



HAL
open science

Étude expérimentale de la flore linguale

Aurore Mailharrin

► **To cite this version:**

| Aurore Mailharrin. Étude expérimentale de la flore linguale. Chirurgie. 2014. dumas-01097233

HAL Id: dumas-01097233

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01097233>

Submitted on 19 Dec 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Bordeaux
Collège des Sciences de la Santé
UFR des Sciences Odontologiques

Année 2014

N° 53

Thèse pour l'obtention du
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement

Par Aurore MAILHARRIN

Née le 28 février 1987 à Pessac

le 08 décembre 2014

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA FLORE LINGUALE

Directeur de thèse

Docteur Marie-Cécile BADET

Membres du jury

Président	Mme V.DUPUIS	Professeur des Universités
Directeur	Mme M-C.BADET	Maître de Conférences des Universités
Rapporteur	Mr J.SAMOT	Maître de Conférences des Universités
Assesseur	Mr C.BOU	Maître de Conférences des Universités
Invité	Mme C.LAURENS	Docteur en chirurgie dentaire

COLLEGE DES SCIENCES DE LA SANTE
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Directeur	M. Jean-François PELI	58-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Formation initiale	M. Yves DELBOS	56-01
Directeur Adjoint – Chargé de la Recherche	M. Jean-Christophe FRICAIN	57-02
Directeur Adjoint - Chargé des Relations Internationales	M. Jean-François LASSERRE	58-02

ENSEIGNANTS DE L'UFR

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme Caroline	BERTRAND	Prothèse dentaire	58-02
Mlle Marie-José	BOILEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
Mme Véronique	DUPUIS	Prothèse dentaire	58-02
M. J-Christophe	FRICAIN	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

Melle Elise	ARRIVÉ	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mme Cécile	BADET	Sciences biologiques	57-03
M. Etienne	BARDINET	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Michel	BARTALA	Prothèse dentaire	58-02
M. Cédric	BAZERT	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Jean-Pierre	BLANCHARD	Prothèse dentaire	58-02
M. Christophe	BOU	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Mlle Sylvie	BRUNET	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Sylvain	CATROS	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
M. Stéphane	CHAPENOIRE	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Jacques	COLAT PARROS	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Reynald	DA COSTA NOBLE	Parodontologie	57-01
M. François	DARQUE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. François	DE BRONDEAU	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Yves	DELBOS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Raphael	DEVILLARD	Odontologie conservatrice- Endodontie	58-01
M. Emmanuel	D'INCAU	Prothèse dentaire	58-02
M. Bruno	ELLA NGUEMA	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
M. Dominique	GILLET	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François	LASSERRE	Prothèse dentaire	58-02
M. Yves	LAUVERJAT	Parodontologie	57-01
Mme Odile	LAVIOLE	Prothèse dentaire	58-02
M. Jean-Marie	MARTEAU	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Mme Javotte	NANCY	Odontologie pédiatrique	56-01
Mme Dominique	ORIEZ	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Jean-François	PELI	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Philippe	POISSON	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Patrick	ROUAS	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Johan	SAMOT	Sciences biologiques	57-03

Mlle Maud	SAMPEUR	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Cyril	SEDARAT	Parodontologie	57-01
Mlle Noélie	THEBAUD	Sciences biologiques	57-03
M. Eric	VACHEY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01

ASSISTANTS

Melle Audrey	AUSSEL	Sciences biologiques	57-03
M. Terence	BARSBY	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mme Aurélie	BARSBY-EL-KHODER	Prothèse dentaire	58-02
Mme Mélanie	BOES-HULLMAN	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Julien	BROTHIER	Prothèse dentaire	58-02
Melle Caroline	CHANE-FANE	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Mathieu	CLINKEMAILLIE	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu	CONTREPOIS	Prothèse dentaire	58-02
M. Guillaume	CRESTE	Prothèse dentaire	58-02
Mme Hélène	DENOST	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
M. Guillaume	FENOUL	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
Mlle Geraldine	FERRERO-MOURGUES	Orthopédie dento-faciale	56-02
M. Nicolas	GLOCK	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Melle Sandrine	GROS	Orthopédie dento-faciale	56-02
Melle Olivia	KEROUREDAN	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-02
Melle Amandine	LAVAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
Melle Alice	LE NIR	Sciences anatomiques et physiologiques	58-03
Mme Karine	LEVET	Prévention épidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale	56-03
Melle Maria-Gabriela	MARC	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. Matthieu	MEYER	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Melle Darrène	NGUYEN	Sciences biologiques	57-03
Melle Virginie	PANNEREC	Chirurgie buccale – Pathologie et thérapeutique	57-02
Melle Candice	PEYRAUD	Odontologie pédiatrique	56-01
M. Jean-Philippe	PIA	Prothèse dentaire	58-02
M. Mathieu	PITZ	Parodontologie	57-01
M. Clément	RIVES	Odontologie conservatrice – Endodontie	58-01
M. François	VIGOUROUX	Parodontologie	57-01

MAJ
01/09/2014

REMERCIEMENTS

**A notre Présidente de thèse,
Madame le Professeur DUPUIS,**

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier Universitaire

DERSO

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur d'Etat en Odontologie

Chef de pôle d'Odontologie et de Santé buccale du CHU de Bordeaux

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant la présidence de mon jury de thèse.

Voyez en ce travail l'expression de ma sincère considération et de mes remerciements les plus respectueux.

