de résistance (10). Elle est difficile à éradiquer avec nos procédures de détersion chimiques et mécaniques. Cette bactérie a la capacité de survivre dans des conditions normalement létales pour d'autres micro-organismes : un milieu très salé (6,5% NaCl), une large gamme de pH, une large gamme de température (10 à 60°C), et en présence de détergents.

**Tableau: I Composition de la flore endodontique (23).**

	GENRES ANAÉROBIES	GENRES FACULTATIFS
Bacilles <input type="checkbox"/> à Gram négatif	<i>Porphyromonas</i> <i>Prevotella</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Campylobacter</i> <i>Treponema Wolinella</i>	<i>Capnocytophaga</i> <i>Eikenella</i>
Bacilles <input type="checkbox"/> à Gram positif	<i>Actinomyces</i> <i>Arachnia propionica</i> <i>Eubacterium</i> <i>Propionibacterium</i> <i>Pseudoramibacter</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>Lactobacillus</i>
Cocci à Gram négatif	<i>Veillonella</i>	<i>Neisseria</i>
Cocci à Gram positif	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i>

### **II-3- Mode de colonisation de l'endodonte**

La reconnaissance du collagène de type I induit l'adhérence bactérienne, l'invasion des tubulis dentinaires et les modifications morphologiques des micro-organismes aboutissant à la formation de chaînes de bactéries.



***Figure 2: les micro-organismes pénètrent les tubuli dentinaires sous forme de chaînes. Ce n'est que fixées aux parois dentinaires canalaire que les bactéries se propagent en direction de l'apex et subissent une phase de sélection, dictée par les conditions environnementales endocanalaire (6).***

Toutes les bactéries anaérobies sont capables de pénétrer les tubuli dentinaires mais de façon différentes. En effet, la profondeur de pénétration varie selon les espèces bactériennes. Des études montrent que cette colonisation peut aller jusqu'à 2,5  $\mu\text{m}$  de profondeur dentinaire. D'autres l'évaluent à la moitié de la distance cément-dentine (épaisseur d'une paroi radiculaire). En effet, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus sanguis* pénètrent dans les tubules dentinaires jusqu'à une profondeur de 400  $\mu\text{m}$  en deux semaines. Alors que *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacteroides melaninogenicus* ne pénètrent pas les tubuli dentinaires, même après quatre semaines d'incubation. De cette manière, les bactéries survivent en se cachant et trouvent les nutriments nécessaires à leur survie. Ces différences dans la profondeur de pénétration intra-tubulaire selon les espèces bactériennes s'expliquent par divers facteurs.

La profondeur de pénétration des bactéries dans les canalicules dentinaires des surfaces radiculaires pariétales et les canaux latéraux dépend, entre autres, de l'ancienneté de l'infection (20). Les bactéries présentes dans le canal endodontique n'envahissent pas de suite les tubuli dentinaires. Plus

l'infection est ancienne, plus la profondeur de pénétration des micro-organismes dans les tubuli dentinaires est importante. Dans le cas d'une infection chronique, la contamination des tubuli dentinaires est plus importante que dans le cas d'une infection aiguë.

La profondeur de pénétration bactérienne dépend également de l'étendue du support d'adhérence bactérien.

Toutes les bactéries qui habitent la cavité buccale ont la capacité théorique d'envahir l'espace canalaire radiculaire au cours du processus de nécrose pulpaire et d'induire une infection du canal puis de la zone péri apicale.

### **III- STRATÉGIES DE DÉSINFECTION**

#### **III -1 - Moyens de désinfection**

Les moyens de désinfection canalaire sont les instruments endodontiques et les irrigants canaux.

##### **III - 1-1- Instruments endodontiques**

###### **III-1-1-1- Instruments manuels en acier**

###### **➤ Lime K (Kerr)**

Elle est utilisée en traction pure et/ou rotation alternée. L'utilisation de ce type de lime en acier est aujourd'hui encore d'actualité, en particulier lors du cathétérisme ou de la négociation de crochets apicaux avec des rayons de courbures proscrivant l'utilisation de l'instrumentation rotative en NiTi.

➤ La broche

La principale différence avec la lime K repose dans le nombre de spires moins important à un angle d'hélice plus petit et un pas plus espacé. De part son design, l'utilisation suivant une dynamique de rotation est recommandée.

➤ Lime H (Hedström)

Egalement appelé Racleur, cet instrument est de section ronde, avec un angle de coupe de 90° et un pas court et constant (s'apparente à une vis à bois). Elle est d'une grande efficacité en traction pure.

### **III-1-1-2- Instruments en Nickel-Titane (Ni-Ti)**

L'apport de la rotation continue a permis de palier au manque d'efficacité de coupe de l'alliage. Ainsi le couple NiTi-Rotation continue à constituer une évolution majeure dans la technique de mise en forme canalaire, permettant entre autre un meilleur respect de l'anatomie canalaire, une reproductibilité de la mise en forme et un gain de confort pour l'opérateur. De nombreux systèmes d'instruments en Ni-Ti sont disponibles de nos jours. Bien que présentant chacun leurs spécificités, quelques précautions d'utilisations communes sont à respecter afin d'obtenir des résultats fiables et reproductibles.

