

LISTE DES ABREVIATIONS

Aa	: <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
AAF	: Aéro-anaérobie facultatif
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
BM	: Bord marginal
BCC	: Bouillon coeur-cervelle
BOP	: Bleeding on Probing.
CA	: Cément acellulaire
CAA	: Cément acellulaire afibrillaire
CAFE	: Cément acellulaire à fibres extrinsèques
CC	: Cément cellulaire
CCFI	: Cément cellulaire à fibres intrinsèques
CFU	: Colony forming unit
CHCA	: Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CID	: Contact inter-dentaire
CVE	: Common Vulnerabilities and Exposures
DHB	: Acide 2,5 dihydroxybenzoïque
DSR	: Détartrage surfaçage radiculaire
Ecal	: <i>Escherichia coli</i>
Fn	: <i>Fusobacterium nucleatum</i>
GA	: Gencive attachée
GM	: Gencive marginale ou libre
HPD	: Hôpital Principal de Dakar
IRD	: Institut de recherche pour le développement

LC	: Lame cribiforme
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LMG	: Ligne mucogingivale
MA	: Muqueuse alvéolaire
Maldi-TOF	: Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionisation, Time of Flight
MMP8	: Matrix metalloproteinase-8
MMP9	: Matrix metalloproteinase 9
M/z	: Masse/Charge
OC	: Os cortical
OS	: Os spongieux
PCGM	: Parodontite chronique généralisée modérée
PCGS	: Parodontite chronique généralisée sévère
PCR	: Polymerase Chain Reaction
<i>Pg</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE2	: Prostaglandines E2
Sheldon Mfg	: Sheldon Manufacturing
SM	: Sillon marginal
TNF	: Tumor Necrotizing-Factor
TOF	: Time of flight
TSVB	: Trypto-caseine-soja, serum, bacitracine, vancomycine
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
UV	: Ultra-Violet

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Aspect clinique de la gencive saine chez l'adulte jeune	5
Figure 2: Les quatre composantes du parodonte	7
Figure 3: Coupe de mandibule humaine au niveau d'une 2 ^{ème} prémolaire	9
Figure 4: Principales bactéries du biofilm organisées en complexes définies par Socransky et al.....	14
Figure 5: Pathogénie des maladies parodontales.	17
Figure 6: Culture de bactéries anaérobies sur des milieux de gélose au sang.....	28
Figure 7: Colonie de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	29
Figure 8: Colonie d' <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	29
Figure 9: Principe de l'identification par MALDI-TOF	34
Figure 6: Exemple de spectre (<i>E.coli</i>).....	48
Figure 11: MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time- of-Flight) de l'hôpital principal.....	49
Figure 12: Principales étapes	50
Figure 13: Technique Time of flight (TOF).....	53
Figure 14: Spectre MALDI-TOF	54
Figure 15 : Distribution de la population selon l'âge	55
Figure 16: Distribution de la population selon le sexe	56
Figure 17: Répartition de la population selon la profession	56
Figure 18: Répartition de l'échantillon selon le diagnostic	57
Figure19: Répartition selon l'indice gingival	57
Figure 20: Répartition selon l'indice de plaque	58
Figure 21: Répartition selon la profondeur de poche.....	58
Figure 22: Répartition selon le type respiratoire.....	59
Figure 23: Répartition selon le diagnostic.....	62

Figure 24: Profil bactériologique des germes retrouvés dans les gingivites.....	63
Figure 25: profil bactériologique des germes r1trouvés dans les PCGM	63
Figure 26: Profil bactériologique des germes retrouvés dans les PCGS	64
Figure 27: Profil bactériologique des germes retrouvés dans les gingivites et les parodontites	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Profil des bactéries correspondante	60
Tableau II: Agent identifié plus d'une seule fois	61
Tableau III: Germes identifiés dans les gingivites et les parodontites.....	65

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : GENERALITES.....	4
CHAPITRE 1 : LE PARODONTE SAIN ET LES MALADIES PARODONTALES	5
1. Parodonte sain.....	5
1.1. Définition.....	5
1.2. Structure du parodonte.....	5
1.2.1. Gencive.....	5
1.2.2. Appareil d'ancrage	7
1.2.2.1. Ligament parodontal ou desmodonte	8
1.2.2.2. Cément	8
1.2.2.3. Os alvéolaire.....	9
2. Maladies parodontales.....	10
2.1. Définition.....	10
2.2. Classification	11
2.3. Anatomopathologie.....	12
2.4. Etiopathogénie	13
2.4.1. Biofilm et complexe bactérien	13
2.4.2. Réaction inflammatoire et réponse immunitaire	15
2.4.3. Facteurs de risque.....	16
3. Intérêt clinique de l'identification bactériologique	18
3.1. Intérêt préventif	18
3.1.1. Entretien clinique	18
3.1.2. Examen parodontal.....	19
3.1.3. Examens biologiques.....	19
3.2 Intérêt diagnostique et thérapeutique.....	20
3.2.1. Diagnostic.....	20
3.2.2. Thérapeutique.....	20
3.3. Intérêt pronostique (réévaluation).....	21
3.4. Intérêt pour le suivi parodontal (maintenance).....	21
CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION BACTERIOLOGIQUE EN PARODONTIE	23
1. Techniques de prélèvement de la flore sous-gingivale	23
1.1. Choix du site	23

1.2. Méthodes de prélèvements	23
1.2.1. Prélèvement à la curette	24
1.2.2. Prélèvement par pointe de papier	24
1.3. Transport.....	25
2. Examen au laboratoire.....	25
2.1. Principe général	25
2.2. Principales étapes.....	26
2.2.1. Macroscopie	26
2.2.2. Coloration de Gram	26
2.2.3. La culture.....	26
2.2.4. Technique d'identification	29
2.2.4.1. Tests biochimiques classiques.....	29
2.2.4.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)	30
CHAPITRE 3 : SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF	33
1. Définition	33
2. Historique.....	33
3. Principe	34
4. Avantages	34
5. Limites.....	35
6. Perspectives.....	36
DEUXIEME PARTIE : TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	37
1. JUSTIFICATION ET OBJECTIF	38
1.1. Justification.....	38
1.2. Objectif.....	38
2. MATERIEL ET METHODES	39
2.1. Cadre d'étude.....	39
2.2. Type d'étude	39
2.3. Population d'étude	39
2.3.1. Méthode d'échantillonnage	39
2.3.2. Critères d'inclusion	39
2.3.3. Critères de non inclusion.....	40
2.4. Procédure de collecte de données et variables étudiées.....	40
2.4.1. Données socio-professionnelles	41
2.4.2. Données cliniques	41

2.4.3. Prélèvement du biofilm	42
2.5 Analyses de laboratoire.....	44
2.5.1 Matériel	44
2.5.2. Traitement des prélèvements.....	45
2.5.2.1. Examen macroscopique	45
2.5.2.2. Examen microscopique	45
2.5.2.3. Choix des milieux	46
2.5.3. Conservation des prélèvements	46
2.5.4. Isolement	47
2.5.5. Conservation des souches bactériennes.....	47
2.5.6. Identification par le MALDI-TOF	47
2.5.6.1. Principe.....	47
2.5.6.2. Technique	48
3. RESULTATS	54
3.1 Caractéristiques socio-professionnelles	54
3.2. Caractéristiques cliniques	57
3.3. Caractéristiques bactériologiques	59
4. DISCUSSION	66
4.1. Limites et considérations méthodologiques.....	66
4.2. Caractéristiques socio-professionnelles	67
4.3. Caractéristiques cliniques	67
4.4. Caractéristiques bactériologiques	67
4.5. Identification selon le diagnostic clinique	69
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	70
REFERENCES.....	70
ANNEXES	

INTRODUCTION

La cavité buccale humaine renferme une flore abondante et polymorphe en micro-organismes dont la majorité sont des bactéries. Mais on y retrouve aussi des virus, des levures et des protozoaires. Cette cavité naturelle constitue avec le colon la partie la plus septique de l'organisme : 1 milligramme de plaque contient environ 100 millions de bactéries. [52].

L'état de santé parodontale est un équilibre fragile entre l'agressivité de cet écosystème et la réponse de l'hôte [53]. Toute perturbation de cet équilibre engendrera l'apparition de manifestations cliniques infectieuses et inflammatoires de type gingivite ou parodontite [68]. Les parodontopathies sont des maladies infectieuses polymicrobiennes à prédominance anaérobie aboutissant à une destruction des tissus de soutien dentaires chez un hôte permissif.

L'identification bactérienne permet de confirmer le diagnostic de parodontite établi par les examens cliniques et radiographiques. Les objectifs de cette identification sont également d'évaluer la charge bactérienne et d'analyser la composition de la plaque sous gingivale en germes pathogènes.

Les techniques d'identification et de typage utilisées en microbiologie clinique ne cessent d'évoluer. Les méthodes conventionnelles reposant essentiellement sur des tests phénotypiques (culture) et génotypiques (biologie moléculaire) ont montré leurs limites liées à la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire, les coûts des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce et enfin le délai important nécessaire pour l'identification. Les limites de ces techniques ont justifié l'apparition sur le marché d'une technique innovante permettant à un laboratoire non seulement d'identifier un grand nombre de bactéries et de champignons, plus ou moins fréquemment rencontrés en clinique mais aussi de réaliser cette identification de manière rapide fiable et peu coûteuse : la spectrométrie de masse type MALDI-TOF [57]. Il s'agit d'un spectromètre de

masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol.

A notre connaissance, aucune étude n'a encore été réalisée en odontologie pour évaluer l'apport du MALDI-TOF dans l'identification microbiologique de la flore buccale. Certaines techniques comme la culture et la PCR ont fait l'objet de plusieurs études [62].

Ainsi, l'objectif de notre travail était d'étudier la composition du microbiote bucco-dentaire et du biofilm sous gingival en bactéries grâce à la spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

La première partie est consacrée à une revue de la littérature sur le parodonte sain et les maladies parodontales et sur les techniques d'identification en bactériologie parodontale. La deuxième partie porte sur l'analyse par la spectrométrie de masse type MALDI-TOF de la composition en bactéries des échantillons de biofilm sous gingival prélevés chez des patients porteurs de maladies parodontales.

**PREMIERE PARTIE :
GENERALITES**

CHAPITRE 1 : LE PARODONTE SAIN ET LES MALADIES PARODONTALES

1. Parodonte sain

1.1. Définition

Le parodonte est défini comme l'ensemble des tissus soutenant et entourant la dent. Il est composé de deux tissus mous, la gencive et le ligament parodontal et de deux tissus minéralisés, le ciment et l'os alvéolaire [8].

1.2. Structure du parodonte

1.2.1. Gencive

La gencive fait partie des tissus mous de revêtement de la cavité buccale. Elle entoure les collets des dents assurant la continuité de l'épithélium buccal au-dessus du ligament parodontal et de l'os alvéolaire. De couleur rose pâle et pigmentée dans certains cas, elle se divise en trois parties: la gencive libre ou marginale la gencive attachée et la gencive papillaire ou interdendaire (figure 1).

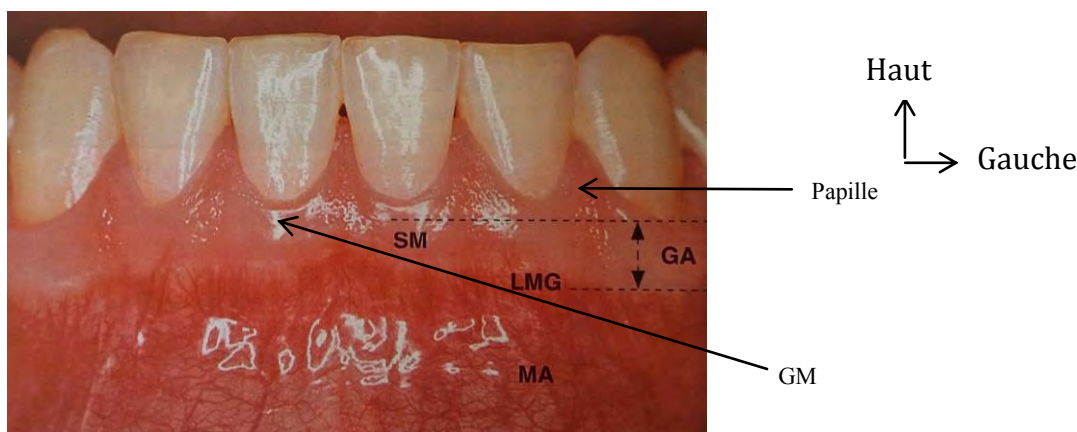


Figure 1: Aspect clinique de la gencive saine chez l'adulte jeune [8].

SM : sillon marginal ; GA : gencive attachée ; MA : muqueuse alvéolaire ;
LMG : ligne mucogingivale ; GM : gencive marginale.

La gencive libre ou marginale entoure le collet des dents. Elle est séparée de la dent par le sillon gingivo-dentaire ou sulcus gingival qui a une profondeur moyenne de 0,3 à 3 mm [54].

La gencive attachée est limitée coronairement par le sillon marginal ou la base du sulcus et apicalement par la ligne mucogingivale qui la sépare de la muqueuse alvéolaire [8].

La gencive papillaire ou interdentaire est située sous les points de contact dentaires. Elle est constituée par deux protubérances triangulaires, les papilles vestibulaires et linguales (ou palatines). Entre ces deux papilles, il existe une zone de dépression appelée col gingival.

Le tissu gingival est constitué d'un tissu conjonctif recouvert d'un épithélium stratifié pavimenteux comprenant l'épithélium gingival oral kératinisé, l'épithélium sulculaire et une formation épithéliale dite épithélium de jonction très caractéristique car assurant l'ancrage de la dent à la gencive [8].

L'attache épithéliale ou l'épithélium de jonction est une mince couche épithéliale située sous le fond du sillon marginal, contre la surface de la dent. L'épithélium de jonction s'étend jusqu'à une zone proche du collet anatomique, près de la jonction amélo-cémentaire. L'épaisseur de l'attache épithéliale varie de 15 à 30 couches cellulaires dans le fond du sillon gingivo-dentaire, pour atteindre 2 ou 3 couches au niveau du collet [31].

Le chorion gingival est un tissu conjonctif contenant des cellules, des fibres, des vaisseaux et nerfs issus des rameaux dentaires inférieurs et maxillaires supérieurs et une substance fondamentale. Parmi les cellules, les fibroblastes se retrouvent en plus grand nombre. On retrouve également des polynucléaires neutrophiles, des monocytes, des mastocytes, des macrophages, des lymphocytes et des plasmocytes. Les fibres sont surtout composées de collagène et sont organisées en faisceaux dont les principaux sont: les fibres dento-gingivales, les fibres dento-périostées, les fibres alvéolo-gingivales (crestales), les fibres circulaires et les fibres transseptales. Le tissu conjonctif par le biais

des fibres, constitue l'attache conjonctive située sous l'attache épithéliale et qui se termine à l'aplomb du sommet de la crête alvéolaire [31].

1.2.2. Appareil d'ancrage

Il est constitué du ligament parodontal ou desmodonte, du ciment et de l'os alvéolaire (figure 2).

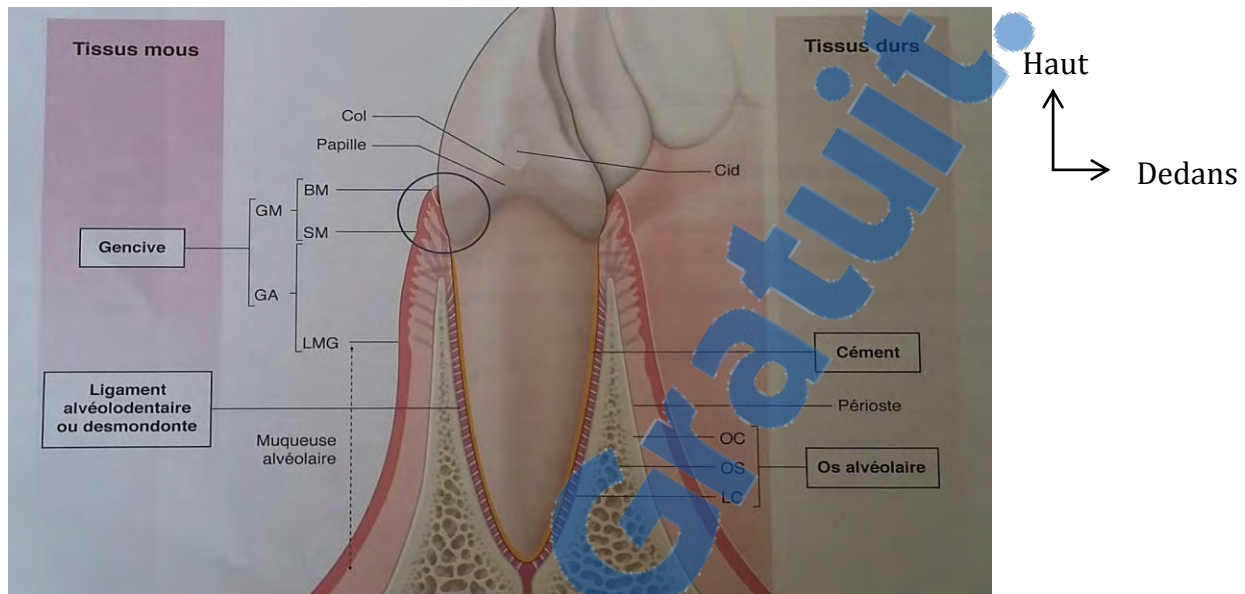


Figure 2: Les quatre composantes du parodonte [8].

BM : bord marginal ; CA : ciment acellulaire ; CC : ciment cellulaire ; LC : lame cribriforme ; CID : contact inter-dentaire ; GA : gencive attachée ; GM : gencive marginale ou libre ; LMG : ligne mucogingivale ; OC : os cortical ; OS : os spongieux ; SM : sillon marginal.