**A notre Directrice de thèse,
Madame le Docteur BADET,**

Maître de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Doctorat de l'Université de Bordeaux 2, Mention Sciences Biologiques et
Médicales Option Sciences Odontologiques

Docteur en Chirurgie Dentaire

CES de Pédiodontie - Prévention

Coordonnateur de la sous section 57-03

*Je tiens à vous exprimer mes remerciements les plus sincères pour
la disponibilité et la patience dont vous avez fait preuve.*

*Vous m'avez guidée et soutenue tout au long de l'élaboration de ce
travail.*

*Veillez trouver ici l'expression de ma plus vive reconnaissance, de
toute ma gratitude et la marque de mon profond respect.*

**A notre Rapporteur,
Monsieur le Docteur SAMOT,**

Maître de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Doctorat de l'Université de Bordeaux 2, Mention Sciences, Technologie, Santé,
Option Microbiologie-Immunologie

Docteur en Chirurgie Dentaire

C.E.S d'Odontologie Chirurgicale

C.E.S de Parodontologie

C.E.S d'Odontologie Légale

Je vous remercie pour votre aide, vos précieux conseils et votre gentillesse tout au long de l'élaboration de ce travail, mais également lors de mes vacances hospitalières.

Veillez trouver ici le témoignage de toute ma gratitude.

**A notre Assesseur,
Monsieur le Docteur BOU,**

Maître de Conférences des Universités

Praticien Hospitalier

Docteur en Chirurgie Dentaire

Docteur en Sciences biologiques

CES de Prothèse maxillo-faciale

D.U. d'Economie de la santé et organisation professionnelle en Odontologie

D.U. d'Odontologie légale et Expertise

Doctorat de l'Université de Toulouse III

D.E.A Anthropologie physique Bordeaux 1

Membre FRE 2960/ Laboratoire anthropobiologie Toulouse III

Responsable de la sous section Santé Publique

Expert judiciaire en identification odontologique

Je vous remercie d'avoir accepté de porter un jugement sur ce travail, en qualité d'assesseur.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

**A notre invitée,
Madame le Docteur LAURENS,**

Docteur en Chirurgie Dentaire

C.E.S de Biomatériaux, Bordeaux 2

C.E.S de Parodontologie et d'implantologie, Paris 7

Post graduate de Parodontologie et d'Implantologie, New York.

Je vous remercie très sincèrement d'avoir spontanément accepté de m'aider dans la réalisation de ce travail et de m'avoir accueillie au sein de votre cabinet afin que je puisse réaliser les prélèvements.

Merci également pour votre gentillesse et votre bonne humeur qui ont rendu chacun de mes passages au cabinet très agréables.

Soyez certaine de ma profonde reconnaissance et de toute ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES TABLEAUX	13
LISTE DES FIGURES	14
LISTE DES ABREVIATIONS	16
INTRODUCTION	17
I. ETAT DES CONNAISSANCES	19
I.1. La flore linguale	20
I.1.1. Généralités.....	20
I.1.2. Morphologie linguale.....	20
I.1.3. Caractéristiques de l'écosystème lingual.....	20
I.1.3.1. Enduit lingual.....	20
I.1.3.2. Espèces présentes au sein de la flore linguale	20
I.2. Bactéries impliquées dans les maladies parodontales	22
I.2.1. Généralités.....	22
I.2.2. Flore des parodontites chroniques.....	22
I.2.3. Flore des parodontites agressives	23
I.2.3.1. Forme localisée	23
I.2.3.2. Forme généralisée	23
I.2.4. Flore des parodontites associées à des maladies systémiques ou infectieuses	24
I.2.4.1. Sujets leucémiques ou neutropéniques	24
I.2.4.2. Sujets VIH+ (Virus de l'Immunodéficiência Humaine).....	24
I.2.4.3. Syndrome de papillon Lefèvre.....	24
I.2.4.4. Syndrome de Down (Trisomie 21).....	24
I.2.4.5. Sujets diabétiques	24
I.2.4.6. La maladie de Crohn.....	24
I.2.5. Flore des maladies parodontales nécrotiques.....	25
I.2.6. Flore des parodontites réfractaires	25
I.3. Bactéries impliquées dans l'halitose.....	26
I.3.1. Généralités concernant l'halitose	26
I.3.2. Pathogénèse de l'halitose.....	26
I.3.2.1. CSV.....	26
I.3.2.2. Autres composés pouvant être à l'origine de l'halitose	26
I.3.2.3. Lieu de production	27
I.3.3. Facteurs impliqués dans l'halitose.....	27
I.3.3.1. Plaque linguale	27
I.3.3.2. Bactéries.....	27