- Cathétérisme essentiel avant l'utilisation de l'instrumentation rotative pour élargir le canal et analyser la morphologie canalaire avec un instrument manuel. Instrumentation à vitesse lente et continue (300 à 500 tours/min), en respectant les consignes d'utilisation du fabricant en utilisant des contre-angles réducteurs ou des moteurs spécifiques.
- Suppression des contraintes coronaires avec élargissement des entrées canales (avec des openers type EndoFlare ®).
- Dynamique du mouvement : la pression doit toujours être légère et accompagnée de mouvements verticaux de faible

amplitude en direction apicale. L'instrument ne doit jamais être changé d'axe brutalement ni rester en rotation à la même longueur à l'intérieur du canal (augmentation du risque de fracture par fatigue cyclique, et du risque de transport canalaire avec création de butée)

- Un instrument ne doit jamais être forcé, les instruments Ni-Ti requièrent une utilisation passive. Si l'instrument a du mal à progresser, ne pas forcer, le retirer, élargir la portion canalaire apicale ou coronaire, explorer avec des limes manuelles avec appuis pariétal.
- Retrait de l'instrument après plusieurs secondes d'utilisation pour permettre l'irrigation intracanaire nécessaire à la désinfection, à la remontée de débris, et à la lubrification.
- Nettoyage de l'instrument à chaque retrait pour éviter l'encrassage, et vérifier l'aspect pour détecter l'apparition d'éventuels défauts (allongement du pas, dévissage) précurseur de fracture instrumentale
- Limitation du nombre d'utilisation pour éviter les fractures dues à la fatigue instrumentale. L'usage unique est l'idéal mais entraîne un surcout opératoire important pour le praticien.

Les systèmes de rotation continue proposent des séquences opératoires différentes. Certains adaptent la séquence à utiliser en fonction de la configuration anatomique du canal alors que d'autres privilégient la simplicité, en proposant une seule et même séquence.



### **III-1-2- Irrigants de l'endodonte**

L'irrigation, composante essentielle du traitement endodontique, améliore le nettoyage et conditionne la désinfection canalaire.

Un produit d'irrigation endodontique efficace doit réunir les trois qualités suivantes :

- avoir une bonne action antiseptique
- avoir une action dissolvante efficace sur les débris organo-minéraux
- être dépourvu de toxicité ou tout au moins présenter une toxicité acceptable. Une large gamme de solutions a été proposée pour l'irrigation canalaire.

#### **III-1-2-1- Sérum physiologique et Eau distillée**

Ces solutions d'irrigation ne possèdent aucune propriété antibactérienne ni solvante, elles n'ont pas d'effet toxique et n'entraînent pas d'effet secondaire. Elles sont capables d'emporter par lavage mécanique les bactéries dans le flux et le reflux de la solution. Leur indication principale reste le lavage final.

#### **III-1-2-2- Chlorhexidine**

La chlorhexidine est recommandée comme solution d'irrigation en endodontie tant à 0,2% qu'à 2%. Ces solutions s'avèrent respectivement aussi efficaces et même plus que l'hypochlorite de sodium à 2,5% et 5,25% avec des effets moins toxiques. La toxicité de la chlorhexidine est en rapport direct avec sa concentration. Les propriétés de la chlorhexidine sont dues à sa capacité de se lier à la dentine, à sa libération lente et à l'effet de rémanence de plusieurs heures de son pouvoir tampon (35). Elle peut donc être utilisée comme médication en inter séance. Elle n'a pas d'action solvante.

### **III-1-2-3- Chélateurs**

Ils ont une grande affinité pour les matériaux alcalinoterreux comme le calcium. Ces acides faibles réagissent avec la partie minérale des parois dentinaires. Ils substituent aux ions calcium des ions sodium qui se combinent avec la dentine pour donner des sels solubles. La déminéralisation obtenue facilite ainsi la pénétration et l'élargissement des canaux fins ou imperméables. L'Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique (EDTA) met en suspension les ions calcium de la dentine, son utilisation modifie peu la micro dureté de cette dernière. Dépourvu d'action solvante sur les tissus organiques, il est indispensable de l'utiliser en alternance avec l'hypochlorite de sodium qui agit sur la portion organique. Certains auteurs ont pensés à utiliser l'acide lactique et l'acide citrique qui ont des propriétés chélatantes.

### **III-1-2-4- Hypochlorite de sodium**

C'est le dérivé chloré le plus utilisé en endodontie. Il est de loin la solution qui possède la meilleure action dissolvante. Il exerce cette action sur la pulpe, les débris organiques et la pré dentine mais son action sur la dentine pariétale radiculaire est très négligeable.

L'hypochlorite de sodium est un antibactérien efficace contre la majorité des germes impliqués dans les échecs endodontiques, il est nécessaire pour garder l'efficacité d'avoir un contact direct au moins 10mn avec les bactéries et de renouveler fréquemment la solution.

### **III-1-2-5- Peroxyde d'hydrogène**

Il a été largement utilisé en irrigation endodontique; en alternance avec le NaOCl il produit une réaction effervescente. L'effervescence due à la libération d'oxygène naissant et de chlore, outre son action assainissante et désodorisante, favoriserait mécaniquement l'élimination des débris.