1.2.2.1. Ligament parodontal ou desmodonte

Le ligament parodontal unit la dent à la paroi de l'alvéole et au-delà, aux os maxillaires, l'intégrant à l'appareil stomatognathique. Sa largeur, de l'ordre de 0,3 mm en moyenne, varie en fonction du niveau radiculaire, de l'âge du sujet et de l'état fonctionnel de la dent.

Le ligament parodontal est une structure viscoélastique composée de faisceaux de fibres arrimant la dent à l'os et d'une matrice extracellulaire interstitielle dans laquelle résident différents types cellulaires. Il est richement vascularisé et innervé [8].

1.2.2.2. Cément

Le ciment est un tissu calcifié et minéralisé, semblable à l'os. Il recouvre toute la dentine radiculaire. Il est ni vascularisé ni innervé [28].

Le ciment contient une matrice extracellulaire très proche de celle de l'os. Elle est composée de minéral, de collagène, de protéines non collagéniques, de lipides et d'eau [8].

Il existe plusieurs types de ciments qui diffèrent les uns des autres par leur localisation, leur structure, leur vitesse de formation et leur fonction [7].

Le ciment acellulaire afibrillaire (CAA) composée d'une matrice minéralisée dépourvue de collagène et ne participe à l'ancrage de la racine dans l'alvéole.

Le ciment acellulaire à fibres extrinsèques (CAFE) composant essentiel du système d'attache, permet l'ancrage des fibres du ligament dans la racine.

Le ciment cellulaire à fibres intrinsèques (CCFI) se forme après la fermeture de l'apex et répond aux contraintes mécaniques qui s'exercent sur la racine.

Le ciment acellulaire à fibre intrinsèques stratifié (CAFI) : retrouvé aussi au niveau de l'apex et les zones interradiculaires.

1.2.2.3. Os alvéolaire

L'os alvéolaire est la partie du maxillaire et de la mandibule qui forme et supporte les alvéoles dentaires. Il est formé par la réunion de deux corticales vestibulaire et linguale et sa morphologie varie en fonction des formes et des positions des racines. Il se développe avec les dents et s'efface presque totalement après leur disparition [28].

Le tissu osseux est constitué de zones minéralisées et non minéralisées contenant des cellules osseuses, des éléments vasculaires et nerveux et une matrice extracellulaire. L'os trabéculaire enserme la moëlle osseuse (figure3) [8]. Ces aspects anatomiques et physiologiques du parodonte peuvent être l'objet de modifications pathologiques avec comme facteur étiologique principal le biofilm bactérien.

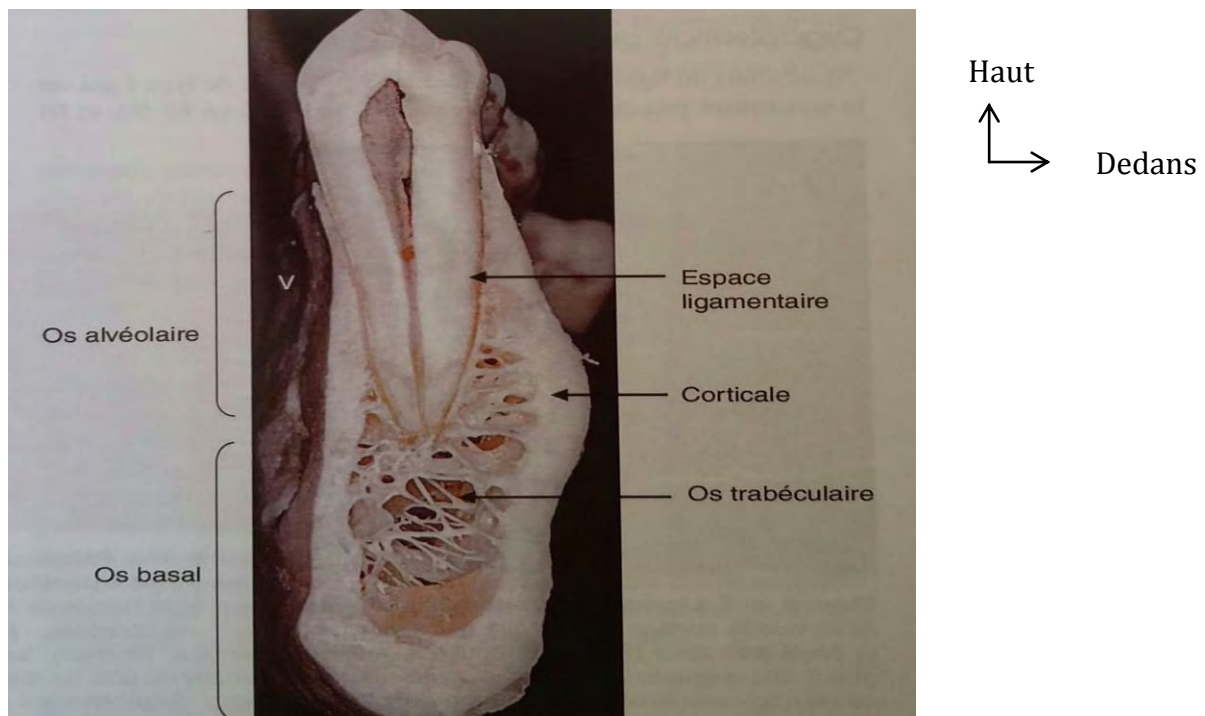


Figure 3: Coupe de mandibule humaine au niveau d'une 2^{ème} prémolaire [8].

2. Maladies parodontales

2.1. Définition

Les maladies parodontales sont des processus pathologiques affectant les tissus de soutien de la dent qui comprennent : la gencive, le cément, le ligament parodontal et l'os alvéolaire [8].

Les maladies parodontales peuvent atteindre :

- le parodonte superficiel (gencive) réalisant les gingivites correspondant à une inflammation cliniquement décelable de la gencive sans perte d'attache ;
- le parodonte profond (cément, ligament parodontal et os alvéolaire) réalisant les parodontites, correspondant non seulement à une atteinte du parodonte superficiel, mais aussi à une perte d'attache et une lyse de l'os alvéolaire.

Les gingivites liées à la plaque sont des réactions inflammatoires de la gencive associées à une flore microbienne non spécifique complexe et sont réversibles [8]. Des travaux désormais classiques démontrent que la diminution de la quantité de plaque bactérienne autour des dents par un simple brossage entraîne une disparition des symptômes cliniques de l'inflammation [38, 64]. Cette gingivite est la conséquence d'une interaction entre les microorganismes d'une part, les tissus et les cellules inflammatoires de l'hôte. D'autre part cette interaction hôte/bactéries peut être altérée par des facteurs locaux et/ou systémiques tels les variations hormonales lors de la puberté, les cycles menstruels ou la gestation [25].

Les parodontites chroniques sont induites par une communauté microbienne pathogène entraînant un décollement des fibres collagènes de la surface cémentaire et une migration apicale par destruction de l'épithélium de jonction. Cette perte de l'attache conjonctive autour des dents associée à une nécrose de

l'attache épithéliale participe secondairement à une résorption irréversible de la partie coronaire de l'os alvéolaire de support (alvéolyse). Les parodontites ne sont donc en aucun cas des maladies osseuses mais des maladies du système d'attache de la dent, même si cette perte d'attachement a pour conséquence une lyse de l'os alvéolaire. Ainsi, la perte d'attache est le signe cardinal des parodontites [8].

Il est important de comprendre que l'énoncé du diagnostic de la parodontite présuppose implicitement celui de la gingivite alors que, le diagnostic de la gingivite exclut celui de la parodontite [8].

2.2. Classification

Au cours des vingt dernières années, plusieurs classifications des différentes manifestations cliniques des parodontites ont été présentées puis adoptées à la suite des conférences de consensus scientifiques en Amérique du Nord en 1989 et en Europe en 1993 [45]. Toutefois, des recherches cliniques dans de nombreux pays sur les formes de ces maladies ont montré que plusieurs caractéristiques de la maladie ne répondaient plus à des critères scientifiques. En particulier cette classification était principalement basée sur l'âge des patients lors du diagnostic. Il manquait des preuves pour faire une distinction claire entre la parodontite de l'adulte, la parodontite réfractaire et les différentes formes de parodontites précoces. Il a été observé qu'en présence d'une parodontite chronique, la destruction des tissus de soutien provoquée par l'accumulation de facteurs locaux tels que la plaque et le tartre, pouvait survenir bien avant l'âge de trente-cinq ans. Parfois, les formes progressives de la maladie apparaissent chez des personnes de plus de trente-cinq ans, et suivaient une distribution familiale. Enfin l'académie américaine de parodontologie définit les parodontites réfractaires chez les patients qui ne présentent pas une amélioration aux traitements entrepris quelles que soient la fréquence et la minutie [18, 29, 45, 65].

Suite à ces considérations Armitage en 1999 a proposé au cours de l' « International Workshop for a Classification system of Periodontal Diseases and Conditions », une nouvelle définition et classification des maladies parodontales. Depuis, nous distinguons les maladies gingivales induites et non induites par la plaque, la parodontite chronique, la parodontite agressive, la parodontite secondaire aux désordres systémiques, la parodontite nécrotique, les abcès parodontaux, les lésions endo-parodontales et les anomalies acquises ou innées du développement [3].

2.3. Anatomopathologie

Page et Schroeder distinguent quatre stades histopathologiques dans la rupture de l'homéostasie parodontale et la progression de la maladie. Les trois premiers stades (ou lésions) correspondent à l'inflammation du parodonte superficiel, tandis que le quatrième stade correspond à l'atteinte du parodonte profond, c'est à dire à la parodontite [50]. On retrouve dans cette description les principes généraux de l'inflammation, tant dans les phénomènes vasculaires (augmentation de la perméabilité et vasodilatation) que cellulaires (mobilisation des phagocytes et des cellules immunocompétents). Cette description confirme le fait que les maladies parodontales se développent de façon assez banale, dans un environnement unique cependant, lié au caractère transgingival de l'organe dont elles détruisent le support. Enfin, la classification anatomopathologique de Page et Schroeder confirme bien que les maladies parodontales ne sont pas des maladies osseuses mais des maladies du système d'attache de la dent [8].

La lésion initiale apparaît dans les 2 à 4 jours qui suivent le début de l'accumulation de la plaque bactérienne. Macroscopiquement elle n'est pas distinguable de la gencive saine car les modifications tissulaires et cellulaires qui la caractérisent restent discrètes et limitées [36].

La lésion précoce apparaît après 5 à 7 jours d'accumulation de plaque ; les premiers signes d'inflammation gingivale sont observables cliniquement.

En l'absence de traitement, la lésion précoce évolue rapidement en lésion établie, en 3 semaines environ après l'arrêt du brossage. La lésion reste toujours centrée autour du fond du sulcus, mais son extension au sein du tissu conjonctif gingival progresse.

La lésion avancée se caractérise par l'extension de l'inflammation en direction apicale associée à une destruction des tissus d'ancrage. L'inflammation s'étend dans le tissu conjonctif en direction de l'os alvéolaire et du ligament parodontal, entraînant une perte osseuse significative et la formation d'une poche parodontale.

2.4. Etiopathogénie

2.4.1. Biofilm et complexe bactérien

Il est maintenant clairement démontré que les maladies parodontales, gingivites et parodontites, sont des maladies infectieuses provoquées par certaines des 300 à 500 espèces bactériennes qui peuvent coloniser la cavité buccale [22]. Certaines de ces bactéries vont coloniser les surfaces dentaires et former la plaque dentaire encore appelée biofilm dentaire [5, 49]. Ce biofilm dentaire commence à se former quelques minutes après son élimination mécanique sur les surfaces dentaires situées au-dessus de la gencive (biofilm supra-gingival). Quatre heures après un nettoyage minutieux des surfaces dentaires, 10^3 à 10^4 bactéries par millimètre carré de surface dentaire ont déjà colonisé la région cervicale des dents [44, 46]. Le biofilm dentaire s'enrichit progressivement en bactéries qui se multiplient alors à la surface pour former des couches successives constituées de colonies bactériennes de nature différente. Si ce biofilm n'est pas correctement éliminé au cours des manœuvres d'hygiène bucco-dentaire, il donnera naissance à un biofilm dans le sillon gingivo-dentaire (biofilm sous-gingival) qui est plus complexe dans son organisation. L'environnement sous-gingival influence les conditions de croissance de certaines bactéries et en particulier de bactéries à Gram-négatif, anaérobies. Au

fur et à mesure que le biofilm se forme, une inflammation gingivale s'installe tout d'abord sous la forme d'une gingivite, c'est à dire en l'absence de destructions tissulaires irréversibles [59]. Les nouvelles conditions environnementales générées par cette inflammation gingivale, associées à un hôte permissif, autorisent la colonisation par des bactéries à fort potentiel virulent, bactéries que l'on retrouve dans les destructions tissulaires osseuses associées aux parodontites [58]. Ces bactéries qualifiées de parodontopathogènes sont des bactéries à Gram-négatif, anaérobies strictes ou microaérophiles. Nous pouvons citer parmi celles-ci *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* [44]. L'expression des facteurs de virulence possédés par ces bactéries, c'est-à-dire l'expression de leur pouvoir pathogène, l'initiation et le développement d'une parodontite, est sous la dépendance d'une part des relations bactéries/bactéries (coopérations inter-bactériennes) et d'autre part des relations hôte/bactéries.

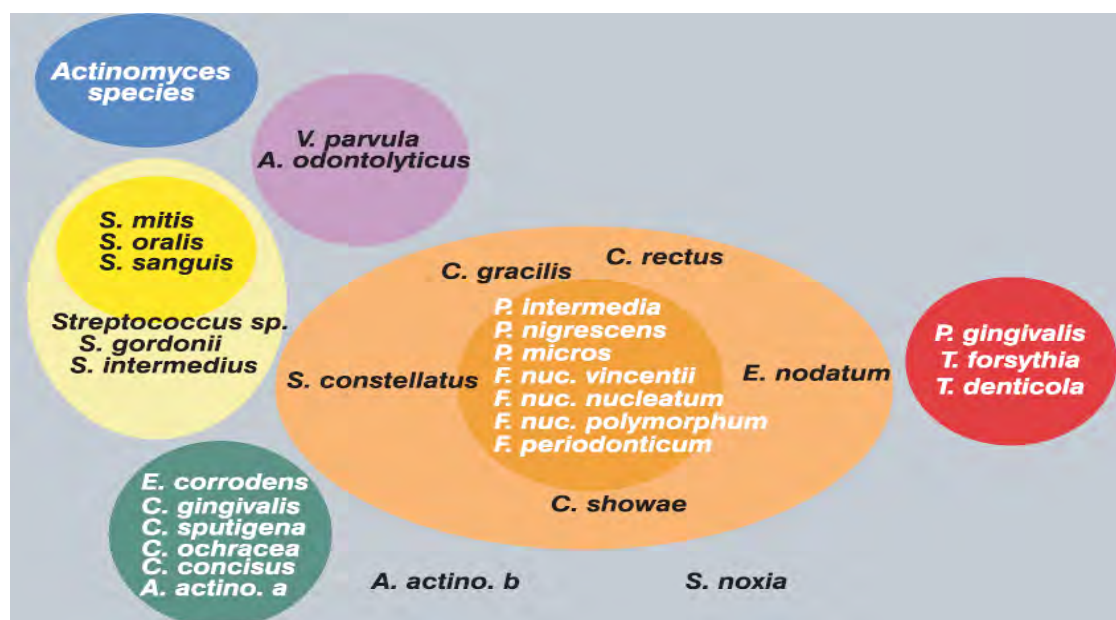


Figure 4: Principales bactéries du biofilm organisées en complexes définies par Socransky et al [60].

Selon la nature des bactéries, Socransky et al. ont décrit différents complexes. Les complexes rouge et orange contiennent les bactéries les plus virulentes. Les complexes vert, jaune et violet contiennent des bactéries compatibles avec la santé parodontale d'après Socransky et al en 1998 (figure 4).

2.4.2. Réaction inflammatoire et réponse immunitaire

L'exposition constante aux bactéries, à leurs composés et aux produits de leur métabolisme stimule l'ensemble des réactions de défense de l'organisme constitué par la réponse inflammatoire locale et par les réactions immunitaires. Les bactéries parodontopathogènes accumulées dans l'environnement sous-gingival peuvent alors initier et entretenir des destructions tissulaires parodontales et en particulier des destructions osseuses alvéolaires. Il y a alors la formation d'une poche parodontale qui est la traduction clinique pathognomonique de ces destructions tissulaires et donc des parodontites. Les lyses tissulaires tant conjonctive qu'osseuse [47] sont le résultat soit de l'action directe des bactéries par libération d'enzymes et de substances cytotoxiques, soit de leur action indirecte suite à l'activation des cellules de défense de l'hôte. En effet, le déclenchement de la réponse immunitaire aboutit à la libération de cytokines par les macrophages et les lymphocytes et en particulier de l'Interleukine-1 β et du *Tumor-Necrotizing-Factor* TNF- α qui sont parmi les plus actives. Ces cytokines participent également chez des cellules cibles comme les fibroblastes, les granulocytes neutrophiles ou les ostéoblastes à l'activation des mécanismes endogènes de destruction tissulaire par le biais entre autres des métalloprotéinases matricielles (MMP8 et MMP9) [49]. De plus certaines, bactéries comme *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) et *Porphyromonas gingivalis* (Pg) peuvent pénétrer les tissus parodontaux ainsi que les cellules et y former de véritables colonies échappant ainsi aux systèmes de défense.

Les maladies parodontales sont ainsi des infections parodontales à bactéries Gram-négatif dont les manifestations biochimiques sont l'augmentation locale, c'est à dire au niveau parodontal, du taux des prostaglandines pro-inflammatoires et de cytokines [49] et l'augmentation systémique de certains médiateurs de l'inflammation [48].