I.3.3.2.1. Charge bactérienne	27
I.3.3.2.2. Espèces produisant des CSV	28
I.3.3.2.3. Espèces fréquemment retrouvées dans la flore linguale des patients concernés par l'halitose et diversité bactérienne	29
I.3.4. Maladie parodontale et halitose	29
I.4. Impact clinique	31
I.4.1. Sur le traitement de l'halitose	31
I.4.1.1. Soins de la langue	31
I.4.1.2. Association des traitements mécaniques et chimiques	31
I.4.1.3. Thérapies antimicrobiennes	31
I.4.1.4. Composés pouvant faire partie intégrante des traitements	31
I.4.1.5. Bains de bouche	32
I.4.1.6. Dentifrices	32
I.4.2. Sur les maladies parodontales	32
II. TRAVAUX EXPERIMENTAUX	33
II.1. Buts de l'étude	34
II.2. Matériel et méthodes	35
II.2.1. Critères d'exclusion et d'inclusion	35
II.2.2. Les prélèvements	35
II.2.2.1. Matériel de prélèvement	35
II.2.2.2. Protocole de prélèvement	35
II.2.3. Mise en culture	36
II.2.3.1. Géloses utilisées	36
II.2.3.2. Protocole	36
II.2.3.3. Mise en anaérobiose	37
II.2.4. Analyse des cultures	38
II.2.4.1. Observation	38
II.2.4.2. Comptage	38
II.2.4.3. Description des colonies	39
II.2.5. Coloration de Gram et observation au microscope optique	39
II.2.6. Mise en culture en milieu liquide	39
II.2.7. Identification	39
II.2.7.1. Par les méthodes biochimiques : les galeries API	39
II.2.7.1.1. Décongélation et mise en culture	39
II.2.7.1.2. Réalisation des galeries API 20A	39
II.2.7.1.3. Lecture des galeries	40
II.2.7.2. Par les méthodes de biologie moléculaire : PCR (Polymerase Chain Reaction)	41
II.2.7.2.1. Extraction d'ADN	41
II.2.7.2.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN par électrophorèse	41
II.2.7.2.3. Préparation du mix	41
II.2.7.2.4. PCR	42
II.2.7.2.4. Electrophorèse	43
II.2.7.3. Par les méthodes de biologie moléculaire : le séquençage	43
II.2.8. Analyse statistique	44
III. RESULTATS	45
III.1. Description de la population	46

III.2. Analyse quantitative du nombre de bactéries présentes au sein de la flore linguale des différents groupes	48
III.2.1. Synthèse des données	48
III.2.2. Analyse statistique	51
III.3. Analyse qualitative des espèces bactériennes retrouvées au sein de la flore linguale des différents groupes	55
III.3.1. Résultats des identifications par les méthodes biochimiques : les galeries API.....	55
III.3.2. Résultats des identifications par les méthodes de biologie moléculaire : PCR et séquençage	55
III.3.3. Synthèse des données	56
 IV. DISCUSSION	 59
 CONCLUSION.....	 64
 BIBLIOGRAPHIE.....	 66
 ANNEXES	 70

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU N°1 – CONDITIONS UTILISEES POUR LA PCR D' <i>ACTINOMYCES NAESLUNDII</i> , <i>TANNERELLA FORSYTHIA</i> , <i>FUSOBACTERIUM NUCLEATUM</i> ET <i>AGGREGATIBACTER</i> <i>ACTINOMYCETEMCOMMITANS</i>	43
TABLEAU N°2 – DESCRIPTION DU GROUPE DE MALADES	46
TABLEAU N°3 – DESCRIPTION DU GROUPE DE TEMOINS	47
TABLEAU N°4 – NOMBRE DE COLONIES RETROUVEES SUR LES DIFFERENTS MILIEUX DE CULTURE (EXPRIME EN LOG UFC/ML) AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES PATIENTS ATTEINTS DE MALADIE PARODONTALE ET DES SUJETS TEMOINS	48
TABLEAU N°5 – NOMBRE DE COLONIES RETROUVEES SUR GELOSE FAA ET SUR GS + FAA (EXPRIME EN LOG UFC/ML) AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES SUJETS CONCERNES PAR L'HALITOSE ET DES SUJETS NON CONCERNES	49
TABLEAU N°6 – NOMBRE TOTAL DE COLONIES RETROUVEES SUR GS + FAA (EXPRIME EN LOG UFC/ML) AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES SUJETS PRATIQUANT LE BROSSAGE LINGUAL ET DE CEUX NE LE PRATIQUANT PAS	50

LISTE DES FIGURES

FIGURE N°1 – MISE EN PLACE DE L’ECHANTILLON DANS LE SPECTROPHOTOMETRE ET LECTURE DE LA DENSITE OPTIQUE.....	36
FIGURE N°2 – DEPOT DE 50 µL AU CENTRE DE LA GELOSE FAA ET ETALEMENT EN RATEAU.....	37
FIGURE N°3 – DEPOT DE 50 µL AU CENTRE DE LA GS ET ETALEMENT EN RATEAU..	37
FIGURE N°4 – GELOSES EN ANAEROBIOSE	38
FIGURE N°5 – APRES MISE EN ANAEROBIOSE A 37°C, OBSERVATION D’UNE GS A GAUCHE, ET D’UNE GELOSE FAA A DROITE (DILUTIONS A 10 ⁻⁴ ET 10 ⁻² RESPECTIVEMENT)	38
FIGURE N°6 – RECUEIL DES COLONIES PRESENTES A LA SURFACE DE LA GELOSE GRACE A UN ECOUVILLON, PUIS DISPERSION DANS L’AMPOULE	40
FIGURE N°7 – MICROTUBES REMPLIS A L’AIDE DE LA PIPETTE PASTEUR	40
FIGURE N°8 – PROFIL BIOCHIMIQUE D’UN <i>FUSOBACTERIUM NUCLEATUM</i>	41
FIGURE N°9 – RELATION ENTRE L’ETAT PARODONTAL ET LE NOMBRE DE COLONIES RETROUVEES SUR GS	51
FIGURE N°10 – RELATION ENTRE L’ETAT PARODONTAL ET LE NOMBRE DE COLONIES RETROUVEES SUR GELOSE FAA.....	52
FIGURE N°11 – RELATION ENTRE L’ETAT PARODONTAL ET LE NOMBRE TOTAL DE COLONIES.....	52
FIGURE N°12 – RELATION ENTRE L’HALITOSE ET LE NOMBRE DE COLONIES RETROUVEES SUR GELOSE FAA.....	53
FIGURE N°13 – RELATION ENTRE L’HALITOSE ET LE NOMBRE TOTAL DE COLONIES	53
FIGURE N°14 – RELATION ENTRE LE BROSSAGE LINGUAL ET LE NOMBRE TOTAL DE COLONIES.....	54