### **III-2- Méthode mono-instrumentale**

Les instruments en NiTi utilisés en rotation continue, ont permis la réduction des séquences instrumentales, la réalisation de mise en forme canalaire plus rapide, le respect de la trajectoire initiale du canal, moins de propulsion de débris par l'instrument d'où la réduction du risque de bouchon et de perte de longueur de travail et moins d'expulsion de débris dans le périapex. Aujourd'hui, des instruments uniques de mise en forme canalaire sont mis sur le marché avec comme objectifs de simplifier les protocoles d'utilisation et de réduire le temps passé pour la mise en forme canalaire, tout en conservant ou en améliorant les résultats obtenus avec une séquence de plusieurs instruments. Tous ces instruments commercialisés à ce jour sont à usage unique du fait que les contraintes qu'ils subissent lors de la mise en forme canalaire sont trop fortes. Parmi ces instruments uniques, deux sont utilisés selon une dynamique appelée « mouvement réciproque » : c'est le Wave-One® et le Reciproc®.

Le protocole d'utilisation du wave-one® ; après réalisation de la radiographie préopératoire et de la cavité d'accès, l'entrée canalaire est repérée. Puis, le redressement de l'entrée est indispensable afin d'éviter toutes les contraintes inutiles que pourrait subir l'instrument (utilisation de forets de Gates® ou d'un SX® par exemple). Un gel chélatant de type Glyde® sera utilisé à chaque passage instrumental. L'exploration du canal est réalisée à l'aide d'une lime manuelle K08 ou K10. Le choix de l'instrument WaveOne va se faire en fonction de la résistance à la progression de la lime K10. Le passage du WaveOne ne se fait qu'au niveau de la longueur de pénétration des limes manuelles. Différentes étapes sont à respecter :

- placer la solution d'irrigation dans la cavité d'accès ;
- introduire l'instrument dans le canal à préparer (le moteur est mis en route uniquement lorsque l'orifice canalaire est atteint) ;

- faire progresser l'instrument selon un léger mouvement de va-et-vient dont l'amplitude ne doit pas dépasser 3 millimètres. Ce mouvement de va-et-vient est assimilé à un mouvement de picotage. L'instrument est retiré après deux ou trois mouvements de picotage ou dès qu'une sensation de blocage se fait sentir. Il doit progresser facilement dans le canal sans exercer de pression ;
  - irriguer abondamment à l'aide d'une seringue d'hypochlorite de sodium (2 ml par canal après chaque passage d'instrument) ;
  - contrôler la perméabilité canalaire (lime K) ;
  - répéter ce cycle (picotage, retrait, nettoyage de la lime et irrigation) jusqu'à ce que l'instrument atteigne la longueur explorée ;
  - explorer le tiers apical du canal à l'aide des limes manuelles ;
  - répéter le cycle décrit ci-dessus jusqu'à l'atteinte de la longueur de travail.
- Cette méthode permet le nettoyage et la désinfection du canal radiculaire

Cependant l'élimination de toute la flore bactérienne endodontique est illusoire. Le but des traitements mécaniques et chimiques est de réduire suffisamment la charge bactérienne canalaire et cela au dessous d'un seuil ne permettant ni d'activer les défenses immunitaires de l'hôte ni de créer de quelconques destructions dans les tissus péri-apicaux. Il ne naît aucune infection périapicale (cette dernière résulte d'un équilibre entre les défenses immunitaires de l'hôte et la virulence bactérienne) (28). Ce seuil a été évalué à  $10^{-10^4}$  cellules bactériennes/canal (28). En effet l'approfondissement des connaissances théoriques associé aux avancées techniques sur la préparation canalaire ont poussé certains auteurs à étudier l'effet du système mono-instrumental dans la réduction bactérienne.



**Figure 3:** *Dispositif et Instrument wave One®*

## I- JUSTIFICATION DE L'ETUDE

Les infections endodontiques sont des affections polymicrobiennes. Différentes espèces bactériennes peuvent coloniser le système canalaire; cependant les bactéries Gram négatifs prédominent dans l'infection endodontique primaire (9). Mais dans certaines situations la flore endodontique peut être largement dominée surtout dans la partie apicale des canaux par des bactéries anaérobies strictes et quelques espèces anaérobies facultatives. Les bactéries et leurs produits métaboliques, les enzymes et les toxines jouent un rôle essentiel dans l'initiation, la propagation et la persistance des pathologies pulpaires et périapicales (12). *Enterococcus faecalis* et *Candida albicans* sont considérés comme les espèces les plus résistantes dans les canaux radiculaires infectés, souvent associés à des défaillances du traitement endodontique (32). L'organisation de micro-organismes en biofilm augmente la résistance de ces agents pathogènes aux procédures d'endodontie, entravant ainsi la désinfection canalaire.

La prévention de la contamination ou la réduction de la charge bactérienne intracanaulaire est la pierre angulaire du traitement endodontique (26). Quelles que soient les techniques endodontiques développées pour traiter les dents infectées, le succès de ces traitements passe par l'élimination voire la réduction significative des bactéries du système canalaire (27).

Cet objectif peut être atteint grâce à des manoeuvres chimio-mécaniques appropriées (35), tout en veillant à la conservation maximale des structures de la dent et le maintien de l'anatomie originelle du canal (18). La préparation mécanique associée à l'irrigation chimique appropriée peut réduire considérablement la charge bactérienne intra-canaulaire. C'est ainsi que différentes solutions et de nombreux instruments ont été étudiés, notamment à travers des expériences *in vitro* impliquant *E. faecalis* (1, 24, 29), pour améliorer

la mise en forme et la désinfection du système canalaire. La manœuvre mécanique passe de plusieurs instruments manuels ou mécanisés au système mono instrument en rotation continue ou en mouvement alternatif de réciprocité.