2.4.3. Facteurs de risque

Les maladies parodontales ont une étiologie multifactorielle.

- Facteurs locaux fonctionnels [35] :
 - dents absentes non remplacées ;
 - malocclusion ;
 - parafunctions.

- Facteurs systémiques ou intrinsèques [19, 30, 43, 67]

Certaines pathologies systémiques associées à la présence du facteur local peuvent faciliter la destruction des tissus parodontaux. Elles agissent en abaissant la résistance des tissus parodontaux à l'agression bactérienne. Ces facteurs systémiques peuvent être:

- les maladies métaboliques (diabète) ;
- les maladies hématologiques (leucémie, thrombopénie, neutropénie cyclique) ;
- la prise de certains médicaments (anticonvulsifs, immunosuppresseurs, contraceptifs oraux) ;
- la malnutrition ;
- les facteurs psychologiques (émotion, stress) ;
- les facteurs héréditaires.

Pathogénie des maladies parodontales. D'après Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000 1997; 14:9-11.

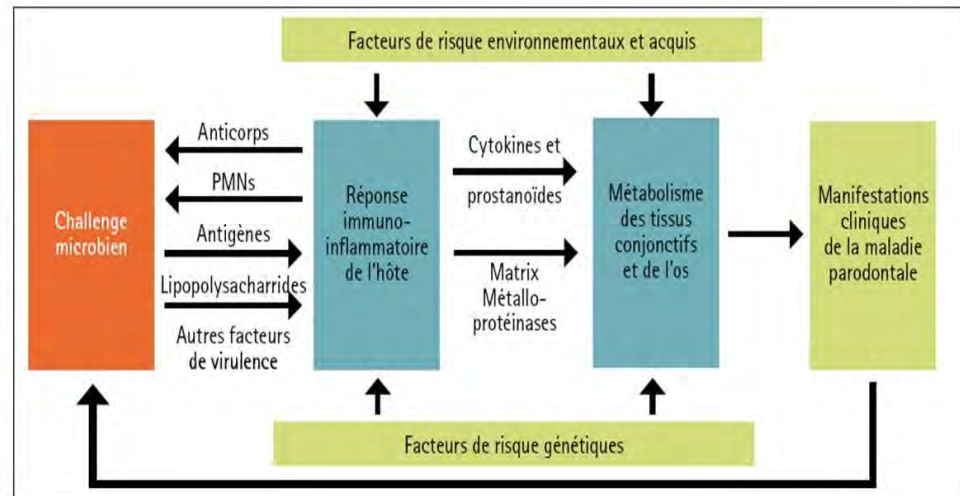


Figure 5: Pathogénie des maladies parodontales [49].

Les maladies parodontales sont des infections bactériennes mixtes qui entraînent la destruction des tissus de support de la dent. Des études épidémiologiques ont révélé qu'environ 10% de la population est atteinte de la forme sévère et généralisée. Trois espèces bactériennes à Gram négatif retrouvées dans la plaque dentaire, soit *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, ont pu être fortement associées à ces maladies. Ces bactéries parodontopathogènes possèdent différents facteurs de virulence leur permettant de coloniser les sites sous-gingivaux, d'échapper au système de défense de l'hôte et de créer des dommages tissulaires. La réponse immunitaire de l'hôte, en réponse à l'agression bactérienne constante, est un facteur déterminant dans la progression de la maladie. Un certain nombre de cytokines, de médiateurs de l'inflammation (PGE2) et de métalloprotéinases matricielles ont été associés à la progression des parodontites (figure 5). Les traitements classiques proposés pour les parodontites ont pour but d'éliminer par détartrage et surfaçage radiculaire le facteur étiologique primaire, soit la plaque bactérienne. De nouvelles approches visant à moduler la réponse inflammatoire de l'hôte ont récemment été développées et pourraient s'avérer utile dans le

traitement des parodontites agressives et des parodontites chroniques qui peuvent être réfractaires aux thérapies conventionnelles.

La nature infectieuse des maladies parodontales et les résultats limités des thérapeutiques mécaniques conventionnelles pour le traitement de certaines formes de parodontites justifie dans certains cas l'utilisation des techniques d'identification bactérienne présentant des intérêts multiples.

3. Intérêt clinique de l'identification bactériologique

La prise en charge d'un patient suspect d'infection bactérienne repose classiquement sur l'identification de l'agent pathogène au site d'infection et sur le choix du meilleur traitement antibiotique.

L'identification bactérienne permet de confirmer le diagnostic de parodontite établi par les examens cliniques et radiographiques. Les objectifs de cette identification peuvent également être d'évaluer la charge bactérienne, d'évaluer la composition de la plaque sous gingivale en germes pathogènes, d'établir un antibiogramme et de vérifier l'éradication de ces germes avant traitement complexe correcteur de régénération ou d'implantologie.

Ainsi si cette identification bactérienne est réalisée avant la thérapeutique, elle constitue alors une aide de taille au choix d'une antibiothérapie. Réalisée après thérapeutique (3 mois après l'antibiothérapie), elle permet de vérifier l'éradication des germes pathogènes, en cas d'échec d'un traitement conventionnel et en maintenance parodontale, lors de la découverte de sites en activité.

3.1. Intérêt préventif

3.1.1. Entretien clinique

L'entretien clinique constitue la première étape du dépistage. Un individu à risque est un sujet qui, en l'absence de manœuvres préventives adéquates, souffrira, avant l'âge de 50 ans, d'une édentation partielle ou totale invalidante,

conséquence de la maladie parodontale. Le dépistage du risque parodontal s'effectue sur des sujets indemnes de perte d'attache mais risquant de ne pas le rester. Ce risque devra donc être réévalué régulièrement tous les ans [10].

Puisque les caractéristiques des sujets à risque qui développent une maladie parodontale sévère sont les mêmes que ceux qui récidivent après traitement, le traitement et la thérapeutique de parodontale de soutien devront être encore plus rigoureux. Par conséquent, si une des caractéristiques est retrouvée chez un patient déjà atteint de parodontite, le traitement et la maintenance devront être encore plus rigoureux [4].

3.1.2. Examen parodontal

L'entretien est suivi d'un examen parodontal minutieux qui évaluera :

- l'inflammation des tissus superficiels ;
- la qualité du contrôle de plaque ;
- la mobilité des dents.

Le sondage permettra d'apprécier :

- la profondeur de poche ;
- la perte d'attache ;
- les récessions ;
- le saignement au sondage.

3.1.3 Examens biologiques

Une fois l'entretien et les examens cliniques réalisés, trois situations peuvent se présenter :

- le sujet à faible risque parodontal ;
- le sujet à risque parodontal moyen ;
- le sujet à haut risque parodontal.

3.2 Intérêt diagnostique et thérapeutique

3.2.1 Diagnostic

Un diagnostic précis de la maladie parodontale et de son activité s'avère indispensable pour évaluer son étendue chez un patient donné. Or, si le clinicien a besoin d'un test biologique qui facilite la détection de pathogènes parodontaux, il doit se poser la question de savoir ce qui est mesuré. En effet, les tests évaluent le taux de pathogènes parodontaux, mais ne mesurent pas forcément la sévérité de la maladie.

Les tests microbiologiques ne sont donc pas en eux même des tests diagnostic de la maladie parodontale, mais font partie d'un ensemble de moyens à la disposition du praticien, avec les moyens cliniques et radiologiques, pour confirmer un diagnostic. Ces tests doivent donc être interprétés en fonction du contexte clinique dont ils sont indissociables [40].

3.2.2. Thérapeutique

La sévérité de la maladie parodontale est déterminée par la composition de la flore sous gingivale, la quantité totale de bactéries et la sensibilité de l'hôte [66].

La microbiologie clinique peut chez certains patients contribuer à rendre plus efficace la thérapeutique conventionnelle, en guidant le choix de l'antibiothérapie adjuvante. Dans ce cas le but du test bactériologique sera d'identifier les espèces microbiennes en présence pour déterminer l'antibiotique ou l'association d'antibiotiques les plus adaptés pour combattre l'infection.

Actuellement, seule la culture bactérienne permet la réalisation d'un antibiogramme ; les techniques génétiques peuvent mettre en évidence des gènes de résistance aux antibiotiques, mais il n'existe pas encore d'application clinique.

3.3. Intérêt pronostique (réévaluation)

La réévaluation permet de juger de l'efficacité du geste thérapeutique. Elle se fait à chaque étape du plan de traitement et permettra d'envisager ou non un traitement complémentaire, c'est-à-dire :

- après apprentissage du contrôle de plaque ;
- après détartrage supra et sous gingival et élimination des facteurs de rétention de plaque, associé ou non à une antibiothérapie systémique ;
- après surfaçage à l'aveugle, associé ou non à une antibiothérapie systémique ;
- après les thérapeutiques complémentaires (chirurgie, orthodontie, prothèses).

Lors de cette réévaluation, les tests bactériologiques doivent permettre de détecter des pathogènes résiduels non éliminés par le traitement.

3.4. Intérêt pour le suivi parodontal (maintenance)

La maintenance ou soins parodontaux de soutien consiste à maintenir les résultats cliniques obtenus par la thérapie.

Elle est délivrée à intervalles réguliers et comprend :

- une incitation à la pratique des soins d'hygiène ;
- l'élimination du tartre et autres facteurs de rétention de plaque ;
- le nettoyage professionnel des dents.

La maintenance avec l'examen clinique et le diagnostic sont les trois étapes obligatoires de tout traitement parodontal de la gingivite à la parodontite complexe. Cette thérapeutique de maintenance débute immédiatement après la fin du traitement actif.

Les objectifs de la maintenance sont donc :

- ✓ l'élimination optimale de la plaque ;
- ✓ le maintien des résultats acquis après le traitement actif, c'est-à-dire les résultats concernant la profondeur de poche et le niveau d'attache de la gencive.

CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION BACTERIOLOGIQUE EN PARODONTIE

1. Techniques de prélèvement de la flore sous-gingivale

Les tests biologiques nécessitent le prélèvement de la flore sous gingivale (microscopie, culture bactérienne...) ou le prélèvement du fluide gingival pour les analyses biochimiques.

1.1. Choix du site

Le choix du site de prélèvement se fait après analyse des signes habituels d'activité de la maladie [69] :

- saignement au sondage ;
- indice gingival ;
- perte d'attache ;
- profondeur de poche.

Après avoir considéré ces différents paramètres cliniques et radiologiques, le site de prélèvement est choisi, par exemple au niveau d'une dent présentant la poche la plus profonde d'un quadrant [73]. Si plusieurs sites d'un quadrant présentent une profondeur de poche identique, le choix du site de prélèvement se fera de façon arbitraire.

Les prélèvements peuvent se faire par pool ou site par site. En pool, les prélèvements de différents sites sont placés dans un même milieu de transport. En site par site, chaque site a son milieu de transport.

1.2. Méthodes de prélèvements

Les deux méthodes les plus couramment utilisées pour collecter la plaque sous gingivale sont le prélèvement à la curette et le prélèvement par pointe de papier [39]. Ces techniques requièrent toutes deux l'élimination préalable de la plaque

supra gingivale pour empêcher la contamination ou la dilution de l'échantillon.

1.2.1. Prélèvement à la curette

Cette technique a été appliquée par de nombreux auteurs [37] . Les étapes sont les suivantes :

- suppression de toute la plaque microbienne supra gingivale ;
- introduction d'une curette parodontale propre, stérile de la façon la plus délicate possible afin de léser le moins possible le tissu gingival ;
- prélèvement du contenu bactérien.

Le procédé peut être répété plusieurs fois si cela est nécessaire afin d'obtenir une quantité suffisante de flore gingivale.

1.2.2. Prélèvement par pointe de papier

Cette technique diffère peu de la technique précédemment décrite si ce n'est que le prélèvement n'est pas réalisé à la curette mais à l'aide de pointes de papier stériles.

La technique de prélèvement actuellement recommandée est la suivante [15, 73]. Les prélèvements doivent être effectués au moins deux heures après toute prise d'aliments, de boisson ou après brossage des dents. La plaque dentaire supra gingivale est d'abord éliminée à l'aide de curettes, de compresses et de sérum physiologique stérile. Après nettoyage, les sites choisis sont isolés de la salive par des rouleaux de coton salivaires puis séchés à l'air. Une pointe de papier stérile est saisie avec une précelle stérile et introduite dans la poche à analyser jusqu'à sentir une résistance. Après dix à vingt secondes, la pointe est retirée.

Lors de son retrait, la pointe ne doit pas entrer en contact avec de la salive, du pus ou la muqueuse buccale. La pointe est alors introduite dans un tube de transport pour analyse.

1.3. Transport

Le milieu de transport va servir d'hôte artificiel intermédiaire entre le milieu de prélèvement et le milieu d'étude.

Selon MOLLER en 1966 [41], le milieu de transport utilisé est le VGMA III. Il s'agit d'un milieu semi- gélosé afin d'éviter une trop grande oxygénation. Il contient une partie nutritive pour maintenir la vitalité bactérienne et une partie inhibitrice pour éviter qu'une souche ne prenne le dessus sur une autre. Enfin, c'est un milieu équilibré du point de vue ionique pour protéger la structure bactérienne fragile. A l'arrivée, il ne faut pas que le ratio de bactéries ait changé afin que le prélèvement soit le reflet de la population sous-gingivale.

D'après DAHLEN [15], ce milieu permet de conserver les bactéries anaérobies pendant 24 heures, certaines espèces comme *Pg* peuvent y vivre jusqu'à 6 jours.

Les échantillons sont ensuite adressés par simple courrier au laboratoire d'analyses et doivent être traités dans un délai de 48 heures après le prélèvement. Le temps de transport est important car il conditionne la vitalité des germes ; celui-ci est dépendant des aléas de la vie (grève, problème de transport, variation de température...), surtout si le laboratoire est loin du lieu de prélèvement [56].

2. Examen au laboratoire

2 .1. Principe général

Il s'agit ici de mettre en évidence les pathogènes potentiellement présents dans les prélèvements. Pour cela, ces prélèvements sont mis en contact avec des milieux nutritifs qui miment les conditions que les bactéries allaient trouver dans l'organisme. Une fois en contact avec ces milieux, les bactéries vont proliférer et donner des colonies individualisées. A partir de ces colonies bien individualisées et pures, il s'agira de faire l'identification par les différentes méthodes et selon plusieurs étapes.

2.2. Principales étapes

Elles commencent par l'observation du prélèvement et finissent par l'identification en passant par la coloration de Gram et la culture.

2.2.1. Macroscopie

Il s'agit d'observer l'aspect du prélèvement tout en notant les caractéristiques globale notamment l'odeur, l'aspect et la couleur du produit pathologique. Il faut remarquer au passage que les suppurations à germes anaérobies sont généralement marrons et d'odeur fétide.

2.2.2. Coloration de Gram

C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Nous avons les bactéries à Gram négatif qui apparaissent roses et les bactéries à Gram positif qui apparaissent violettes. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme. Elle permet ainsi, avec la reconnaissance de la morphologie et le mode de groupement des bactéries de renseigner sur le genre dont font partie les bactéries étudiées.

2.2.3. La culture

C'est la seule méthode qui permet d'avoir des colonies bien individualisées de la bactérie recherchée. Différents types de cultures existent: la culture en milieu liquide qui facilite la multiplication et la culture en milieu solide.

Puisque les anaérobies sont les bactéries les plus souvent incriminées dans les parodontites, il est nécessaire d'utiliser des milieux les plus adaptés possibles à l'anaérobiose. L'idéal est d'utiliser dans ces conditions les milieux du genre Schaedler, mais la gélose au sang cuit communément appelé gélose chocolat permet aussi de faire pousser ces bactéries.

Lorsque l'examen direct montrait une flore pauvre ou un aspect monomicrobien, des milieux liquides d'enrichissement (bouillon au thioglycolate, bouillon Schaedler) peuvent être utilisés. Par contre lorsqu'une flore polymicrobienne était observée, des milieux solides sélectifs étaient utilisés.

Comme les exigences particulières des bactéries dont la présence est soupçonnée sont encore inconnues à ce stade du diagnostic, la règle est d'ensemencer divers milieux, enrichis ou non en facteur de croissance.

Les milieux liquides non sélectifs (une Gélose Nutritive Ordinaire) permettent de cultiver beaucoup d'espèces bactériennes sans en modifier la croissance. Ils fournissent à l'examineur la possibilité de détecter des espèces bactériennes non suspectées, à condition que ces espèces puissent croître dans des conditions non spéciales.

Les milieux solides sélectifs, contiennent des agents de nutrition et des agents d'inhibition ; ils favorisent ainsi la croissance de certaines espèces au détriment des autres. Cette sélection permet d'augmenter la sensibilité de détection après culture lorsque l'échantillon de départ contient un faible niveau de bactéries recherchées ou lorsque les bactéries que l'on recherche ne croissent pas sur des milieux non sélectifs. L'utilisation de ces milieux sélectifs impose la recherche de bactéries cibles. Ainsi le TSVB décrit par SLOTS en 1982 est utilisé pour faire croître sélectivement Aa, tandis que le CVE permet de cultiver Fn [71].

Les échantillons ensemencés sur les différents milieux sont ensuite placés dans une atmosphère aérobie ou anaérobie. Comme la plupart des pathogènes parodontaux sont anaérobies (capnophiles pour Aa), il est nécessaire de les faire croître dans une enceinte recréant leur milieu de vie.

L'incubation des préparations est réalisée pendant au moins 3 jours à 37°C dans des jarres d'anaérobiose ou des enceintes anaérobies (80% N₂, 10% CO₂,

10%H₂) contrôlées par des bandelettes de bleu de méthylène virant au blanc en l'absence d'oxygène

L'anaérobiose est obtenue par trois techniques :

- par Bio-bag, c'est un sac scellé contenant un générateur d'anaérobiose ; la technique est peu coûteuse mais peu efficace ;
- par une jarre d'anaérobiose, c'est un environnement hermétique contenant également un générateur d'anaérobiose ;
- par une chambre anaérobique ; c'est la plus efficace.