FIGURE N°15 – GEL OBTENU A L'ISSUE DE LA PCR ET DE L'ELECTROPHORESE DES ECHANTILLONS PRESUMES <i>ACTINOMYCES NAESLUNDII</i>	55
FIGURE N°16 – ESPECES RETROUVEES AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES PATIENTS ATTEINTS DE PARODONTITE ET DES SUJETS TEMOINS.....	56
FIGURE N°17 – ESPECES RETROUVEES AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES SUJETS CONCERNES PAR L'HALITOSE ET DES SUJETS NON CONCERNES.....	57
FIGURE N°18 – ESPECES RETROUVEES AU SEIN DE LA FLORE LINGUALE DES SUJETS PRATIQUANT LE BROSSAGE LINGUAL ET DES SUJETS NE LE PRATIQUANT PAS	57

LISTE DES ABREVIATIONS

ARA	<i>Arabinose</i>
ATCC	<i>American Type Cell Culture</i>
BCP	<i>Pourpre de Bromocrésol</i>
CEL	<i>Cellobiose</i>
UFC	<i>Unité formant colonie</i>
CSV	<i>Composés Soufrés Volatiles</i>
DO	<i>Densité Optique</i>
EHR	<i>Réactif d'Ehrlich</i>
FAA	<i>Fastidious Anaerobe Agar</i>
GLU	<i>Glucose</i>
GLY	<i>Glycérol</i>
GS	<i>Gélose au Sang</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Humaine</i>
LAC	<i>Lactose</i>
MAL	<i>Maltose</i>
MAN	<i>Mannitol</i>
MLZ	<i>Mélézitose</i>
MNE	<i>Mannose</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RAF	<i>Raffinose</i>
RHA	<i>Rhamnose</i>
SAC	<i>Saccharose</i>
SOR	<i>Sorbitol</i>
TRE	<i>Tréhalose</i>
XYL	<i>Xylène</i>
WCA	<i>Wilkins et Chalgren Anaerobe</i>

INTRODUCTION

Diverses études ont évalué la présence d'espèces bactériennes spécifiques dans différentes régions de la cavité buccale. Ces recherches ont été motivées par les possibles associations entre les bactéries présentes à la surface des tissus mous et l'halitose ou les maladies parodontales. (1,2)

La face dorsale de la langue, de par sa morphologie, pourrait servir de réservoir bactérien, jouant ainsi un rôle crucial dans l'apparition ou la récurrence des pathologies buccales. Elle a, du reste, été récemment identifiée comme la source primaire de mauvaise haleine, à la fois chez les sujets sains et chez des patients atteints de maladie parodontale, alors que les pathogènes présents au sein des poches parodontales étaient, par le passé, impliqués seuls dans l'halitose. (3,4) Les mécanismes de l'apparition de la mauvaise haleine semblent corrélés à la production de CSV (Composés Soufrés Volatiles) par des bactéries du dos de la langue, parmi lesquelles des bactéries responsables des maladies parodontales, telles que *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*, qui sont de puissants producteurs de ces composés *in vitro*. (5,6)

Toutefois, les études sur le biofilm lingual sont relativement peu nombreuses par rapport aux recherches sur la plaque dentaire. Aussi, d'autres travaux sont nécessaires pour déterminer d'une part l'importance de la microanatomie de ce site sur l'accumulation bactérienne, mais également les relations qui existent entre la langue et la santé buccale. Cela pourrait avoir des conséquences cliniques directes, comme l'intégration systématique du brossage de la langue dans le plan de traitement parodontal conventionnel. (7,8) En effet, malgré l'intérêt croissant des études pour la flore linguale, le nettoyage de la langue reste une pratique qui n'est pas encore largement adoptée dans la culture occidentale, premièrement de par l'inconfort de la méthode, mais également de par le manque de sensibilisation. (1,9)

Le but de notre travail est d'étudier les relations entre la flore linguale et les maladies parodontales et l'halitose. Pour cela, nous avons réalisé des prélèvements de la surface de la langue chez des sujets sains, et atteints de maladie parodontale, et nous avons recherché au sein de la flore linguale de ces deux groupes, les bactéries potentiellement responsables des maladies parodontales et de l'halitose, autrement dit les bactéries anaérobies à Gram négatif.

Dans une première partie, nous nous intéresserons à l'état des connaissances actuelles : que savons-nous sur la flore linguale actuellement ? Quelles sont les lacunes ? Les acquis ? L'impact clinique ? La deuxième partie exposera nos travaux expérimentaux. Dans une troisième partie, nous mettrons en avant les résultats obtenus. Résultats que nous discuterons dans une dernière partie en les confrontant aux données actuellement disponibles dans la littérature.