Ce concept mono-instrument emploie un seul instrument tout au long du processus de préparation canalaire. Cela a entraîné une diminution importante du temps de préparation canalaire mais aussi du temps de contact entre les irrigants et les parois du canal radiculaire. Par conséquent, les effets des instruments uniques sur le contenu microbien du système canalaire doivent être évalués. Ainsi le Wave-One® est choisi comme technique de mise en forme canalaire.

## **II- OBJECTIF DE L'ÉTUDE**

L'objectif était d'évaluer *in-vitro* la réduction bactérienne avec l'action mécanique mono-instrumentale : le Wave-One® sur des dents humaines permanentes monoradiculées, préalablement contaminées par des souches d'*Enterococcus faecalis*.

## **III- TYPE ET CADRE D'ÉTUDE**

Il s'agissait d'une étude expérimentale, réalisée dans le département d'Odontologie de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontologie de Dakar et à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne de l'Hôpital Aristide Le Dantec.

## **IV- MATÉRIEL ET METHODES**

### **IV-1- Collecte des dents**

Dans cette étude, des dents humaines permanentes monoradiculées saines, extraites pour des raisons parodontales étaient recueillies dans différentes structures sanitaires. Elles étaient conservées dans de l'hypochlorite de sodium dilué à 2,5% pour éviter leur dessiccation.

### **IV-2- Sélection et préparation des dents**

Trente deux dents humaines permanentes matures monoradiculées indemnes de carie, de fissures et de fractures, ne présentant pas de résorption externe ou interne, de calcification et de traitements canaux précédents étaient sélectionnées. Elles étaient ensuite désinfectées dans une solution d'hypochlorite de sodium à 2,5% pendant 1H, rincées à l'eau et séchées.

Du ciment verre ionomère (Fuji II GC®) était mis sur l'apex des dents sélectionnées et la surface externe des racines était recouverte par deux couches de vernis pour éviter la fuite de la solution d'irrigation et de l'inoculum. Des cavités d'accès endodontiques conventionnelles étaient réalisées avec une fraise boule n° 8 ou 12 en carbure de tungstène montée sur turbine, une fraise endo Z qui avait servi à supprimer tout le plafond pulpaire rendant accessible et visible l'entrée canalaire. Les dents étaient montées individuellement sur des blocs de plâtre pour faciliter leur manipulation et leur identification (figure 4).





**Figure 4 :** *Dent montée sur monobloc en plâtre jaune*

Des radiographies rétroalveolaires avec une lime 10 en place étaient effectuées pour déterminer la longueur de travail de chaque dent.

Elles étaient ensuite conditionnées individuellement sous sachet vapeur (REXAM SPS, Coulommiers) (figure 5).



**Figure: 5** *Dent mise sous sachet vapeur (Rexam SPS)*

Les dents sous sachet vapeur stérilisées à l'autoclave à 121° pendant 20 minutes (figure 6).



**Figure 6 : Autoclave**

Un seul opérateur, en utilisant des techniques aseptiques, a réalisé les procédures de préparation et d'échantillonnage.

#### **IV-3- Contrôle de stérilité des dents**

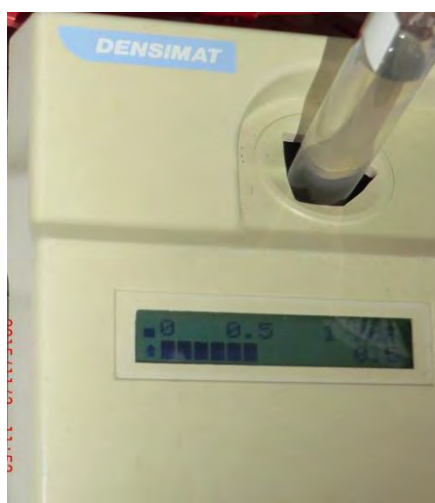
Deux dents étaient choisies au hasard pour confirmer la stérilisation. Chaque dent était mise dans un flacon en polyéthylène, stérile et à usage unique et le canal de chaque dent rempli de sérum physiologique. Chaque flacon était incubé pendant 24H dans une étuve à 37 ° C. Ensuite les canaux sont à nouveau remplis de sérum physiologique et des mouvements de pompage sont effectués avec une lime k 10 pour mettre le contenu canalaire en suspension.

Un prélèvement de 10 µl était effectué dans chaque canal puis dilué dans 1ml de sérum physiologique. Les solutions obtenues étaient inoculées par étalement dans deux boîtes de pétri. Les boîtesensemencées sont incubées pendant 24H à l'étuve à 37°C.

L'absence de croissance bactérienne après 24H d'incubation confirme la stérilité des dents.

#### **IV-4- Contamination des dents**

Une suspension bactérienne était préparée avec la souche de référence *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. L'inoculum était calibré à 0,5 Mc Farland, à l'aide d'un densitomètre, correspondant à une densité bactérienne de  $3,5.10^8$  ufc/ml (figure 7).