Le temps de culture varie de trois jours à trois semaines.

Une première culture d'isolement des différentes bactéries de l'échantillon est réalisée (figure 6). Puis un repiquage est effectué sur d'autres géloses avec les bactéries isolées pour obtenir que des cultures « pures » (figure 7 et 8) . Ces bactéries clonées servent pour les tests d'identification.



Figure 6: Culture de bactéries anaérobies sur des milieux de gélose au sang (WOLF, 2005) [73].

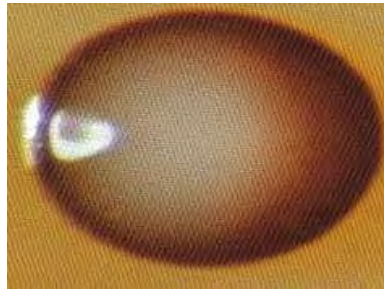


Figure 7: Colonie de *Porphyromonas gingivalis* (WOLF 2005) [73].



Figure 8: Colonie d' *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Après 24 à 48 heures d'incubation, les bactéries forment des colonies (*colony forming unit* (CFU) différentes, chaque bactérie donnant un type de colonie caractéristique par sa taille, sa forme et sa couleur ; ce qui permet de l'identifier déjà de façon visuelle avant la confirmation par les tests d'identification.

A partir de chacune de ces colonies, des ré-isolements sont réalisés sur des boîtes pures à partir desquelles on pourra faire l'identification par différentes techniques notamment les tests enzymatiques ou biochimiques, la PCR et enfin le MALDI-TOF dont les détails techniques seront développés.

2.2.4. Technique d'identification

Après avoir eu des colonies bien isolées dans des boîtes pures, il s'agira ensuite d'identifier chacune d'elles de façon précise en leur donnant un nom. Différentes techniques d'identification existent.

2.2.4.1. Tests biochimiques classiques

Les méthodes d'identification utilisées en routine dans les laboratoires de

microbiologie sont des méthodes dites conventionnelles et reposent essentiellement sur des tests phénotypiques et/ou biochimiques. L'identification se déroule en plusieurs étapes :

- ✓ elle débute par un simple examen microscopique des préparations non fixées (mobilité ou immobilité des bactéries, aspect des colonies) ; c'est l'examen direct. Cet examen taxonomique permet d'identifier les morphologies caractéristiques d'un genre bactérien ;
- ✓ les préparations sont ensuite colorées avec des colorations standard comme la coloration de Gram ou le bleu de Méthylène ;
- ✓ les informations recueillies sur la taille et la morphologie des colonies ainsi que leur pigmentation permettent de conforter le diagnostic de présomption de début d'examen ;
- ✓ le diagnostic est confirmé par l'utilisation des résultats de tests standardisés pour chaque famille de bactéries. Il s'agit de galeries d'identification enzymatique et biochimique, comportant une série d'épreuves nécessaires et suffisantes au diagnostic des principales espèces pathogènes.

2.2.4.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

- Définition

La réaction de polymérasation en chaîne (Polymerase Chain Reaction) est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro* qui permet de multiplier en grand nombre une séquence d'ADN connue, présente dans l'échantillon même en très faible quantité.

- Principe

La réaction PCR permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

- Protocole

La technique se déroule en trois étapes chacune constituant un cycle au cours duquel la quantité d'ADN va être doublée :

- ✓ La première étape est celle de la dénaturation. Les amorces sont additionnées à une solution contenant un double brin d'ADN issu d'un échantillon de plaque du patient. Le mélange est chauffé au-delà de la température de fusion ; quand il atteint la température de 90-95°C, le double brin est dénaturé en un mélange de simples brins ;
- ✓ La deuxième étape est celle de l'hybridation. La température de dénaturation est maintenue pendant 30 secondes à une minute, puis le mélange est refroidi lentement à une température de 40-65°C, ce qui permet aux amorces d'hybrider les localisations spécifiques du simple brin d'ADN ;
- ✓ La dernière étape est celle de l'élongation. La température d'hybridation est maintenue pendant 30 secondes à une minute, puis l'élévation progressive de la température aux alentours de 70-75°C permet l'action de la polymérase thermo-résistante qui amplifie la séquence choisie.

Un nouveau cycle est alors mis en route. Ces cycles répétés de dénaturation-hybridation-élongation produisent ainsi de nombreuses copies du fragment d'ADN initial. L'amplification d'une séquence d'ADN unique et originale en un large nombre de séquences identiques autorise leur détection grâce à par l'utilisation de sondes spécifiques à la séquence cible et aux techniques d'hybridations classiques.

L'amplification des séquences d'ARN est possible, notamment lors de l'étude concernant les ARN ribosomiaux bactériens. Dans ce cas l'ARN cible est d'abord recopié en une chaîne d'ADN complémentaire par une «transcriptase reverse», puis la PCR classique est appliquée. GRIFFEN et coll. en 1992 ont

appliqué cette méthode pour la détection de Aa.

La PCR classique permet de mettre en évidence les plus petites quantités d'ADN par amplification. Le résultat de la réaction peut être rendu visible par d'autres étapes de laboratoire. Elle livre une détermination des bactéries, la quantification fiable des bactéries présentes dans l'échantillon de départ n'étant pas possible.

➤ **Avantages :**

Par rapport aux méthodes d'identification phénotypiques, les méthodes d'identification génotypiques présentent quelques avantages [62, 74] :

- elles sont plus sensibles ;
- elles sont plus spécifiques [12].

➤ **Inconvénients**

Cependant, les méthodes de biologie moléculaire présentent certains inconvénients [62] :

- le coût des réactifs ;
- la difficulté à identifier plusieurs espèces simultanément [6].

Pour pallier à certaines limites, plusieurs types de PCR ont été mis au point. La PCR multiple (ou PCR multiplex) permet l'amplification de plusieurs séquences cibles, en plaçant les amorces nécessaires dans la même réaction [16, 20, 23]. La PCR quantitative permet la quantification des fragments d'ADN détectés par l'utilisation de «témoins» spécifiques représentant une quantité connue [17].

CHAPITRE 3 : SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF

1. Définition

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption /Ionisation, time of flight) est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur « temps de vol » (proportionnel à leur masse et à leur charge).

Il comporte une source d'ionisation (le laser) suivie d'un analyseur qui sépare les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

2. Historique

À la fin des années 1980, Karas et al. ont mis au point une technique d'ionisation douce appelée MALDI-TOF pour obtenir des spectres de masses protéiques [27]. Les premières utilisations sur des spores bactériennes puis sur des bactéries entières (ou « intactes »), ont révélés que les spectres de souches appartenant à des espèces différentes présentaient des profils de spectre différents, d'où le terme employé d'« empreinte spectrale » caractéristique. Cette constatation, couplée à la rapidité d'obtention des spectres de masse ont très vite placé le MALDI-TOF comme un outil d'identification bactérienne révolutionnaire. Dans les premières publications sur le sujet, l'identification reposait sur l'homologie d'un spectre inconnu à celui d'un spectre de référence, en termes de présence ou d'absence de pics spécifiques. Ainsi, le MALDI-TOF a initialement été évalué sur des entérobactéries [26], des souches bactériennes impliquées dans le bioterrorisme [33] et des staphylocoques et mycobactéries [13]. Depuis ces premiers travaux, les performances de cette technologie ont évolué ainsi que l'exhaustivité des banques de données et de ses applications en routine.

3. Principe

Il s'agit d'identifier des bactéries ou autres pathogènes en les écrasant et en les transformant en molécules chargées ou ions grâce à un rayon laser puissant. Ces ions obtenus vont être attirés dans un champ électrique puissant, chacun d'eux évoluant vers un détecteur avec une vitesse fonction de sa charge et de son poids. Chaque molécule donnant un pic, l'ensemble de pics constituant un pathogène, va donner un spectre. Ce dernier va être caractéristique du pathogène étudié et va pouvoir être comparé avec un grand nombre de spectres de pathogènes connus de façon certaine, et la correspondance avec l'un de ces spectres connu va permettre d'identifier de façon précise les pathogènes étudiés (figure 9).

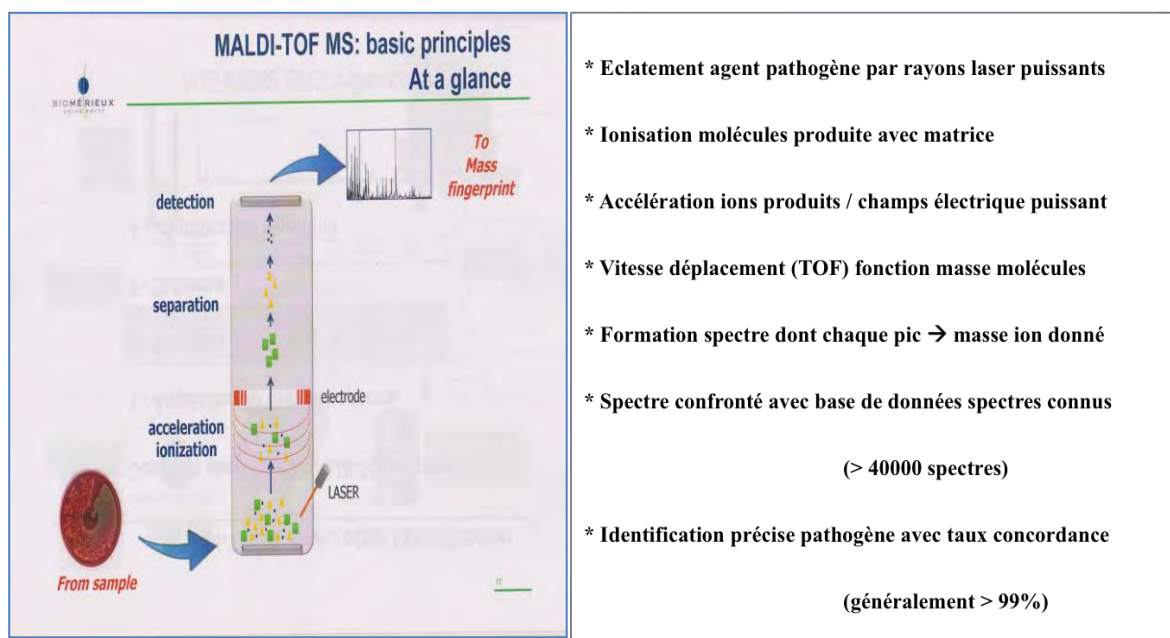


Figure 9: Principe de l'identification par MALDI-TOF

4. Avantages [19, 52, 57]

Les avantages de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont notamment :

- la rapidité de l'identification, de l'ordre de quelques minutes comparativement aux techniques classiques qui durent 24heures [21] ;

- le fait qu'un faible inoculum bactérien suffise ;
- le MALDI-TOF est simple d'utilisation et nécessite peu d'expertise et de formation ;
- réalisation plus ciblée d'un antibiogramme ;
- le faible coût par analyse en termes de consommables ;
- la fiabilité et la reproductibilité de l'identification rapportées par certains auteurs [21, 57, 63] ;
- possibilité de découvertes nouvelles (No matches+++)
- le niveau de l'identification, allant parfois jusqu'à la sous-espèce, voire la caractérisation d'une souche. Concernant les bactéries anaérobies, cette technique a permis notamment :
 - ✓ La différenciation entre *Clostridium botulinum* et *Clostridium sporogenes*, ainsi qu'entre des groupes métaboliques au sein de l'espèce *Clostridium botulinum*
 - ✓ L'identification de sous-espèces au sein de l'espèce *Fusobacterium nucleatum*;
 - ✓ L'identification des espèces de *Porphyromonas*.

5. Limites

La spectrométrie de masse connaît ses propres limites actuellement :

- Ce sont des appareils sensibles aux variations de température, aux vibrations, à l'empoussièrement ;
- Lors du processus d'identification, plusieurs types de problèmes peuvent survenir et aboutir à une identification erronée ;
- Une maintenance ou un suivi insuffisant du spectromètre peuvent être responsable d'une moindre performance de l'identification ;
- Le coût élevé du spectromètre ;
- La nécessité de construire des bases de données de qualité, en particulier

pour les bactéries anaérobies.

6. Perspectives

Les perspectives du MALDI-TOF de marque biomérieux sont les suivantes :

- identification des insectes vecteurs de pathologies (en développement avec l'IRD) ;
- identification directe des colonies mycobactéries (Tuberculose) : technique nécessitant une désactivation préalable ;
- identification directe des bactéries à partir de bouillons d'hémoculture suspects ;
- identification directe à partir des prélèvements d'origine (urine, LCR...) ;
- détection des profils de résistance selon le spectre.

**DEUXIEME PARTIE :
PRELEVEMENT ET
IDENTIFICATION DES
BACTERIES**

1. JUSTIFICATION ET OBJECTIF

1.1. Justification

Bien que les bactéries parodontopathogènes soient le facteur étiologique primaire des parodontites, la destruction des tissus mous et durs résulte de la réponse immunitaire de l'hôte face à l'agression bactérienne.

L'efficacité d'un traitement parodontal se traduit en toute rigueur par la disparition de la symptomatologie clinique et par la disparition des principaux pathogènes impliqués dans cette pathologie.

La complexité et la spécificité de cette flore buccale ainsi que les difficultés de son identification font que, de plus en plus de cliniciens et de laboratoires de microbiologie clinique s'intéressent à son étude et à sa compréhension [51].

La spectrométrie de masse, système d'identification des microorganismes via leurs protéines est une méthode alternative à ces difficultés dont l'applicabilité en routine en parodontie permettra d'optimiser la prise en charge des patients atteints de maladies parodontales réfractaires au traitement conventionnel ainsi qu'une rationalisation des coûts des examens de microbiologie clinique [57].

1.2. Objectif

L'objectif de ce travail était d'étudier la composition du microbiote bucco-dentaire et du biofilm sous gingival en bactéries grâce à la spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Cadre d'étude

L'étude a eu pour cadre la clinique de parodontie du Département d'Odontologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar ainsi que le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Principal de Dakar (Hôpital d'instruction des armées).

2.2. Type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive et transversale.

2.3. Population d'étude

2.3.1. Méthode d'échantillonnage

Il s'agit d'un échantillonnage de type tout venant au service de parodontie du Département d'Odontologie. La population d'étude est constituée par les patients fréquentant la clinique de parodontie du Département d'Odontologie de l'UCAD. L'échantillon est constitué de deux groupes.

Groupe 1 : 14 sujets sans parodontite.

Groupe 2 : 11 sujets avec parodontites

2.3.2. Critères d'inclusion

- Groupe 1 : sujets avec gingivite ($2 < \text{profondeur de poche} \leq 3\text{mm}$) ;
- Groupe 2 : sujets avec parodontite ($\text{profondeur de poche} \geq 4$) ;
- Avoir plus de 25% des dents.

Le diagnostic de parodontite chronique ou agressive est établi après un examen parodontal complet réalisé par examinateur calibré et formé au service de parodontologie avant tout prélèvement sous gingival.

L'atteinte parodontale est définie par 4 dents ou plus avec :

- profondeur des poches $\geq 4\text{mm}$;

- perte d'attache >2mm ;
- saignement au sondage (BOP, Bleeding on Probing) > 35% des sites testés.

2.3.3. Critères de non inclusion

Pour limiter les facteurs de confusion, ne sont pas inclus, les patients présentant des facteurs de risque connus :

- le tabac ;
- l'alcool ;
- l'état de grossesse ;
- le diabète et toute autre maladie systémique pouvant constituer un facteur de risque pour la progression de la parodontite ;
- prise d'antibiotique ou d'antiseptiques dans les 3 derniers mois précédant l'étude ;
- les patients ayant bénéficié de détartrage surfaçage radiculaire (DSR) dans la même période.

2.4. Procédure de collecte de données et variables étudiées

Une demande d'autorisation a été adressée au Directeur de l'hôpital Principal de Dakar.

L'étude est conduite conformément aux respects des aspects légaux et éthiques en accord avec la déclaration de Helsinki relative à la protection des personnes qui se prêtent à des recherches biomédicales, et après accord des autorités médicales.

Un questionnaire est établi, le but étant d'expliquer au patient les modalités préalablement à sa participation à l'étude. Le patient donne son consentement par écrit sur une notice d'information et de consentement éclairé avant l'étude.

2.4.1. Données socio-professionnelles

Les caractéristiques sociodémographiques : âge, ethnie, profession, sexe, lieu de résidence ont été recherchés pour tous les patients.

2.4.2. Données cliniques

Les paramètres cliniques parodontaux suivants sont recueillis au niveau de 6 sites par dent: l'indice de plaque d'O'leary, l'indice de saignement BOP (Bleeding on Probing) de Ainamo et Bay ,la profondeur de poche, les pertes d'attache clinique .

Le niveau d'hygiène est apprécié par le calcul de l'indice de plaque de O'Leary. L'indice de plaque moyen est calculé en faisant la somme de score par dent sur le nombre total des dents examinées.

L'évaluation de l'hygiène est faite suivant l'échelle de classement suggérée par WILKINS en 1991 [72] qui donne une appréciation selon les intervalles de valeur de l'indice de plaque :

- 0 : hygiène excellente ;
- de 0,1 à 0,9 : bonne ;
- de 1 à 1,9 : moyenne ;
- de 2 à 3 : faible.

L'inflammation gingivale est appréciée par le calcul de l'indice gingivale BOP de Ainamo et Bay en 1975 [1]. Pour chaque individu l'indice gingival est calculé en faisant la somme des indices gingivaux de chaque dent divisée par le nombre de faces examinées.

L'interprétation de l'indice gingival est faite selon l'échelle d'évaluation suggérée par WILKINS en 1991 [72] :

- 0 : tissus sains, pas d'inflammation ;
- de 0,1 à 0,9 : inflammation légère ;
- de 1 à 1,9 : inflammation moyenne ;

- de 2 à 3 : sévère.