I. Etat des connaissances

I.1. La flore linguale

I.1.1. Généralités

Le dos de la langue possède une flore unique qui représente environ un tiers de la population bactérienne présente dans la cavité buccale. (2,10)

Plusieurs études ont suggéré que les muqueuses orales, incluant la langue, servaient de réservoir microbien. (2,11–13) Il a été trouvé qu'il y avait plus de bactéries parodontales dans la plaque linguale que sous gingivale, et que la plaque linguale était à la fois une source de bactéries pour les autres sites de la cavité buccale, et un site receveur pour les bactéries. Il est également possible que ces bactéries au sein de la flore linguale puissent influencer l'halitose. (2,5)

La langue pourrait, de plus, être un facteur majeur dans la recolonisation des surfaces dentaires après un traitement parodontal. (2,14)

I.1.2. Morphologie linguale

La face dorsale de la langue est l'une des surfaces les plus volumineuses de la cavité buccale, et sa morphologie est propice à la colonisation bactérienne. (15,16)

En effet, le dos de la langue se caractérise par de nombreuses irrégularités, telles que des fissures, des cryptes, des zones dépapillées, des papilles ; autant de dépressions qui favorisent la diversité de la population bactérienne. Du point de vue des microorganismes, la langue est un endroit idéal pour vivre. Elle offre une température propice à la croissance bactérienne, suffisamment d'eau, une surface adéquate pour la formation de biofilms, un accès à une alimentation continue en nutriments par la salive, les débris de nourriture et l'épithélium humain desquamé. Les papilles offrent des surfaces importantes favorisant l'accumulation de débris et de microorganismes. Les niches créent un environnement dans lequel les microorganismes sont protégés des phénomènes de chasse salivaire et où le niveau d'oxygène est bas, de même que le potentiel d'oxydoréduction, permettant le développement de bactéries anaérobies. (2,8,9,14–17)

I.1.3. Caractéristiques de l'écosystème lingual

I.1.3.1. Enduit lingual

L'enduit lingual est un biofilm qui se forme sur la face dorsale de la langue et qui se présente comme une couche blanchâtre, composée de débris de cellules épithéliales, de cellules sanguines, de métabolites, de nutriments, de leucocytes provenant des poches parodontales, et de bactéries qui métabolisent ces substrats. La composition de l'enduit lingual varie en fonction de différents facteurs comme l'âge, l'hygiène, le flux salivaire, et l'état parodontal. Dans l'enduit lingual, la large population bactérienne qui produit des CSV serait responsable de l'halitose. (6,12,14–16,18)

I.1.3.2. Espèces présentes au sein de la flore linguale

La microflore associée au dos de la langue de patients sains, concernés par l'halitose ou atteints de parodontite, est complexe. D'autres études ont mis en évidence que la langue héberge une flore très diversifiée, (7) variable et importante, avec de fortes proportions de bactéries anaérobies. (8,15) Le dos de la langue semble abriter l'une des niches bactériennes les plus complexes de l'écologie microbienne humaine. (2,10,14)

Dans la flore linguale cultivable prédominante, on retrouve principalement des streptocoques, notamment *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus mitis*, mais aussi *Neisseria* spp, *Actinomyces odontolyticus*, des espèces de *Veillonella* ainsi que plusieurs espèces de *Bacteroides*, *Fusobacterium* et *Peptostreptococcus*. (14,18,19)

Plusieurs études ont indiqué qu'un large éventail d'espèces bactériennes, y compris *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* peuvent également être détectées à la surface de la langue. (2,12,19,20) Une étude a d'ailleurs montré que *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* et *Prevotella intermedia* étaient détectées plus fréquemment dans les échantillons provenant de l'enduit lingual que dans ceux provenant de la plaque dentaire. (6)

Eikenella corrodens et les *spirochètes* sont fréquemment retrouvés. (2,4,14)

En plus des espèces citées ci-dessus, *Capnocytophaga* a également été retrouvée dans la flore du dos de la langue. (12)

I.2. Bactéries impliquées dans les maladies parodontales

I.2.1. Généralités

La parodontite constitue, avec la carie dentaire, la principale maladie infectieuse orale. Il s'agit d'une infection polymicrobienne, à prédominance anaérobie. Elle entraîne une destruction progressive des tissus de soutien de la dent, avec formation de poches et de récessions, aboutissant, à terme, à la perte de la dent. (14,20–27)

L'événement physiopathologique central dans l'histoire naturelle de la maladie parodontale est l'exposition chronique à une flore orale pathogène. (11,19–21,28) Le développement de la maladie parodontale s'accompagne d'un changement de profil bactérien, avec un taux de certains pathogènes parodontaux différent chez les patients atteints de parodontite, comparé aux sujets sains. Ainsi, outre l'aspect qualitatif des pathogènes parodontaux, l'aspect quantitatif, à savoir la charge bactérienne présente chez le sujet, influence le développement de la maladie parodontale. Ceci est parfaitement illustré par *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* ou *Prevotella intermedia*, qui sont présentes chez les sains et les malades, mais en quantités beaucoup plus importantes chez ces derniers. Il a été suggéré que les sujets au parodonte sain transportent des pathogènes parodontaux présumés comme faisant partie de la flore buccale normale. Ces bactéries, détectées en faible nombre, peuvent même avoir un effet bénéfique sur l'hôte (développement de l'immunité adaptative). La destruction des tissus parodontaux est associée à la translocation dynamique endobuccale des parodontopathogènes, ainsi qu'à la colonisation de nombreuses niches écologiques de la cavité buccale. Des changements dans les conditions écologiques favorisent la croissance de ces organismes faisant partie de la flore normale, au-delà d'un seuil suffisant, pouvant mener à la parodontite. (23,24,27,29)

Beaucoup d'études épidémiologiques et moléculaires ont été réalisées pour évaluer les espèces microbiennes impliquées dans les maladies parodontales. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Porphyromonas gingivalis* apparaissent en tête de liste des pathogènes parodontaux, de par leurs facteurs de virulence et leurs mécanismes pathogènes, ainsi que par leur forte prévalence partout dans le monde. Il a également été montré que d'autres bactéries telles que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Eubacterium spp*, *Selenomonas spp*, *Tannerella forsythia* et *Treponema spp* étaient associées aux maladies parodontales. Les souches à Gram négatif possèdent un pouvoir parodontolytique supérieur à celui des bactéries à Gram positif. D'ailleurs, lors du passage de l'état sain à la maladie parodontale, on observe une augmentation importante des bactéries anaérobies strictes, à Gram négatif, et des organismes motiles. Les spirochètes s'observent dans toutes les pathologies parodontales. (11,18,21–24,27–29)