**Figure 7: Densitomètre : l'inoculum à une densité de 0,5 équivaut à  $3,5.10^8$  ufc/ml**

Les sachets étaient ouverts sous une hotte équipée d'un flux d'air laminaire et le canal de chaque dent était contaminé avec l'inoculum préparé précédemment. Après remplissage du canal une lime K n°10 était utilisée en mouvement de pompage pour répandre la suspension sur toute la longueur du canal (figure 8).



**Figure 8 :** *Contamination des dents*

Les dents inoculées étaient ensuite mises individuellement dans des flacons en polyéthylène, stériles et à usage unique, pour incubation dans une étuve à 37°C pendant 24H (figure 9).



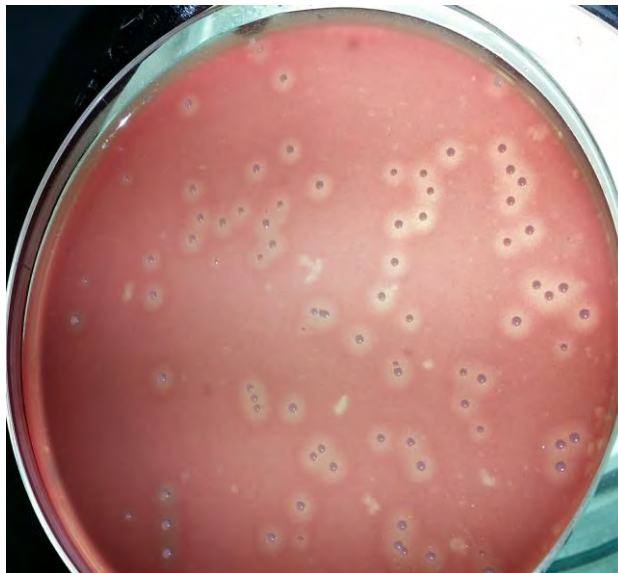
***Figure 9 : Incubation des dents contaminées pendant 24H à 37° C dans l'étuve***

#### **IV-5- Prélèvement et dénombrement avant préparation canalaire**

Un premier prélèvement était effectué (P1) 24H après contamination des dents. Chaque canal était rempli avec du sérum physiologique et à l'aide d'une lime k numéro 10, des mouvements de pompage étaient effectués pour mettre le contenu bactérien canalaire en suspension. Ensuite 10 $\mu$ l étaient prélevés et mis aussitôt après dans un tube contenant 5ml (5000 $\mu$ l) de sérum physiologique puis agités au vortex pendant 2mn pour homogénéiser la solution. Une série de 3 dilutions au 1/10, au 1/100 et au 1/1000 était réalisée et 0,1ml de chaque dilution étaitensemencée dans une boîte de gélose au sang frais, puis incubée dans une étuve à 37°C pendant 24H. La numération bactérienne était faite à l'aide d'un compteur de colonies après incubation en déterminant le nombre d'unités de colonies formées par ml (ufc/ml) (figures 10, 11).



**Figure 10 :** *Milieu de culture : gélose au sang frais*



**Figure 11 :** *Dénombrement avant la préparation de la dent*

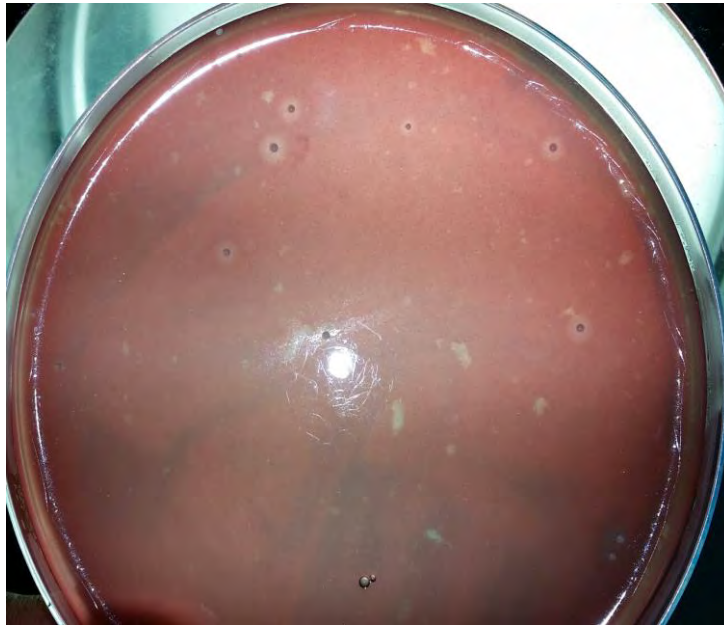
#### **IV-6- Préparation au Wave One®**

Le canal est exploré à l'aide d'une lime manuelle K10. Cette portion canalaire est pré élargie à l'aide de cette lime et irriguée avec du sérum physiologique, ensuite le Wave One® Primaire 25/100 est utilisé jusqu'à la longueur de pénétration de la lime manuelle et mise en forme de cette portion canalaire. L'instrument est introduit dans le canal, animé de légers mouvements de picotage, en va-et-vient vertical qui le font progresser en direction apicale. Après 2 ou 3 mouvements de va-et-vient ou dès qu'une sensation de blocage se fait sentir, l'instrument est retiré et nettoyé avec une compresse stérile, et le canal irrigué au sérum physiologique. L'instrument est alors remis en place dans le canal, et avancé plus apicalement sans pression. Ce cycle (picotage, retrait, nettoyage de la lime, irrigation) est répété jusqu'à ce que l'instrument atteigne la longueur de travail c'est à dire 1mm du foramen apical pour chaque canal. Les dents étaient préparées sous irrigation avec une seringue en plastique de 10 ml munie d'une aiguille de longueur 16mm et de diamètre 50/100<sup>ème</sup> mm, sous une hotte stérile et sous aspiration au sérum physiologique à une quantité de 5ml.