Pour l'examen du parodonte profond, les 6 sites explorés par dent sont : vestibulaire, mesio vestibulaire, disto vestibulaire, lingual, mésio-lingual, disto lingual. la parodontite chronique est caractérisée comme modérée lorsque la perte d'attache moyenne est comprise entre 3 et 4 mm tandis que le sous-groupe de parodontite chronique sévère est caractérisée par une perte d'attache ≥ 5 mm. L'étendu de l'atteinte parodontale est généralisée lorsque plus de 30 % des sites sont atteints.

Le biofilm est prélevé au niveau de la poche parodontale à l'aide de pointes en papier endodontique. Les écouvillons permettent le prélèvement de biofilm au niveau des muqueuse juguales et linguales ainsi que la région supragingivale.

2.4.3. Prélèvement du biofilm

➤ Matériel

- Plateau d'examen comprenant un miroir, une précelle, sonde parodontale Williams et un CK6
- Pointe en papier endodontique stérile
- Ecouvillon stérile en tube plastique
- Tubes nunc stériles
- Glacière
- Sachet GasPak EZ Anaerobe Container System Sachets. 20 uds (pour l'anaérobiose).
- Rouleaux de coton salivaire (n°8)
- Milieu de transport
- Compresse de gaze stériles
- Gangs stériles
- Sérum physiologique stérile

La technique utilisée permet de prélever une quantité suffisante de microorganismes représentative du site prélevé et d'assurer une survie maximale de l'échantillon jusqu'à son conditionnement dans un milieu de transport.

Le milieu de transport permet d'assurer l'acheminement des prélèvements au laboratoire avec le moins d'altération possible tant au niveau quantitatif que qualitatif.

➤ **Technique :**

- élimination locale de la plaque dentaire à l'aide d'une CK6 ;
- nettoyage du site à l'aide de compresse et de sérum physiologique stérile ;
- isolement du site de prélèvement de la salive par des rouleaux de coton salivaires ;
- prélèvement au niveau des 4 quadrants dans les sites (les poches parodontales) les plus profonds saignant au sondage [38] avec des pointes de papier stérile (pointe de papier endodontique). Insérer une pointe de papier stérile dans la poche parodontale jusqu'à la sensation de résistance et laisser en place entre 10 et 20 secondes ;
- introduction des prélèvements dans les tubes stériles joints contenant du bouillon cœur-cerveille et adresser au laboratoire.

Quatre prélèvements sont effectués au niveau des sites les plus profonds (plus de 5mm de profondeur) et saignant au sondage. Ces prélèvements ont été destinés à la culture pour l'isolement des bactéries et leur identification au MALDI-TOF.

Les prélèvements destinés à la culture sont effectués à l'aide des pointes papier endodontique.

Les prélèvements de surfaces muqueuses (jugale et linguales) sont effectués à l'aide d'écouvillons stériles sur une surface approximative de 1cm² puis placés dans 9 ml de bouillon cœur-cerveille comme milieu de transport.

La flore recherchée étant en grande partie constituée d'anaérobies, une culture sur milieux spécifiques en jarres spéciales (grâce à la collaboration avec l'Hôpital Principal de Dakar) est requise afin d'obtenir des colonies proposées au MALDI-TOF pour identification.

2.5 Analyses de laboratoire

Elles ont été effectuées dans le laboratoire de biologie de l'Hôpital Principal de Dakar.

2.5.1 Matériel

Il est constitué par le matériel destiné à l'isolement des colonies, des réactifs utilisés, du matériel nécessaire à la conservation des souches et à l'identification par le MALDI-TOF.

➤ Isolement

Le matériel utilisé pour l'isolement des colonies était ainsi composé :

- Pipette Pasteur
- Anse de platine
- Bec Bunsen
- Boîtes de Pétri
- Etuve
- Lames et lamelles
- Microscope optique
- Générateur d'anaérobiose (GENbag anaérobie)
- Sachets en plastique
- Poire

Réactifs

Les réactifs utilisés étaient :

- Réactif pour la coloration de Gram
- Bouillon cœur-cerveille

➤ Identification

Pour identifier les colonies, le matériel ci-dessous a été nécessaire :

- Pipettes (0,1-3 µl) et embouts (0.1-10 µl)
- Anses jetables de 1µl
- Lames DS 48 puits (cibles)
- ECAL: *Escherichia coli* ATCC 8739 pour la calibration
- Acide formique 25%
- Matrice : CHCA (Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique)
- Isolats à tester

➤ Conservation

- Réfrigérateur (-80°C)
- Cryotube NUNC®
- Portoir à cupules numérotés et couverts
- Bande adhésive
- Différents milieux de conservation

2.5.2. Traitement des prélèvements

2.5.2.1. Examen macroscopique

A ce stade on notait l'aspect, et la couleur du produit pathologique.

Il faut remarquer au passage des infections à germes anaérobies généralement la couleur est marron et d'odeur fétide.

2.5.2.2. Examen microscopique

A partir du prélèvement traité, un frottis a été réalisé et coloré au Gram pour la bactériologie.

L'examen microscopique à l'objectif x 100 permettait d'apprécier la morphologie et le mode de groupement des bactéries présentent dans le prélèvement

2.5.2.3. Choix des milieux

Pour rappel chaque patient avait deux types de prélèvement : une suspension et un écouvillonnage.

Pour la suspension nous ensemencions :

- un bouillon au thioglycolate (BT), pour décrire le type respiratoire des bactéries et favoriser la croissance surtout des anaérobies ;
- une gélose au sang cuit : chocolat qui est un milieu enrichi permettant la pousse de presque toutes les bactéries ;

Pour l'écouvillon nous ensemencions :

- une gélose au sang cuit comme précédemment ;
- un Sabouraud pour la recherche d'éventuelles levures.

Ainsi après 48h d'incubation des milieux dans les sachets, à l'intérieur desquelles les GENbag anaérobies qui nous permettent d'obtenir en une heure au moins une concentration d'oxygène résiduelle de moins de 1% et une concentration en CO₂ d'environ 20%, l'exploitation se faisait de la manière suivante :

- pour les bouillons BT on prélevait à l'aide d'une pipette pasteur au fond du tube et on repiquait sur un milieu gélosé (CHOCOLAT). Puis on réincubait les boîtes en anaérobiose dans les sachets. Après 48 H d'incubation, si on obtenait des colonies bien isolées, on les passait au MALDI-TOF(*Matrix-Associated Laser Desorption/Ionisation, time of flight*) ;
- pour les autres milieux : (chocolat et Sabouraud) s'il y'a pousse, on passait directement à l'identification par le MALDI-TOF des différents types de colonies.

2.5.3. Conservation des prélèvements

Tous les prélèvements étaient conservés à 0°C. Ce qui permettait de faire un retour en arrière pour une analyse complémentaire lorsque cela était nécessaire.

2.5.4. Isolement

Toutes les colonies isolées sur les milieux de culture faisaient l'objet d'un réisolement sur du chocolat pour la conservation de courte durée.

2.5.5. Conservation des souches bactériennes

Après identification, les souches étaient conservées au congélateur à -80°C .

La conservation se fait dans 0,5 ml d'un mélange de bouillon cœur-cerveille à 15% de glycérol dans un cryotube avec un inoculum dense pour augmenter les chances de survie des cellules bactériennes. Les cryotubes sont rangés dans un portoir et immédiatement placés à -80°C .

Ces souches sont décongelées au besoin pour être réisolées en vue de leur identification.

L'étiquetage des cryotubes pour la conservation des souches prenait en compte les informations suivantes : numéro identification du patient, l'origine du prélèvement et en indice, le numéro attribué à la colonie.

2.5.6. Identification par le MALDI-TOF

2.5.6.1. Principe

La spectrométrie de masse MALDI-TOF est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur « temps de vol » (proportionnel à leur masse et à leur charge).

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation (le laser) suivie d'un analyseur qui sépare les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un ensemble de pics ou spectre de masse (figure 10) représentant les rapports m/z des ions détectés selon l'axe des abscisses et

l'intensité relative de ces ions selon l'axe des ordonnées. Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil et semble spécifique d'espèce.

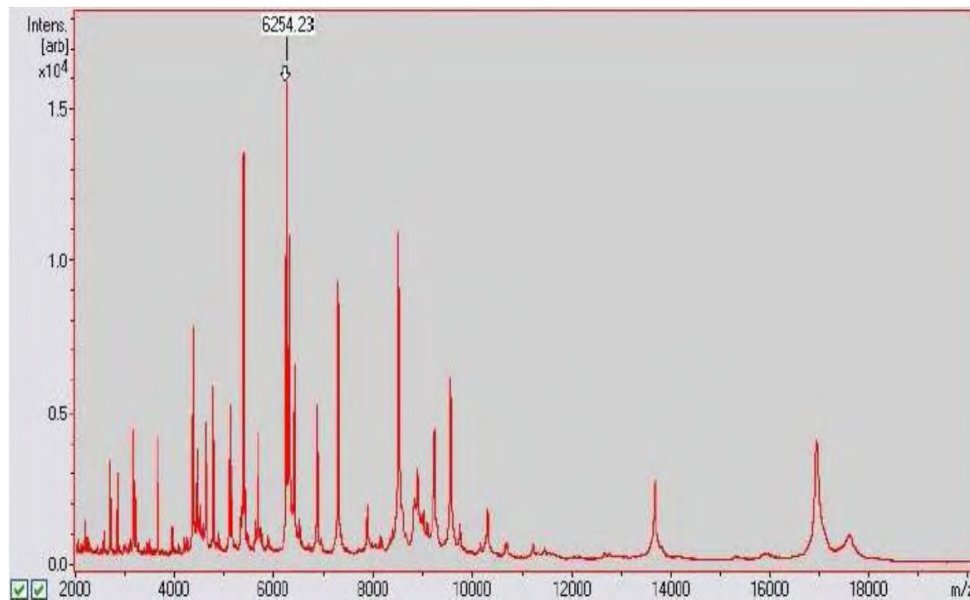


Figure 10: exemple de spectre (*E.coli*)

2.5.6.2. Technique

Pour fonctionner le MALDI-TOF de l'HPD (Vitek MS de Biomerieux) a besoin de trois ordinateurs reliés à un réseau. L'un correspond à la « Préparation » où on va créer les dossiers des patients et dire à l'appareil à quoi correspond chaque dépôt d'échantillon. Le deuxième ordinateur est lié à l'appareil, c'est le pilote du MALDI-TOF. Le troisième, c'est la base de données des spectres connus où va être transféré le spectre obtenu à partir de l'appareil et où va se faire la correspondance (figure 11).



Figure 11: MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) de l'hôpital principal.

Elle débute à partir des colonies bien isolées sur une gélose. A partir d'un bout d'aiguille adapté, on récupère une petite portion de ces colonies qu'on dépose au niveau des trous adaptés sur la lame, qui sont les spots. Puis on rajoute quelques millilitres de la matrice qui va aider par la suite à l'ionisation.

Après cette étape on va sécher la lame. Une fois la lame séchée avec tous les dépôts, on rentre les données des patients sur l'ordinateur, ce qui permet de donner à l'ordinateur le positionnement exact correspondant à chaque spot.

Une fois cette étape terminée, la lame est introduite au niveau de l'appareil puis l'appareil commence son travail. S'il s'agit d'un seul dépôt, au bout de quelques minutes, l'appareil montre le spectre obtenu. Ce spectre obtenu au niveau d'un autre ordinateur lié à l'appareil, est transféré sur un troisième ordinateur où il

y'a la base de données de tous les spectres connus. Et à ce niveau, va se faire la recherche de correspondance pour voir le nouveau spectre obtenu étudié.

Les images suivantes résument de façon plus imagée ces différentes étapes (figure 12) :

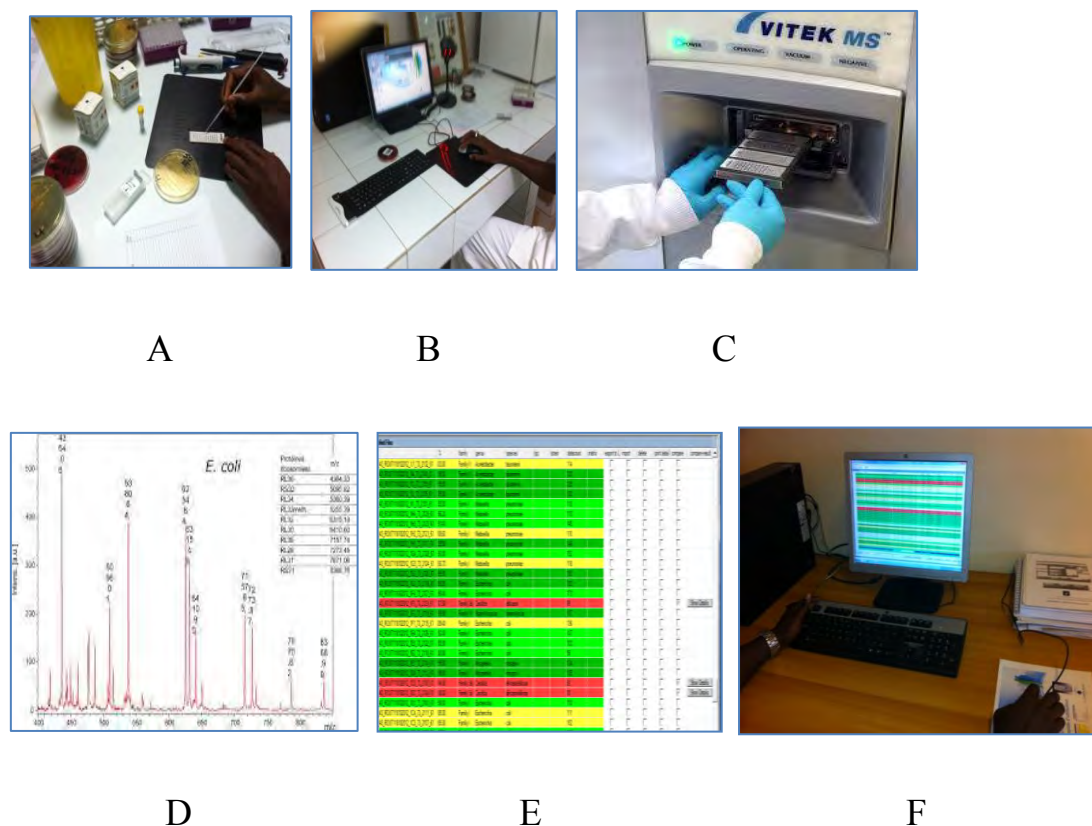


Figure 12: Principales étapes :

A : Dépôt des échantillons; B et C : Acquisition des spectres
D : Analyse de spectre; E : Identification; F : Transfert des données au système informatique du laboratoire

Pour rentrer un peu plus dans les détails techniques, nous allons vous présenter quelques aspects caractéristiques.

➤ La matrice [14, 24, 34]

La matrice est constituée de molécules cristallisées dont les plus utilisées sont l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB), l'acide sinapinique et l'acide α -cyano-

4-hydroxycinnamique (CHCA). Ces molécules sont ajoutées à un solvant (acétonitrile, éthanol ou acide trifluoroacétique). Le DHB convient pour l'analyse des échantillons organiques hydrophobes ou des polymères aromatiques, tandis que l'acide sinapinique et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique sont destinés pour l'analyse des protéines. Un solvant composé d'eau et d'acétonitrile est ajouté à la matrice afin de permettre aux substances de l'échantillon de se dissoudre dans le mélange : les substances hydrophobes de l'échantillon auront une affinité pour l'acétonitrile et les substances hydrophiles auront une affinité pour l'eau. Après avoir mélangé la matrice à l'échantillon, le spot est séché à l'air. Le solvant va ainsi s'évaporer et il ne restera plus que la matrice cristallisée et l'analyte à l'intérieur. Les composants de la matrice doivent avoir plusieurs caractéristiques :

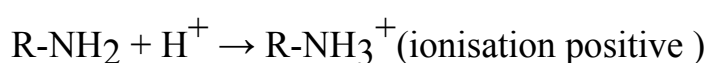
- ✓ ils doivent pouvoir se mélanger avec les solvants organiques et l'eau ;
- ✓ ils doivent être assez grands afin de ne pas s'évaporer lors de la préparation de l'échantillon ou lorsque celui-ci est introduit dans le spectromètre ;
- ✓ ils doivent être assez petits afin d'avoir une bonne volatilité et se vaporiser sous l'action du rayon laser ;
- ✓ ils doivent être acides afin de transmettre des protons à l'analyte et ainsi l'ioniser ;
- ✓ ils doivent pouvoir absorber fortement et rapidement les rayons ultra-violets du laser.

➤ Désorption-Ionisation

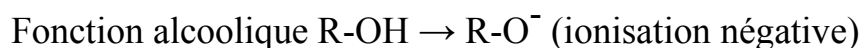
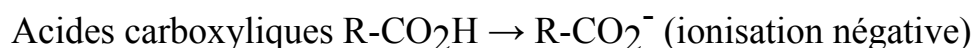
Un laser UV (337 nm de longueur d'onde) d'azote (N₂) est pulsé en direction de la cible. La matrice ayant une grande réactivité pour l'absorption de la lumière UV absorbe l'énergie du laser protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes : tout d'abord, la

matrice se vaporise libérant les peptides (désorption), ensuite, elle transfère ses protons à l'analyte qui s'ionise [34]. Les ions peuvent être chargés positivement ou négativement selon leur nature. Les protéines et peptides ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisés positivement. Les oligonucléotides et les saccharides ont des groupements qui perdent un proton et sont ionisés négativement [2]

Peptides :



Saccharides :



➤ La spectrométrie à temps de vol (TOF)

La spectrométrie à temps de vol est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser [34]. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression. Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur. Les grosses molécules mettent plus de temps à atteindre le détecteur que les petites molécules. Elles sont ainsi séparées en fonction de leur rapport masse/charge [34].