Tannerella forsythia, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Prevotella intermedia* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ont été retrouvées dans la flore linguale de patients atteints de parodontite. Ainsi, il a été suggéré que les pathogènes parodontaux provenant des surfaces linguales pouvaient être fortement associés avec les parodontites, et que la langue pouvait fonctionner tel un réservoir pour les pathogènes parodontaux. (8,11,13)

I.2.2. Flore des parodontites chroniques

La parodontite chronique est le type de maladie parodontale le plus commun, et peut agir comme un important facteur de risque pour les maladies systémiques chroniques, telles que l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires. (23–25,27)

La parodontite chronique se caractérise par une inflammation gingivale, une perte d'attache, des mobilités et des migrations dentaires plus ou moins importantes. La flore des poches parodontales varie beaucoup d'un patient à un autre, et d'un site à un autre. Lors des phases de rémission, elle est proche de la flore normale. En revanche dans les lésions actives, cette flore polymorphe est dense, et se caractérise par de nombreuses bactéries anaérobies à Gram négatif, ainsi que par des bactéries mobiles, notamment des spirochètes (environ 30%). (14,22,28)

En ce qui concerne la parodontite initiale, trois espèces semblent être impliquées : *Campylobacter rectus*, *Selenomonas noxia* et *Tannerella forsythia*. (14)

Les bactéries qui ont été impliquées dans les parodontites chroniques sont *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia* et *Treponema denticola*. *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia ssp nigrescens*, *Selenomonas spp* sont également associées à ces pathologies. De plus, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, et *Tannerella forsythia* sont des indicateurs importants de la maladie parodontale destructrice chez les sujets adultes. (14,20–23,25,27,28)

Prevotella intermedia et *Fusobacterium spp* ont été retrouvées chez des sujets atteints de parodontite chronique généralisée légère. (27,30)

⇒ En résumé, environ 75% des bactéries associées à la parodontite chronique sont à Gram négatif. 90% sont des anaérobies strictes. (28)

I.2.3. Flore des parodontites agressives

La parodontite agressive se caractérise par une perte d'attache et une destruction osseuse rapides, le plus souvent chez le sujet jeune. (28,31)

Aggregatibacter actinomycetemcomitans est connue pour agir dans les poches gingivales de patients atteints de parodontites agressives. (5,27,28)

Dans ces formes sévères de parodontite, des pathogènes très nombreux et très virulents colonisent les poches parodontales. (14)

I.2.3.1. Forme localisée

Les parodontites agressives localisées sont quatre fois plus fréquentes que les parodontites agressives généralisées. (14)

Dans la parodontite juvénile agressive localisée, on note la présence d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, qui est considéré comme le pathogène prédominant. D'autres espèces anaérobies à Gram négatif sont retrouvées, parmi lesquelles *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*. (14,21,22,28)

I.2.3.2. Forme généralisée

Dans les parodontites juvéniles généralisées et les parodontites agressives à progression rapide, la flore des poches parodontales profondes est très polymorphe. Les principales espèces prédominantes et indispensables au développement de cette pathologie sont *Porphyromonas gingivalis*, mais aussi *Eikenella corrodens*, *Selenomonas* et *Tannerella forsythia*. D'autres bacilles anaérobies à Gram négatif sont parfois présents, notamment *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* et *Treponema denticola*, tandis qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est retrouvé en faible nombre. (14,19,22,25)

Une flore inhabituelle, opportuniste est souvent présente : staphylocoques, bacilles entériques, *Pseudomonas spp*, *Candida albicans*. (14)

⇒ En résumé, dans la parodontite agressive, 65 à 75% des bactéries sont des bacilles à Gram négatif. (28)

I.2.4. Flore des parodontites associées à des maladies systémiques ou infectieuses

Les parodontites observées lors des maladies systémiques sont très souvent des parodontites agressives qui se développent grâce à la détérioration des défenses de l'hôte. La flore sous gingivale est en grande partie semblable à celle des parodontites agressives. (14)

I.2.4.1. Sujets leucémiques ou neutropéniques

Aggregatibacter actinomycetemcomitans, *Fusobacterium spp*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et des spirochètes sont les espèces bactériennes particulièrement associées aux parodontites liées aux désordres hématologiques. Une flore inhabituelle opportuniste composée d'*Acinetobacter spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, de staphylocoques et de *Candida albicans* est souvent présente. (14,21)

I.2.4.2. Sujets VIH+ (Virus de l'Immunodéficience Humaine)

Les germes pathogènes sont plus nombreux chez les sujets VIH+. Des organismes inhabituels, tels que *Pseudomonas aeruginosa*, des bacilles entériques, et *Candida* sont parfois isolés. Certains parodontopathogènes tels qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia* sont retrouvés plus fréquemment dans les sites parodontopathiques des sujets VIH+. Parfois, des taux importants de spirochètes et peu de *Candida* et de bacilles à Gram négatif sont retrouvés. (14,21,22)

I.2.4.3. Syndrome de papillon Lefèvre

La flore sous gingivale des patients atteints de ce syndrome est constituée à 80% de bacilles à Gram négatif. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* est l'espèce la plus souvent détectée de même qu'*Haemophilus aphrophilus* et *Prevotella intermedia*. D'autres espèces sont isolées moins fréquemment, telles qu'*Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* et *Porphyromonas gingivalis*. (14,21,22)