#### **IV-7- Prélèvement et dénombrement après préparation canalaire**

Un deuxième prélèvement (P2) est effectué immédiatement après préparation canalaire selon le même procédé que le premier prélèvement. Un dénombrement de la quantité de bactéries a été effectué après les séries de dilution (figure12).





**Figure 12 :** *Dénombrement après préparation de la dent*

#### **IV- 8- Gestion et analyse statistique des données**

Les données de l'expérimentation concernant chaque dent ont été saisies en utilisant un tableur Excel (la version de Microsoft 2003).

L'analyse statistique des données a été faite avec le logiciel épi-info<sup>®</sup>. Les données de comptage bactérien obtenues en ucf/ml avant et après traitement ont été transformées en Log<sub>10</sub> avant les analyses statistiques. Le pourcentage de réduction de la quantité de bactérie après traitement au Wave One<sup>®</sup> a été ensuite calculé. On évalue l'action du Wave One<sup>®</sup> dans la réduction de la charge bactérienne en comparant le nombre de bactéries présentes dans le canal de chaque dent avant et après mise en forme. Etant donné que les échantillons étaient appariés, le test t apparié de Student est utilisé pour la comparaison des moyennes des charges bactériennes avant et après traitement.

La différence entre les deux moyennes est statistiquement significatif si la valeur de  $P < 0,05$ .



## IV-RESULTATS

Les cultures des prélèvements issus des 2 dents témoins négatifs étaient toutes négatives après 48H d'incubation. Les prélèvements issus des 30 dents infectées avaient tous donné lieu à des cultures positives avec une charge bactérienne en moyenne de 23440 ucf /ml ( $3,98 \pm 0.11$  en  $\log_{10}$ ).

La technique mono instrument a réduit la quantité de *E faecalis* dans les canaux des 30 dents (Tableau II).

La moyenne de charge bactérienne ( $\log_{10}$ ) avant traitement était de ( $3.98 \pm 0.11$ ) et la moyenne de charge bactérienne ( $\log_{10}$ ) après traitement était de ( $1.20 \pm 0.12$ ).

Le test t apparié a montré une différence significative des moyennes (en  $\log_{10}$ ) des charges bactériennes avant et après le traitement et p-value  $< 0,0001$ . Le pourcentage de réduction moyen de la quantité de bactéries était de l'ordre de 69,8% en  $\log_{10}$  (Tableau III).

**Tableau II : Population bactérienne avant et après traitement  
pour chaque dent**

N° dents	Résultats avant Traitement (P1) Nombre de colonies	Résultats après Traitement (P2) Nombre de colonies
N°1	75000	5
N°2	46500	140
N°3	110000	65
N°4	25000	40
N°5	66000	400
N°6	2500	5
N°7	3000	5
N°8	5000	5
N°9	14000	5
N°10	6500	5
N°11	4000	30
N°12	5500	10
N°13	6000	5
N°14	3000	40
N°15	34000	55
N°16	1500	10
N°17	4000	265
N°18	12000	165
N°19	42500	40

N°20	5000	15
N°21	11000	4
N°22	36000	90
N°23	9000	21
N°24	67000	11
N°25	90000	10
N°26	1000	1
N°27	400	1
N°28	5900	6
N°29	10000	18
N°30	1900	9

**Tableau III : Moyenne de la population bactérienne avant et après traitement**

Dents	Moyenne avant Traitement		Moyenne après Traitement		Réduction moyen
	ucf/ml	Log <sub>10</sub>	ucf/ml	Log <sub>10</sub>	%
30	23440±5480	3,98±0,11	49,4±16	1,20±0,12	69,8 en log 10

## V-DISCUSSION

L'un des objectifs les plus importants de l'instrumentation du canal radiculaire est l'élimination de la pulpe vitale et/ou nécrotique, la dentine infectée, et les débris dentinaire afin d'éliminer la plupart des micro-organismes dans le système canalaire.

Dans cette étude une réduction significative de la population bactérienne endocanalaire a été obtenue après irrigation manuelle à la seringue avec 5ml de sérum physiologique par canal. Cet effet antibactérien n'a été que le résultat d'une action purement mécanique de l'irrigation et de l'instrument utilisé.

### Utilisation du Wave-One®

L'instrument unique a été trouvé efficace à réduire considérablement le nombre de micro-organismes dans la lumière canalaire et les murs de la dentine avec un taux de réduction de 69,8%. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par **Ebru Ozsezer Demiryurek *et al.* (7)** qui ont trouvé une réduction de 69% de bactéries avec une séquence de 4 instruments pour le Mtwo®, le protaper® et le système Race® utilisés avec du sérum physiologique. Nous constatons une absence de différence sur les résultats obtenus. Ceci pourrait s'expliquer par la conicité qui va de 2%, 4%, 6% et 8% pour la séquence des 4 instruments utilisés de chaque système, et que le wave-one utilisé possède une conicité de 8%. Cependant **Ebru Ozsezer Demiryurek *et al.* (7)** ont trouvé une réduction bactérienne de l'ordre de 65% avec les instruments manuels en NiTi. Ceux-ci comparés aux résultats de notre étude, nous pouvons en déduire que l'efficacité de coupe des instruments en NiTi est majorée par la rotation continue ou la réciprocité. **Siqueira *et al.* (24)** dans leur étude ont montré que l'instrumentation du canal associée à une irrigation avec du sérum physiologique pourraient réduire mécaniquement plus de 60% des bactéries du canal radiculaire.