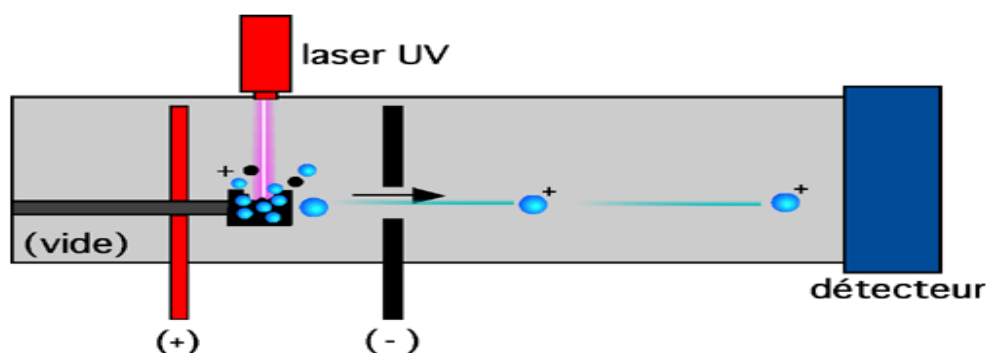


Figure 13: Technique Time of flight (TOF)

Le détecteur envoie ensuite les informations enregistrées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre (figure 13)

➤ Le spectre

Les données enregistrées sont calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique la taille de la molécule en Daltons. L'appareil intègre les différents pics enregistrés et recherche dans la base de données l'identification du germe correspondant (figure 14).

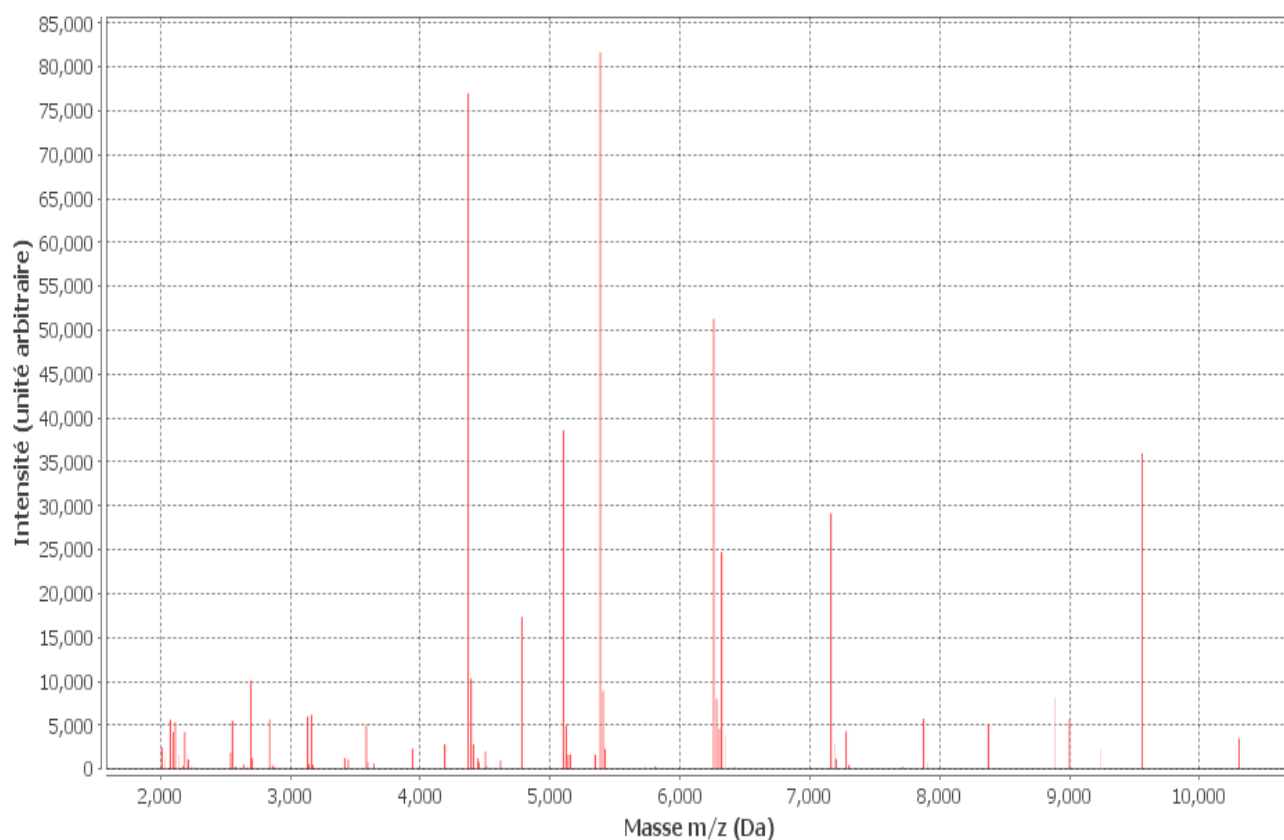


Figure 14: Spectre MALDI-TOF

3. RESULTATS

Vingt-cinq patients ont été colligés et 100 prélèvements effectués au niveau sousgingivale associé à 25 écouvillonnages au niveau des muqueuses jugales, linguales et supragingivales.

3.1 Caractéristiques socio-professionnelles

Les données socio-professionnelles sont représentées par l'âge, le sexe et l'activité professionnelle.

❖ Age

La moyenne d'âge est de 39 ans avec un écart type de 17 ans. Les extrêmes de ces âges sont 20 et 76 ans. Parmi les 25 patients, 32% ont plus de 45 ans et 44% ont entre 20 et 30 ans (figure 15).

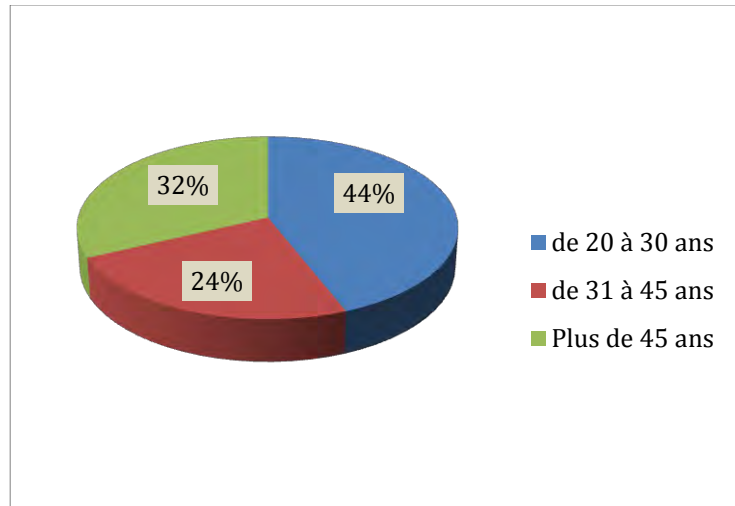


Figure 15 : Distribution de la population selon l'âge

❖ Sexe

La population d'étude est composée de 16 femmes (64%) et de 09 hommes (36%). Le sex ratio est de 0,56 (figure 16).

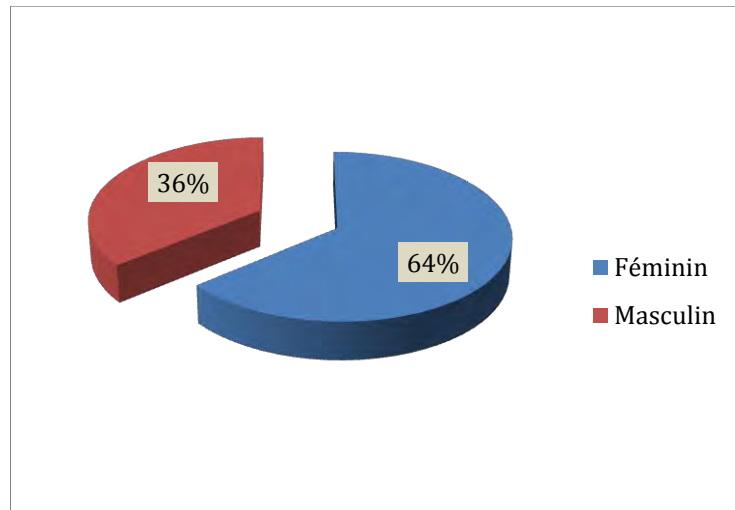


Figure 16: Distribution de la population selon le sexe

❖ Profession

L'observation du graphique ci-dessous révèle que les étudiants et les professions libérales (28%) sont plus représentés dans notre échantillon (figure 17).

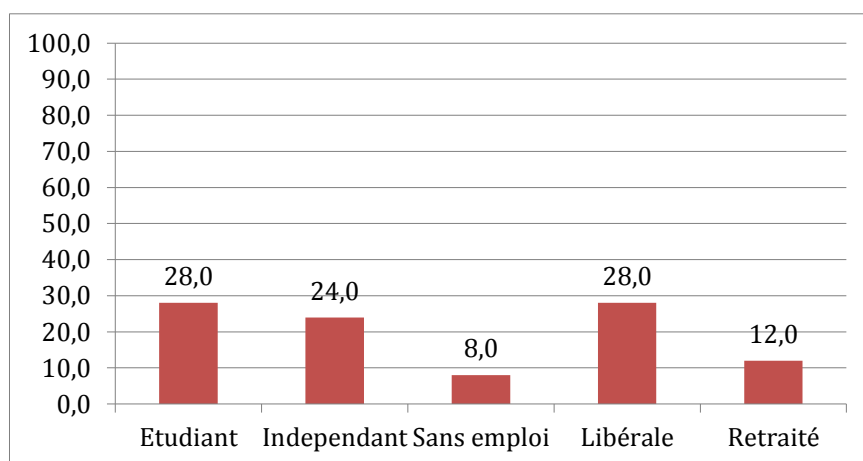


Figure 17: Répartition de la population selon la profession

3.2. Caractéristiques cliniques

❖ Répartition selon le diagnostic

Dans la population d'étude, la prévalence de la parodontite chronique sévère est de 20% tandis que celle de la parodontite chronique modérée est de 24% soit 44% de parodontites chroniques.

La maladie gingivale induite par la plaque est retrouvée chez 56% des patients (figure 18).

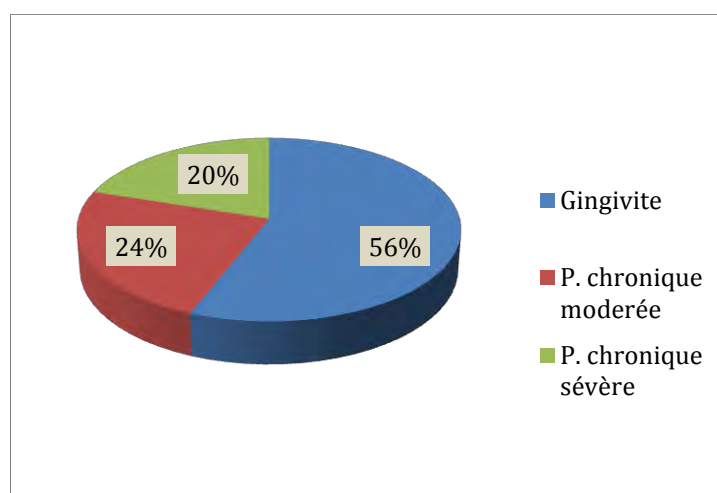


Figure 18: Répartition de l'échantillon selon le diagnostic

❖ Répartition selon l'indice gingival

L'inflammation gingivale est modérée chez 84% de la population d'étude (figure 19).

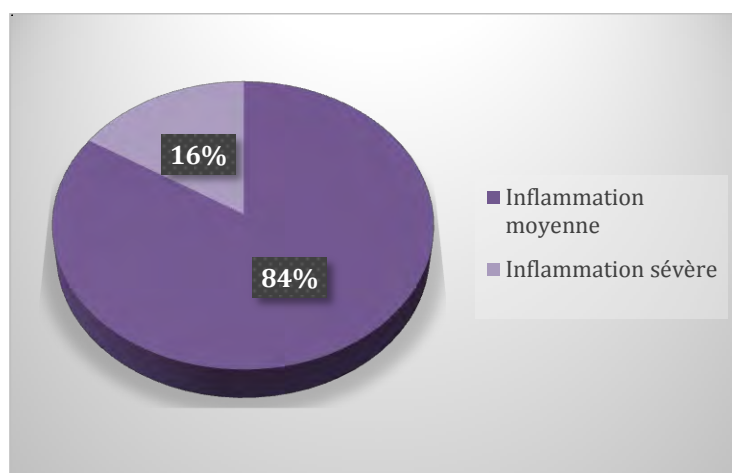


Figure19: Répartition selon l'indice gingival

❖ Répartition selon l'indice d'hygiène

L'hygiène bucco-dentaire est faible pour 80% de l'échantillon (figure 20).

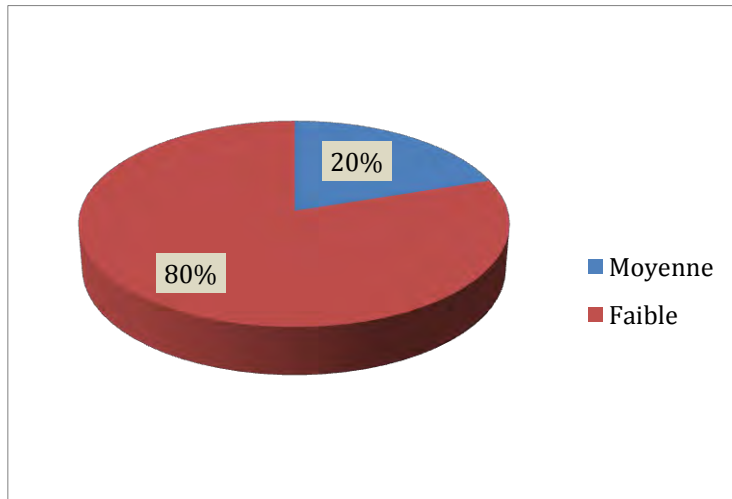


Figure 20: Répartition selon l'indice de plaque

❖ Distribution selon la profondeur de poche parodontale

La présence de poche parodontale ($\geq 4\text{mm}$) est observée chez 40% de l'échantillon (figure 21).

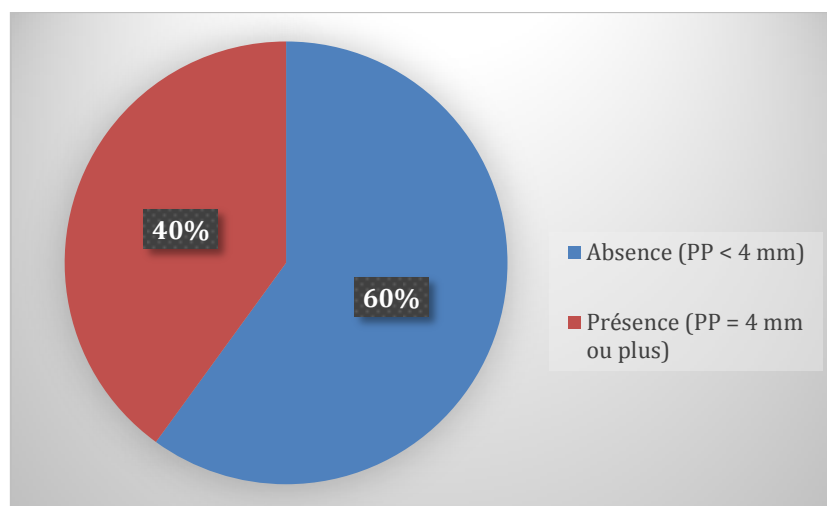


Figure 21: Répartition selon la profondeur de poche

3.3. Caractéristiques bactériologiques

Quarante-trois bactéries ont été isolées chez les 25 patients.

❖ Répartition selon le type respiratoire

L'analyse du graphique ci-dessous montre que 6 anaérobies sont retrouvées sur les 43 bactéries contre 33 aéro-anaérobies facultatives. Quelques rares aérobies ont cependant été isolés (figure 22).

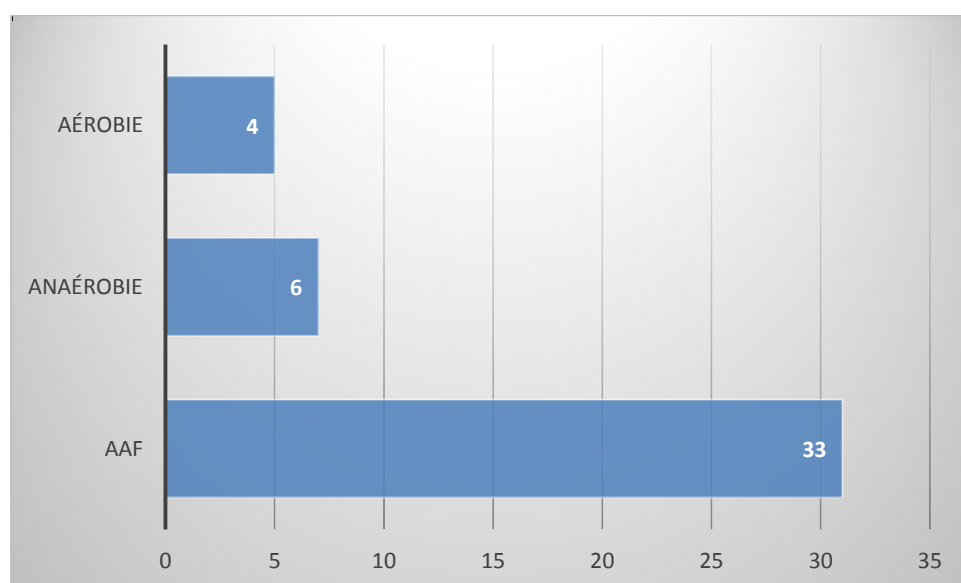


Figure 22: Répartition selon le type respiratoire

❖ Profil des bactéries correspondantes

Le tableau ci-dessous montre une prédominance des AAF de type cocci à Gram positif et de type bacille à gram négatif par rapport aux autres bactéries.