I.2.4.4. Syndrome de Down (Trisomie 21)

La parodontite associée à ce syndrome se caractérise par la présence d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, de *Porphyromonas gingivalis*, de *Prevotella intermedia* et d'un grand nombre de spirochètes. (14,21)

I.2.4.5. Sujets diabétiques

Un nombre élevé de parodontopathogènes est retrouvé dans les sites malades de diabétiques insulino dépendants mal contrôlés, comparé aux sites sains de ces mêmes sujets, notamment *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Prevotella melaninogenica*. Certaines de ces espèces sont retrouvées dans les poches parodontales de diabétiques non insulino dépendants, telles qu'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*. Cette dernière est l'espèce la plus fréquemment retrouvée. Chez les sujets diabétiques jeunes, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* et *Capnocytophaga* sont retrouvées en nombre élevé dans la plaque sous gingivale, alors que chez l'adulte diabétique, on retrouve majoritairement *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*. (14,21)

I.2.4.6. La maladie de Crohn

Une forte prévalence de *Campylobacter concisus* et *Campylobacter rectus* est retrouvée dans la flore sous gingivale de ces patients. Des pathogènes anaérobies stricts, tels que des bacilles à Gram négatif, des cocci et des bacilles à Gram positif sont également isolés. (14,21)

I.2.5. Flore des maladies parodontales nécrotiques

La flore des parodontites ulcéro nécrotiques est constituée essentiellement d'espèces anaérobies strictes, telles que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia* et *Treponema* (30 ou 40% de la flore). Le tissu est très vulnérable à l'invasion par les bactéries anaérobies de par la concentration importante d'adrénaline circulante. Les modifications locales permettent la libération de facteurs de croissance des *Bacteroidaceae* pigmentés noirs (*Porphyromonas spp*, *Prevotella intermedia*). Une des caractéristiques de la maladie parodontale nécrotique est l'importante pénétration des spirochètes et de *Prevotella intermedia* dans le tissu conjonctif gingival, rendant leur élimination impossible par traitement mécanique. (14,21)

I.2.6. Flore des parodontites réfractaires

Il s'agit des parodontites résistantes au traitement parodontal. (22)

La flore des sites réfractaires est variable selon les sujets, et serait caractérisée par des complexes de trois ou quatre bactéries. Certaines espèces prédominent dont *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides*, *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Wollinella recta*, *Streptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus micros*. (14,21,22)

I.3. Bactéries impliquées dans l'halitose

I.3.1. Généralités concernant l'halitose

L'halitose physiologique objective a été définie comme une mauvaise haleine dépassant clairement un niveau socialement acceptable, lorsque ni une maladie ni un état pathologique pouvant en être la cause n'ont été mis en évidence. Le diagnostic repose sur des moyens de détection organoleptiques, permettant d'obtenir une évaluation plutôt subjective, et/ou sur des méthodes objectives, permettant la mesure des CSV, grâce à l'halimètre. L'halitose provenant de la cavité buccale affecte une personne sur quatre, et est fréquemment causée par des bactéries qui infectent la face dorsale de la langue, et qui produisent des CSV, grâce à la dégradation de protéines contenant des acides aminés avec des groupes soufrés. Le rôle essentiel des microorganismes oraux dans l'halitose a été étudié par de nombreux auteurs, et les bactéries présentes au sein de la flore linguale peuvent jouer un rôle plus important en terme de mauvaise odeur, comparé aux bactéries sous gingivales. (4,6,10,16,30,32) L'halitose peut aussi être le résultat d'interactions bactériennes complexes incluant de nombreuses bactéries non cultivables actuellement. (8,33)

I.3.2. Pathogénèse de l'halitose

I.3.2.1. CSV

Actuellement, il est largement reconnu que l'halitose est principalement due à des produits métaboliques générés par les bactéries de la cavité orale, les CSV. Ils proviennent de la dégradation des acides aminés contenant du soufre, tels que la méthionine et la cystéine. Le sulfure d'hydrogène (H_2S), le méthyl mercaptan (CH_3SH), le sulfure diméthyl (CH_3SCH_3) représentent les principaux CSV. La production de mauvaises odeurs est également liée à la dégradation de protéines, de cellules sanguines et de cellules épithéliales desquamées contenant du soufre à la surface de la langue, des amygdales et dans la salive. (3-5,7,8,10,13,15,16,18,32,34)

Les hauts niveaux de CSV produits par les bactéries sont toxiques pour les tissus, même à de faibles concentrations, et peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse d'affections inflammatoires, causant possiblement des dommages dans les tissus parodontaux. Certains auteurs ont d'ailleurs émis l'hypothèse que le méthyl mercaptan et le sulfure d'hydrogène étaient relâchés dans le fluide gingival et la salive, ce qui améliorerait la pénétration de l'antigène à travers l'épithélium, aboutissant à la dégradation des tissus de connexion, ou ayant des effets sur les fibroblastes et les fibrocytes dans la réaction inflammatoire. (3,15,30,32,34)

I.3.2.2. Autres composés pouvant être à l'origine de l'halitose

Des composés autres que des CSV, tels que des acides gras à courte chaîne (acide valérique, acide propionique, acide butyrique), des composés azotés volatiles (ammoniac), ainsi que des composés tels que l'indole ou la pyridine pourraient jouer un rôle dans l'halitose. Les concentrations de ces substances sont basses normalement, en relation avec leur seuil olfactif, et ils ne sont donc pas actuellement considérés comme des composants majeurs de l'halitose. Cependant, il a été souligné qu'ils pouvaient avoir un effet indirect dans l'apparition de la mauvaise haleine. (4,5,8,10)