### Sérum physiologique

Dans cette étude du sérum physiologique a été utilisé comme irrigant pour révéler l'action mécanique de l'instrument. L'irrigation au sérum physiologique a une action mécanique comme l'avait décrit **Touré *et al.*** dans son étude (33). Selon lui il y avait un effet flot du sérum physiologique qui a entraîné l'élimination de 20 à 25% des bactéries. L'utilisation d'irrigants dans le canal endodontique exerce une action mécanique sur le biofilm capable de se détacher des parois intra-radicales : c'est l'effet de chasse (mouvements de flux et de reflux).

### *Entérocoque faecalis (E. faecalis)*

Les primo-infections endodontiques sont toujours caractérisées par la présence de plusieurs espèces bactériennes qui forment un écosystème très labile dans le temps. Il est donc impossible de les reproduire en *in vitro* (25). C'est pourquoi, plutôt que de réunir arbitrairement quelques espèces différentes qui ne représenteront jamais un milieu bactérien endocanalair réel. *Enterococcus faecalis* est le microorganisme le plus couramment utilisé pour sa capacité à coloniser profondément les canaux et les tubuli dentinaires. (22). Ce choix peut être justifié aussi par le fait qu'il soit responsable des infections secondaires et persistantes par sa capacité à coloniser le canal radiculaire dans ses parties les plus inaccessibles. Les procédures de désinfection chimio-mécaniques ne peuvent les neutraliser ce qui peut être une cause de l'échec des thérapeutiques (25). En plus la prévalence de retrouver *Entérocoque faecalis* dans les infections endodontiques est très élevée ;**Peciulien *et al.*** (17) avaient examiné le statut microbiologique de 40 dents présentant des lésions périradicales et avaient trouvé des entérocoques dans 64% d'entre elles. Dans des études similaires, **Pinheiro *et al.*** (22) avaient rapporté 52,94%, et **Sundqvist *et al.*** (30) avaient rapporté 38% des entérocoques. C'est pour ces raisons qu' *E. faecalis* était très régulièrement utilisée dans les différentes études concernant la

désinfection canalaire, d'autant plus que son caractère anaérobie facultatif favorise ses manipulations et sa culture.

La période d'incubation était 24H dans cette étude sur la base des études de **Hubble T. *et al.* (10)**, en 24H les microorganismes étaient présents dans tout le système canalaire et pouvaient être trouvés dans les tubuli dentinaires à des profondeurs allant jusqu'à 300  $\mu\text{m}$ . Cette constatation était soutenue par **Haapasalo et Ørstavik (15)** qui avaient trouvé la pénétration de *E. faecalis* à une profondeur de 300 à 400  $\mu\text{m}$  dans les tubuli dentinaires bovine après 24H. **Siqueira *et al.* (26)** avaient opté 24H à 48H afin d'augmenter la profondeur de l'invasion dans les tubuli dentinaires.

En raison du développement technologique, d'autres études peuvent être menées avec de nouveaux instruments et techniques de préparation du canal, y compris les lasers, qui sont de plus en plus populaire dans les procédures d'endodontie. Cependant, en dépit de l'instrumentation et des techniques modernes, la désinfection complète du système canalaire ne peut être atteinte par la préparation canalaire mécanisée seule. Et comme les bactéries survivantes à l'instrumentation présentent un risque pour la réussite du traitement canalaire, une solution d'irrigation antimicrobienne et les médicaments intracanaux sont toujours nécessaires.

## CONCLUSION

Cette nouvelle méthode pour la préparation mécanique des canaux radiculaires avec le wave-one<sup>®</sup> est prometteuse, elle permet de préparer le canal avec un seul instrument avec un gain de temps. Le wave-one<sup>®</sup> réduit de façon considérable la charge bactérienne sans apport d'un antimicrobien dans le canal radiculaire. Les résultats de cette étude sont donc favorables à l'affirmation selon laquelle les instruments avec une plus grande conicité peuvent jouer un rôle important pour maximiser l'efficacité de la désinfection mécanique. Le temps gagné avec cette méthode mono instrument doit être utilisé pour l'irrigation canalaire finale qui est essentielle et est négligée le plus souvent par les praticiens. Il doit permettre aussi un temps de contact suffisant des solutions d'irrigation antibactériennes sur les parois dentinaires pour que ces solutions puissent infiltrer les ramifications du canal principal qui sont inaccessible à l'instrumentation. .