Tableau I: Profil des bactéries correspondantes

AAF	Gram	Positif	Bacilles (2)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i>
			Cocci (18)	<i>Staphylococcus cohnii</i> <i>Staphylococcus hyicus</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus arlettae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Streptococcus pseudopneumoniae</i> <i>Streptococcus anginosus</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus parasanguinis</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Streptococcus oralis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Streptococcus vestibularis</i>
		Négatif	Bacilles (7)	<i>Leclercia adecarboxylata</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Providencia stuartii</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Aggregatibacter-actinomycetemcomitans</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Haemophilus parainfluenzae</i>
			Cocci (4)	<i>Actinobacillus lignieresii</i> <i>Neisseria elongata</i> <i>Neisseria spp</i> <i>Neisseria subflava</i>
Anaérobie	Gram	Positif	Bacilles (2)	<i>Actinomyces odontolyticus</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
			Cocci (1)	<i>Gemella spp</i>
		Négatif	Bacilles (1)	<i>Aeromonas eucrenophila</i>
			Cocci (2)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Veillonella spp</i>
Aérobie	Gram	Positif	Bacilles (1)	<i>Burkholderia cenocepacia</i>
			Cocci	
		Négatif	Bacilles (3)	<i>Burkholderia stabilis</i> <i>Burkholderia spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			Cocci (1)	<i>Micrococcus luteus</i>

❖ **Agent identifié plus d'une fois**

Le tableau montre que 2 bactéries ont été isolées à plusieurs reprises les *L. adecarboxylata* (5 fois) et les *S.pseudopneumoniae* (4 fois).

Tableau II: agent identifié plus d'une seule fois

Bactéries	Fréquence
<i>L. adecarboxylata</i>	5 fois
<i>S. pseudopneumoniae</i>	4 fois
<i>Burkholderia sp</i> <i>N. elongata</i> <i>S. sanguinis</i>	2 fois

❖ Répartition des espèces bactériennes selon le profil clinique

La figure ci-dessous montre une prédominance des AAF aussi bien dans les gingivites que dans les parodontites chroniques avec une présence commune des aérobies et des anaérobies dans les gingivites et les parodontites (figure 23).

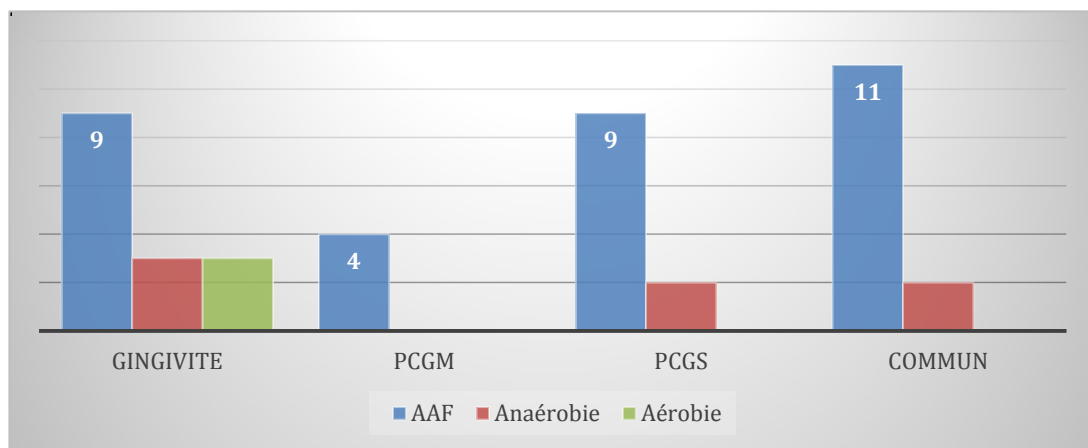


Figure 23: Répartition des espèces bactériennes selon le diagnostic

➤ Gingivites

L'identification de 02 bactéries anaérobies a pu être faite mais les bactéries AAF sont les plus prédominantes (figure 24).

Explication des couleurs	
Morphologie	Type respiratoire
G+	AAF
G-	AAF
G+	Aérobic
G-	Aérobic
G+	anaérobic
G-	anaérobic

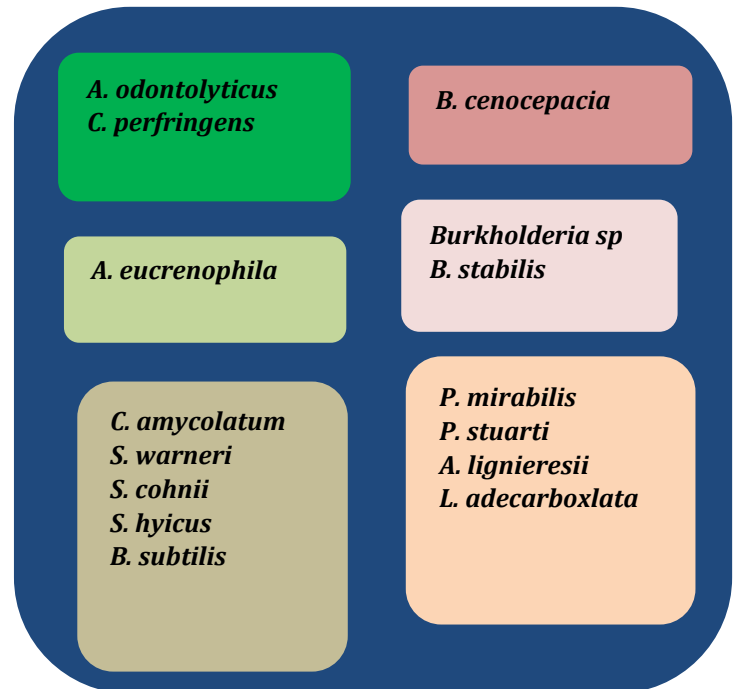


Figure 24: profil bactériologique des germes retrouvés dans les gingivites

➤ Parodontites chroniques généralisées modérées (PCGM)

Les AAF gram positif et gram négatif sont retrouvés dans les PCGM (figure 25).

Explication des couleurs	
Morphologie	Type respiratoire
G+	AAF
G-	AAF
G+	Aérobic
G-	Aérobic
G+	Anaérobic
G-	Anaérobic



Figure 25: profil bactériologique des germes retrouvés dans les PCGM

➤ Parodontites chroniques généralisées sévères (PCGS)

La figure révèle une prédominance des AAF et 2 bactéries anaérobies.

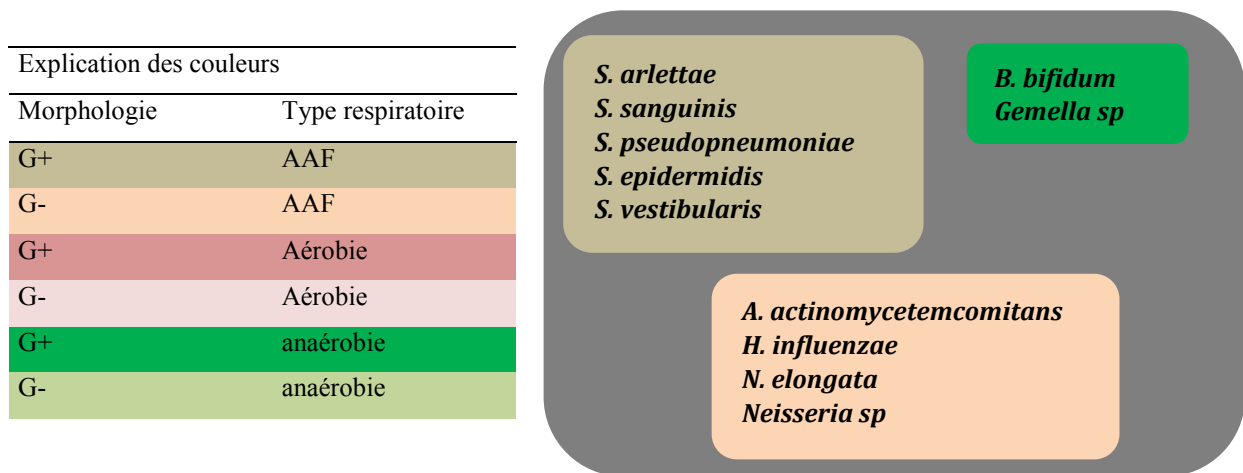


Figure 26: Profil bactériologique des germes retrouvés dans les PCGS

➤ les germes retrouvés aussi bien dans les gingivites que dans les parodontites

Dans cette figure, aucune des anaérobies n'a été identifiée simultanément dans les gingivites et les parodontites (figure 27).

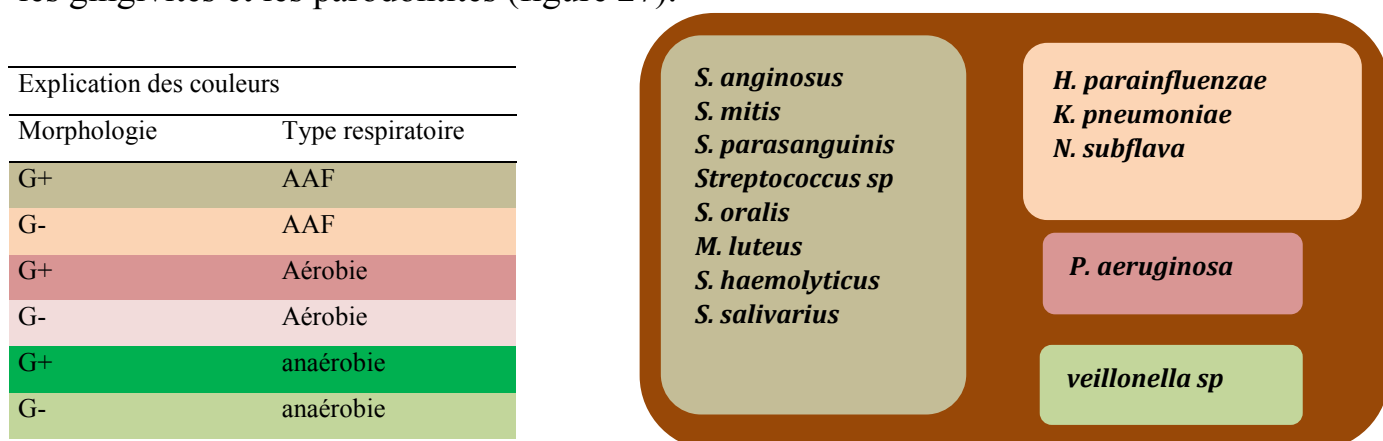


Figure 27: Profil bactériologique des germes retrouvés dans les gingivites et les parodontites

❖ **Germes présents à la fois dans les cas de gingivite, PCGM et ou PCGS**

Le tableau ci-dessous montre que 5 germes ont été retrouvés à la fois dans les gingivites, les PCGM et les PCGS. Dans les cas de gingivites et de PCGM, 02 germes ont été retrouvés simultanément.

L'identification commune de 06 germes qui ont été observés dans les gingivites et les PCGS.

Tableau III: germes identifiés dans les gingivites et les parodontites

Germes commun	Gingivite	PCGM	PCGS
<i>H. parainfluenzae</i>	1		2
<i>K. pneumoniae</i>	1	1	1
<i>M. luteus</i>	2	1	1
<i>N. Subflava</i>	1	1	4
<i>P. aeruginosa</i>	1		1
<i>S. anginosus</i>	1		3
<i>S. haemolyticus</i>	2	2	
<i>S. mitis</i>	1		5
<i>S. oralis</i>	6	2	5
<i>S. parasanguinis</i>	1		1
<i>S. salivarius</i>	1		2
<i>Streptococcus sp</i>	10	1	4
<i>veillonella sp</i>	1	1	

4. DISCUSSION

La présente étude descriptive et transversale a permis de réaliser l'identification bactériologique du microbiote bucco-dentaire et du biofilm sous gingival grâce à la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

4.1. Limites et considérations méthodologiques

Cette étude préliminaire avec la technique d'identification par le MALDI TOF n'a jamais été utilisée de manière générale dans les services odontologiques à Dakar et celui de parodontologie en particulier du Département d'Odontologie de la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie de Dakar. Une avarie de l'appareil survenue en milieu de recueil nous a contraint à travailler avec un échantillonnage réduit de 25 patients. Malgré tout, l'échantillonnage utilisé n'est pas trop loin de celui de Stingu en 2008 [63] avec 33 patients porteurs de parodontites agressives. Dans la même veine, Vielkind en 2015 [70] a travaillé sur 20 patients porteurs de parodontite chronique et 15 sujets sains.

Dans notre étude, nous aurions pu inclure des sujets sains pour une analyse comparative. Mais nous avons préféré, dans le cadre de cette étude préliminaire nous arrêter aux patients cliniquement atteints dans un premier temps.

Afin de maximiser les chances d'isoler les pathogènes incriminés, 4 prélèvements étaient réalisés pour chaque patient, avec les pointes en papier endodontiques, soit 100 prélèvements de biofilm sous gingival associés à 1 écouvillonnage au niveau de la muqueuse buccale et

supragingivale.

De plus, 25 prélèvements à l'écouvillon ont été réalisés en plus des 100 prélèvements de biofilm sous gingival.

4.2. Caractéristiques socio-professionnelles

La population d'étude avait une moyenne d'âge de 39 ans avec un écart-type de 17 ans ce qui recoupe sensiblement le travail de Stingu en 2008 [63] qui avaient une moyenne d'âge de 39.39 avec un écart type de 10,47ans. La tranche d'âge la plus représentative dans l'étude était celle de 20 à 30 ans caractérisant une population jeune.

Une prédominance des individus du sexe féminin avec un sexe ratio de 0,56 est notée ce qui est différent du sexe ratio trouvé par Sambe en 2013 [55] qui était de 1,3 avec une prédominance masculine.

4.3 Caractéristiques cliniques

La distribution et la sévérité de destruction des tissus parodontaux évaluées par la mesure de la perte d'attache clinique indique que la prévalence de la parodontite chronique était de 44% avec une plus grande distribution pour la tranche d'âge 45-76 ans. Bourgeois et al en 2007 [9] avaient trouvé une association statistiquement significative entre la sévérité de la perte d'attache et les sujets âgés de plus de 50ans ($p < 0,01$).

4.4. Caractéristiques bactériologiques

Dans cette étude 100 prélèvements de biofilm sous gingival et 25 écouvillonnages supra gingival et au niveau de la muqueuse orale ont été réalisés. L'identification au MALDI-TOF a permis dans cette étude d'isoler 43 espèces bactériennes. Les résultats quantitatifs

obtenus dans ce travail sont inférieurs à ceux de Stingu et col en 2008 [63] qui avaient isolé 75 souches bactériennes dans une étude de la même thématique. Nous avons travaillé sur moins de patients, ce qui traduit à priori une différence assez peu significative proportionnellement.

Ceci pourrait s'expliquer aussi par le fait que certaines colonies de bactéries qui ne figurent pas dans la base de donnée du MALDI-TOF utilisé ne sont pas correctement identifiées et apparaissent « no matches ».

L'environnement particulier du sillon gingivo-dentaire semble propice au développement d'une communauté bactérienne plus diversifiée. La plupart des bactéries sont des anaérobies et ont un métabolisme protéolytique. Pour les maladies parodontales, l'infection n'est pas de la responsabilité d'une seule bactérie mais d'un consortium de bactéries organisées au sein d'un biofilm.

L'identification selon le type respiratoire indique une prédominance des AAF au nombre de 33 sur un total de 43 soit 76,9%. Ces résultats quantitatifs sont inférieurs à ceux trouvés par Socransky et coll, 1982 [61] où la flore était constituée à 60 % de bactéries à Gram anaérobies facultatives ou anaérobies strictes.

Les anaérobies qui ont été retrouvées dans cette étude sont au nombre de 6 et seulement 4 bactéries aérobies ont été identifiées.

Cette différence assez franche pourrait être le fait d'une non maîtrise probable de l'anaérobiose sur tout le circuit de prise en charge des échantillons.

Une certaine déperdition suivant les procédés culturels pourrait aussi en partie expliquer cette différence. En effet, les milieux utilisés certes peuvent faire pousser les anaérobies comme la gélose au sang, même s'il serait certainement préférable d'utiliser des milieux de type Shaedler. Ou bien seraient elles le témoin d'une anaérobiose pas toujours parfaite ? La poursuite de ce travail (prévue) dans de meilleures conditions pourrait nous édifier sur ce point.

4.5. Identification selon le diagnostic clinique

Concernant les gingivites, la plupart des bactéries identifiées étaient des aéro-anaérobies facultatives. On a pu isoler aussi quelques rares aérobies et anaérobies strictes. Les anaérobies retrouvées dans les gingivites sont *Actinomyces odontolyticus* et *Clostridium perfringens*. Comparé à l'étude de Socransky et coll en 1982 [61], un faible pourcentage de bacilles à Gram négatif anaérobies strictes comme *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella intermedia* est également retrouvé dans cette situation pathologique.

Certaines bactéries ont été identifiées plusieurs fois dans les maladies gingivales. Ainsi, le *Streptococcus* sp a été le plus retrouvé (10 fois) dans notre étude. Contrairement à une autre étude qui a été faite par Koukos G en 2015 [32] où le *Staphylococcus aureus* était le plus détecté.

Chez les patients atteints de parodontites, le MALDI-TOF a pu identifier des bactéries AAF et 2 bactéries anaérobies. Les bactéries qui étaient les plus identifiées sont les *Streptococcus oralis*,

Streptococcus mitis et *Neisseria elongata*. Contrairement à Choi Nakagawa et al, Slots, 1990 [11] qui eux, ont montré que le *Porphyromonas gingivalis* est la bactérie la plus prédominante quantitativement dans les lésions des parodontites chroniques alors qu'elle est peu ou pas présente chez des sujets sains ou ayant une gingivite.

L'étude des échantillons des cas de parodontites chroniques a permis d'identifier plusieurs fois les *Staphylococcus haemolyticus* et *Streptococcus mitis*.

Cependant, Pahumunto et coll en 2015 en Thaïlande [51] avaient isolé 97 espèces d' *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* chez 37 patients porteurs de parodontites chroniques. Toujours dans l'objectif d'évaluer la précision d'identification avec le MALDI-TOF, Stingu et coll [63] avaient isolé *Prevotella nigrescens* et *Prevotella Intermedia* chez les patients atteints de parodontites chroniques.

Toutefois, pour une rationalisation de cette technique d'identification, en parodontie d'autres études avec des qualités méthodologiques plus structurées et avec une plus grande puissance sont nécessaires pour l'utilisation du MALDI-TOF chez les patients atteints de parodontites réfractaires au traitement conventionnel ou des parodontites agressives et aussi chez les patients candidats à des traitements complexes à type de régénération parodontale ou de traitement implantaire.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les parodontopathies sont des maladies infectieuses polymicrobiennes à prédominance anaérobie aboutissant à une destruction des tissus de soutien dentaire chez un hôte permissif. La complexité et la spécificité du microbiote bucco-dentaire ainsi que les difficultés de son identification font que de plus en plus de cliniciens et de laboratoires de microbiologie clinique s'intéressent à son étude et à sa compréhension.

Les techniques d'identification et de typage utilisées en microbiologie clinique ne cessent de progresser. Les méthodes conventionnelles reposant essentiellement sur des tests phénotypiques et génotypiques ont montré leurs limites liées à la complexité des protocoles, le savoir-faire nécessaire, les coûts des réactifs, l'utilisation de sondes ou de séquences nucléotidiques spécifiques pour chaque espèce et enfin le délai important nécessaire pour l'identification.

La spectrométrie de masse, système d'identification des micro-organismes via leurs protéines est une méthode alternative à ces difficultés mais n'a pas encore été utilisée en odontologie à Dakar.

L'objectif de ce travail était d'étudier la composition du microbiote bucco-dentaire et du biofilm sous gingival en bactéries grâce à la spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

Cette étude préliminaire a eu pour cadre la clinique de Parodontie du département d'Odontologie de la faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odontologie ainsi que le laboratoire de microbiologie de l'hôpital Principal de Dakar. Il s'agissait d'une étude transversale

descriptive s'étalant sur une période de 3 mois et portant sur un échantillon de 25 patients âgés de 20 à 76 ans. La moyenne d'âge était de 39 ans avec un écart-type de 17 ans.

L'examen parodontal avait montré une prévalence de 44% pour la parodontite et 56% de cas de gingivites induites par la plaque. Pour chaque sujet inclus dans l'étude 4 prélèvements de biofilm sous gingival à l'aide de pointes en papiers endodontiques et un écouvillonnage supragingival ont été réalisés.

Ainsi, 100 prélèvements de biofilm sous gingival et 25 écouvillons ont été transportés et analysés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital principal de Dakar. La culture et l'identification des colonies par le MALDI-TOF ont permis d'isoler au total 43 espèces bactériennes dont 33 aéro-anaérobies facultatives, 06 bactéries anaérobies et 04 aérobies. La distribution de ces germes selon le diagnostic clinique indique la présence de 02 bactéries anaérobies *Actinomyces odontolyticus* et *Clostridium perfringens* dans les gingivites. Mais dans les cas de parodontites chroniques l'identification avait mis en évidence deux bactéries anaérobies et une bactérie AAF *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa). De manière générale, le genre *streptococcus sp* a été le plus identifié (10 fois).

Les résultats obtenus à partir de ce travail permettent d'envisager une utilisation de cette technique innovante par sa rapidité et sa fiabilité dans l'identification bactériologique en parodontie dans le but d'optimiser la prise en charge des patients atteints de parodontites.

Toutefois, d'autres études avec des qualités méthodologiques plus structurées sont nécessaires surtout pour appliquer cette technique dans les cas de patients atteints de parodontites agressives ou réfractaires au traitement conventionnel mais aussi chez des patients candidats à des traitements complexes à type de régénération parodontale et de traitement implantaire.

REFERENCES

1. AINAMO J, BAY I.

Problems and proposal for recording gingivitis and plaque. Dent J, 1975 ; 25: [229–235]

2. ASHCROFT, A, E.

Mass Spectrometry Facility Manager.

Astbury Centre for Structural Molecular Biology, 1997; 61: [18-30]

3. ARMITAGE GC.

Development of a classification for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol, 1999; 4: [1-6].

4. AXTELIUS, B, SODERFELDT, B, EDWARDSSON, S, ATTSTROM, R.

Therapy-resistant periodontitis. Compliance and general and dental experiences. J Periodontol, 1997; 68: [646–654].

5. BERNIMOULIN JP.

Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol. 2003; 30 (5): [7-9].

6. BIMET F, CLERMONT D, BIZET C.

La création d'une base de données à partir de spectres de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) : intérêt des centres de ressources biologiques. Bull. Soc. Fr. Microbiol. 2009; 24(1): [287-289].

7. BOSSHARD DD.

Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res, 2005; 84: [390-406].

8. BOUCHARD P, BROCHERY B, FEGHALI M, JAUMET V, KERNER S, KORNGOLD S, MALET J, MAUJEAN E, MICHEAU C, MORA F, RANGE H, SCHWEITZ B.

Parodontologie dentisterie implantaire. Paris, Lavoisier Médecine Sciences. 2014 ; 1, 682p.

9. BOURGEOIS D, BOUCHARD P, MATTOUT C.

Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. J Periodont Res 2007; 42: [219–227].

10. CHARON J, JOACHIM F, VERGISON N et PHILIPPE M.

Attitudes cliniques face au risque parodontal chez le sujet sain. J Parodontol, 1998; 7: [219-242].

11. CHOI J, NAKAGAWA S, YAMADA S, TAKAZOE J & OKUDA K.

Clinical, microbiological and immunological studies on recurrent periodontal disease. J Clin Periodontol, 1990 ; 17 : [529- 539].

12. CLARRIDGE J,E, 3RD.

Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev, 2004 ; 17(4): [840-862].

13. CLAYDON MA, DAVEY SN, EDWARDS-JONES V, GORDON DB.

The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. Nat Biotechnol, 1996; 14(11): [584-6].

14. CRISTINA,C.

La spectrométrie de masse MALDI-TOF et le diagnostic microbiologique ; ICHV, Laboratoire de microbiologie, Sion. MALDI -TOF SAMPLE PREPARATION GUIDE: Massachusetts Institute of Technology, 2008; 2; 30p

15. DAHLÉN G, WIKSTROM M & RENVERT S.

Treatment of periodontal disease based on microbiological diagnosis. A 5-year follow-up on individual patterns. J Periodontol, 1993; 67: [879-887].

16. DANGTUAN ST & RUDNEY ID.

Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis. J Clin Microbiol, 1996; 34: [2674- 2678].

17. DOUNGUDOMDACHA S, A, R, WALSH TF & DOUGLAS CW.

Effect of non-surgical periodontal treatment on clinical parameters and the numbers of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, and Actinobacillus actinomycetemcomitans at adult periodontitis sites. J Clin Periodontol, 2001; 28: [437-445] .

18. FLEMMING TF.

Periodontitis. Ann Periodontol, 1999; 4: [32-38].

19. GALLOIS F.

Médecine parodontale : une nouvelle approche de la parodontologie. Inf. Dent, 2001; 83(27): [3045-3046].

20. GARCIA L, TERCERO JC, LEGIDO B, RAMOS JA, ALEMANY J & SANZ M.

Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. *J Periodont Res*, 1998; 33: [59-64].

21. GROSSE-HERRENTHEY A, MAIER T, GESSLER F, SCHAUMANN R, BÖHNEL H, KOSTRZEWA M, et KRÜGER M.

Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe*, 2000 ; 14(4): [242-249].

22. HENDERSON B, WILSON M.

Commensal communism and the oral cavity. *J Dent Res*, 1998; 77: [1674-1683].

23. HENEGARIU O, HEEREMA NA, DLOUHY SR, VANCE GH & VOGT PH.

Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 1997; 23: [504-511].

24. HILLENKAMP F, KARAS M, BEAVIS R,C, CHAIT B,T.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI)
Anal. Chem, 1991; 63: [11-35].

25. HOFFMANN E, (DE), CHARRETTE J, et STROOBANT V .

Spectrometrie de masse, Paris: Masson, 1994 : 341p

26. HOLLAND RD, WILKES JG, RAFII F, SUTHERLAND JB, PERONS CC, VOORHEES KJ, et AL.

Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1996; 10(10): [1227—32].

27. KARAS M, BACHMANN D, BAHR U, HILLENKAMP F.

Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Proc*, 1987; 78: [53-68].

28. KATCHBURIAN E, ARANA-CHAVES V, MATTOU P, MATTOU C.

Les différents tissus parodontaux. (IN Les thérapeutiques parodontales et implantaires). Quintessence International, Paris, Berlin, 2003: 496p.

29. KINANE DF.

Periodontal diseases' contributions to cardiovascular disease: an overview of potentials mechanisms. J Periodontol, 1998; 3: [142-150].

30. KINANE DF.

Periodontitis modified by systemic factors. Ann Periodontol, 1999; 4: [54-83].

31. KORNMANE KS, LOESCHE W J.

The sub gingival microbial flora during pregnancy. J Periodontol Res, 1980; 15: [111-122].

32. KOUKOS G, SAKELLARI D, ARSENAKIS M, TSALIKIS L, SLINI T, KONSTANTINIDI

A. Arch Oral Biol, 2015; 60(9): [1410-5].

33. KRISHNAMURTHY T, ROSS PL.

Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectro- metric analysis of whole cells. Rapid Commun Mass Spectrom, 1996; 10(15): [1992-6].

34. LEBLANC, B.

Biochimie des protéines. Ann chim, 2011; 16: 129p

35. LINDHE J.

Manuel de Parodontologie Clinique. CDP, Paris, 1986: 556p.

36. LISTGARTEN MA, ELLEGAARD B.

Experimental gingivitis in the monkey. Relationship of leukocyte counts in junctional epithelium, depth, and connective tissue inflammation scores. J Periodont Res, 1973; 8: [199-214].

37. LISTARGEN MA et HELLDEN L.

Relative distribution of bacteria at clinically healthy and periodontally diseased sites in humans. J Clin Periodontol, 1978; 5: [115-132].

38. LOE H, THEILADE E, JENSEN SB.

Experimental gingivitis in man. J Periodontol, 1965; 36: [177-187].

39. LOOMER PM.

Microbiological diagnostic testing In the treatment of periodontal diseases. Periodontology 2000, 2004; 34: [49-56].

40. MASSON WE .

Diagnostic bacteriologic tests in periodontal therapy. J Mich Dent Assoc, 1994; 76: [40-59].

41. Möller AJ.

Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies, 1966 ; 74(5): [1-380].

42. MOMBELLI A, NYMAN, BRÄGGER U.

Clinical and microbiological changes associated with an altered subgingival environment induced by periodontal pocket reduction. J clin periodontal, 1991; 22: [780-792].

43. MONNET-CORTI V.

Maladies parodontales et état de sante général. Clinic, 2002; 23(7): [451-452].

44. MOOR WE, MOOR LV.

The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000, 1994; 5: [66-77].

45. NEWMAN, TAKEI, CARRANZA.

Carranza's Clinical Periodontology. W.B. Saunders (9 Ed) Co, Philadelphia, Toronto. J periodontal, 2006; 64: [220-223].

46. NYVAD B, KILIAN M.

Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. Scand J Dent Res, 1987; 95: [369-380].

47. OFFENBACHER S.

Periodontal disease: pathogenesis. Ann periodontal, 1996; 1: [821-878].

48. PAGE RC.

The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodontal Res, 1991; 26: [230-242].

49. PAGE RC, KORNMAN KS.

The pathogenesis of human periodontitis, an introduction. Periodontol, 2000, 1997; 14: [9-11].

50. PAGE RC, SCHROEDER HE.

Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest, 1976; 34: [235-249].

51. PAHUMUNTO N, RUANGSRI P, WONGSUWANLERT M, PIWAT S, DAHLEN G, TEANPAISAN R.

Anaerobe, 2015 ; 36: [60-4]

52. PASTER BJ et COL.

Principe de la spectrometrie de masse, 2001; 77: [112-133]

53. PLOMBAS M, GOBERT B, DE MARCH AK, SARDA MN, SIXOU M, BENE MC, MILLER N, FAURE GC.

Isotypic antibody response to plaque anaerobes in periodontal disease. J Periodontol, 2002; 73(12): [1507-1511].

54. RAMFJORD SP, ASH MM.

Parodontologie et Parodontie. Aspects théoriques et pratiques. Masson, Paris, 1993: 341p.

55. SAMBE BB.

Etude du microbiote digestif sénégalais: détection et caractérisation des pathogènes entériques. THESE DE DOCTORAT Spécialité: BIOLOGIE ET PATHOLOGIES, HUMAINES, UCAD, 2013 ; 56: 223p.

56. SAVITT ED, STRZEMPKO MN et VACCARO KK.

Comparison of cultural methods and DNA probe analyses for the detection of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bactéridie gingivalis, and Bactéridie intermedius in subgingival plaque samples. J Periodontol, 1988; 56: [431-438].

57. SHAH H, N, KEYS C, J, SCHMID O, et GHARBIA S,E.

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. Clin Infect Dis, 2002; 35(1): [58-64].

58. SHIBATA DK.

The polymerase chain reaction and the molecular genetic analysis of tissue biopsies. In: Diagnosis Molecular Pathology, eds. Herrington CS & McGee JO, Oxford: Oxford University Press, 1992; 2: [85-112].

59. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD.

Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2002, 2000; (28): [12-55].

60. SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD, DZINK JL.

Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol*, 1998; 18: [440-444].

61. SOCRANSKY S S, TANNER A C R, HAFFAJEE A D, HILLMAN J D, GOODSON J M.

Present status of studies on the microbial etiology of periodontal disease. In: Genco R J, Mergen- hagen S E (eds) *Host-parasite interactions in periodontal diseases*. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1982 ; 41: [1-12].

62. SONG Y.

PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, 2005; 11: [79- 91].

63. STINGU CS, RODLOFF AC, JENTSCH H, SCHAUMANN R, et ESCHRICH K.

Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol*. (2008), 23(5) : 372-376

64. THEILADE E, WRIGHT WH, JENSEN SB, LOE H.

Experimental gingivitis in man. 2. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontal Res*, 1966; 1: [1-13].

65. TRAN SD, RUDNEY JD.

Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA genes primers for simultaneous detection of *actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol*, 1996; 34: [2674-2678].

66. VAN WINKELHOFF AJ.

Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Int J Dent Hygiene*, 2003; 1: 1[31-137].

67. VECHIS S.

Rôle des facteurs généraux. Attitude thérapeutique en parodontie. *J Parodontol*, 1985; 4(3): [247-260].

68. VERGNES JN, SIXOU M.

Preterm low birth weight and maternal periodontal status: a meta-analysis. *American Journal of Obstetrics Gynecology* February, 2007; (2): [135-147].

69. VERNER C, LEMAITRE P, DANIEL A.

Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. *Oral Microbiol Immunol*, 2006; 21: [341–346].

70. VIELKIND P, JENTSCH H, ESCHRICH K , RODLOFF AC, STINGU CS.

Prevalence of *Actinomyces* spp, in patients with chronic periodontitis *Int J Med Microbiol* . 2015 Oct ;305(7): [682-8].

71. WALKER CB, RATLIFF D, MULLER D et SOCRANSKY SS.

Medium for selective isolation of *Fusobacterium nucleatum* form human periodontal pockets. *J Clin Microbiol*, 1979; 10: [844-849].

72. WILKINS E. M.

Prévention et traitement en hygiène dentaire.

Gaetan, Morin, Québec, 1991: 746p

73. WOLF HF

Parodontologie.Paris masson, 2005; 2: 58p

74. WOOP C, NGK H, LAUS K, YIPK T, FUNG AM, LEUNG KW, TAM DM, QUE TL, et YUEN KY.

Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol*, 2003; 41(5): [1996–2001].

RESUME

Contexte : Les parodontopathies sont des infections poly microbiennes à manifestation inflammatoire. Les méthodes conventionnelles d'identification ont montré leurs limites liées à la complexité des protocoles. La spectrométrie de masse, système d'identification des microorganismes via leurs protéines est une méthode alternative à ces difficultés.

L'objectif de ce travail était d'étudier la composition bactériologique du microbiote bucco-dentaire et du biofilm sous gingival grâce à la spectrométrie de masse type MALDI-TOF.

Méthodes : Il s'agissait d'une étude transversale descriptive s'étalant sur une période de 3 mois et portant sur un échantillon de 25 patients âgés de 20 à 76 ans. La moyenne d'âge était de 39 ans avec un écart-type de 17 ans.

Ainsi 100 prélèvements de biofilm sous gingival et 25 écouvillons ont été réalisés à la clinique de Parodontie de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar puis transportés et analysés au laboratoire de microbiologie de l'hôpital principal de Dakar.

Résultats : l'examen parodontal avait montré une prévalence de 44% pour la parodontite et 56% de cas de gingivites induites par la plaque. La culture et l'identification des colonies par le MALDI-TOF ont permis d'isoler au total 43 espèces bactériennes dont 33 aéro-anaérobies facultatives, 06 bactéries anaérobies et 04 aérobies.

Conclusion : la rapidité et la fiabilité du MALDI-TOF en font une technique d'identification innovante en parodontie surtout chez des patients candidats à des traitements complexes à type de régénération parodontale ou de traitement implantaire. Toutefois, d'autres études avec des qualités méthodologiques plus structurées sont nécessaires.