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Alves FRF, Rôças IN, Almeida BM, Neves MAS, Zoffoli J, Siqueira Jr JF.** Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J* 2012;45(9):871-7. □
2. **Cantatore G.** L'irrigation de l'endodonte : importance dans le nettoyage et la stérilisation du réseau canalaire. *Réal. Clin.*, 2001;12(2):185-201.
3. **Dalton CB, Orstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M.** Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998;24:763.
4. **Dioguardi M, Troiano G, Laino L, Lo Russo L, Giannatempo G, Lauritano F, Cicciù M, Lo Muzio L.** Protaper and Wave One systems three-dimensional comparaison of device parameters after the shaping technique. A micro) CT study on simulated root canals. *Int J Clin Exp Med.* 2015;15(10):17830-4.
5. **Distel J.W., J.F. Hatton, M.J. Gillespie.** "Biofilm formation in medicated root canals." *J Endod* 2002;28(10):689-93.



6. **Drake D.R., A.H. Wiemann, E.M. Rivera, R.E. Walton.**  
"Bacterial retention in canal walls in vitro: effect of smear layer." J Endod 1994;20(2):78-82.
7. **Ebru Ozsezer D., Elif K., Esra D., Ahmet Yilmaz Ç., Yeliz Tanriverdi Ç.** Efficacy of different instrumentation techniques on reducing *Enterococcus faecalis* infection in experimentally infected root canals. Journal of Dental Sciences 2014;9:23-28.
8. **Estrela C., G.B. Sydney, J.A. Figueiredo, C.R. Estrela.**  
"A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms." J Appl Oral Sci 2009;17(2):87-91.
9. **Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. Int Endod J 2012;34:424-8.
10. **Hubble T.S., J.F. Hatton, S.R. Nallapareddy, B.E. Murray, M.J. Gillespie.** "Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin." Oral Microbiol Immunol 2003;18(2):121-6.

11. **Lim YJ, Park SJ, Kim HC, Min KS.** Comparison of the centering ability of Wave · one and reciproc nickel-titanium instruments in simulated curved canals. Restor Dent Endod. 2013;38:21–5.
12. **Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X**  
J Endod. 2010;36(4):630-5.
13. **Mantri SP, Kapur R, Gupta NA, Kapur CA. Type III**  
apical transportation of root canal. Contemp Clin Dent  
2012;3(1):134–36.
14. **Mehran AH, Abo El-Fotouh M.** Comparison of Effects of ProTaper, HeroShaper, and Gates Glidden Burs on Cervical Dentin Thickness and Root Canal Volume by using Multislice Computed Tomography. J Endod. 2008;34(10):1219–22.
15. **Orstavik D, Haapasalo M.** Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol 1990;6:142-9. □
16. **Orstavik D, Pitt Ford.** Essential Endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis. Oxford, Blackwell Munksgaard. (2008).

17. **Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M.** Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. J Endod 2001;34:429-34.
18. **Pérez-Heredia M, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP.** The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. J Endod. 2006; 32 10:993– 44.
19. **Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR, Dametto FR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, et al.** Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. Int Endod J 2000;33:28-36.□
20. **Piette E. and M. Goldberg.** La dent normale et pathologique, De Boeck Univer (2001).
21. **Pilo R, Corcino G, Tamse A.** Residual dentin thickness of danger zone in mandibular first molars. J Dent Tehran Univ Med Sci 2010;7(4):194–99.
22. **Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 2003;36:1-11.

- 23. Simon, S., Machtou, P., Pertot, W.-J., 2012. Endodontie, JPIO.**  
ed.
- 24. Siqueira Jr JF, Alves FR, Almeida BM, Oliveira JMC, Rôças IN.** Ability of chemomechanical preparation with either rotary instruments or self-adjusting file to disinfect oval-shaped root canals. J Endod 2010;36(11):1860-5.
- 25. Siqueira JF.** Taxonomic changes of bacteria associated with endodontic infections. J Endod 2003;29:619-623.
- 26. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Santos SRLD, Lima KC, Magalhaes FAC, de Uzeda M.** Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. J Endod 2002;28:181-4.
- 27. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC.**  
Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5,25% sodium hypochlorite J Endod 2000;26(6):331-4.
- 28. Siqueira J.F., Jr. and I.N. Rôças** "Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures." J Endod 2008;34(11):1291-1301.

- 29. Soares JA, Carvalho MAR, Santos SMC, Mendonça RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, et al.** Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2010;36 (5):894-8.
- 30. Sundqvist G. and D. Figdor** "Life as a endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals." *Endodontic topics* (6):3-28. (2003).
- 31. Tabrizizadeh M, Reuben J, Khalesi M, Mousavinasab M, Ezabadi GM.** Evaluation of Radicular Dentin Thickness of Danger Zone in Mandibular First Molars. *Journal of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran. Iran* 2010;7(4):196–99.
- 32. Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC.** In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108(5):117-20.
- 33. Toure B, Kane AW, Faye B, Sarr M, Roux D, Traore O, Mbaye M.** Evaluation in vitro de l'action antibactérienne de l'hypochlorite de sodium à 2,5% en fonction du temps de contact avec les parois canalaire. *Dakar Médical* 2005;50(3):104-7.

- 34. Vertucci F. C.** Root canal anatomy of the human permanent teeth. □ Oral Surg, oral Med, oral Path 1984;58,(11):589-599.
- 35. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA.** The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. J Endod. 2003;299:562–564.
- 36. Zbang L, L-Hong-xia, Zhou-Xd, Hong Tan, Huang–Dm.** The Shaping Effect of the combination of Two Rotary Nickel-Titanium Instruments in simulated S-shaped Canals. J Endod. 2008;34(4):31–37.