Les diamines telles que la cadavérine et la putrescine peuvent également contribuer à l'apparition de la mauvaise haleine, dans une moindre mesure. Elles sont produites par les surfaces linguales et au sein des poches parodontales. (3,4,7-9,13,32)

Notons que ces composés ne contiennent pas de soufre. Ils ne sont par conséquent pas détectables par l'halimètre. (3)

I.3.2.3. Lieu de production

Avec le sulcus gingival, la langue constitue la principale source de production de CSV de la cavité buccale. Il a été rapporté que le site oral responsable de la plus importante production de ces molécules est la région postérieure du dos de la langue, où la plaque s'accumule. 60 à 90% des CSV sont produits à cet endroit. La langue est ainsi reconnue comme le principal site de production de mauvaises odeurs de la cavité buccale. D'autres études ont montré que le plus grand nombre de bactéries associées à l'halitose peut être trouvé au niveau de la face dorsale de la langue, au niveau des papilles caliciformes. (5,7,8,10,15,32-34)

Il existe une forte corrélation entre un enduit lingual épais, jaune ou gris, et l'halitose. La surface dorsale de la langue est sujette à l'accumulation bactérienne : plus de 100 bactéries peuvent s'attacher à une seule cellule épithéliale sur le dos de la langue, contre 25 sur d'autres types de cellules épithéliales orales. De plus, comme décrit précédemment, les caractéristiques structurelles de la langue, telles que les plis ou les crénelures, peuvent créer un microenvironnement de faible teneur en oxygène, qui est protégé contre l'action de rinçage de la salive. L'association de tous ces éléments favorise la croissance des bactéries anaérobies, pouvant produire des CSV. (3-5,8,10,14,30,32)

I.3.3. Facteurs impliqués dans l'halitose

I.3.3.1. Plaque linguale

La plaque linguale est le principal facteur impliqué dans l'halitose. Les innombrables dépressions à la surface de la langue constituent des niches idéales pour l'adhésion et la croissance bactérienne. Ces bactéries sont une source importante de production de CSV, à l'origine de la mauvaise haleine. Ainsi, la flore linguale pourrait être un facteur susceptible d'accélérer la production de CSV chez les sujets sains, tout comme chez les patients atteints d'une maladie parodontale. (2,15,32) Cette idée a été confirmée par d'autres auteurs. Yasukawa *et al* ont rapporté une augmentation des scores organoleptiques et des CSV totaux chez les sujets présentant des quantités élevées de *Treponema denticola* et de *Fusobacterium nucleatum* dans la plaque linguale. (5,34)

Dans une étude conduite sur de jeunes sujets sans maladie parodontale ni dents cariées, il a été trouvé que le degré d'halitose s'accroît avec l'augmentation de la quantité de bactéries adhérentes à la plaque linguale. (5)

Ainsi, la langue devrait être la première structure à vérifier lorsque nous sommes face à un patient se plaignant d'halitose. (15)

I.3.3.2. Bactéries

D'après de nombreux auteurs, les organismes ayant le plus grand potentiel de formation de mauvaises odeurs grâce à la production de CSV, et considérés de ce fait comme la cause de l'halitose sont les bactéries anaérobies à Gram négatif, telles que *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* et *Fusobacterium nucleatum*. (3,5-7,9,32,34)

I.3.3.2.1. Charge bactérienne

Des études sur des humains volontaires ont démontré une corrélation entre l'intensité de la mauvaise haleine et le nombre de bactéries anaérobies à Gram négatif présentes à la surface de la langue. (7,8) Ainsi, *Veillonella spp* et d'autres bactéries commensales de la cavité buccale peuvent être des contributeurs majeurs de la mauvaise haleine si leur densité de population dans le biofilm lingual s'élève, amplifiant la formation de sulfure d'hydrogène. (16)

Une étude basée sur des méthodes de culture a montré qu'il n'y avait pas de différence significative dans les pourcentages des groupes bactériens anaérobies majeurs entre les langues malodorantes et celles faiblement malodorantes, à l'exception de *Porphyromonas spp* et *Prevotella spp*. (13)

Dans le biofilm des sujets concernés par l'halitose, on observe non seulement un nombre total de bactéries significativement plus élevé, mais aussi six fois plus de producteurs de sulfure d'hydrogène. Cela est confirmé par l'étude de Washio *et al* dans laquelle le nombre total de bactéries, ainsi que le nombre total de bactéries productrices de sulfure d'hydrogène étaient significativement plus élevés dans le groupe halitose comparé au groupe témoin, suggérant un effet quantitatif plutôt que qualitatif. (17,18,30)

1.3.3.2.2. Espèces produisant des CSV

Les bactéries productrices de CSV dans le biofilm lingual sont responsables de l'halitose. (18) En effet, il a été démontré une corrélation positive entre la présence de *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola* dans le biofilm lingual, et l'augmentation de la quantité de CSV, notamment de sulfure d'hydrogène et de méthyl mercaptan. Il a été rapporté que de nombreuses bactéries, y compris *Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*, produisent des niveaux élevés de sulfure d'hydrogène, et que *Tannerella forsythia* a également une haute capacité à produire des CSV. Les espèces les plus actives dans cette formation sont *Porphyromonas gingivalis* et *Treponema denticola*. (5,13,15,33)

Ainsi, *Porphyromonas gingivalis* est une espèce fortement productrice de CSV, et fréquemment détectée sur le dos de la langue de patients concernés par l'halitose. (34) Kishi *et al* ont rapporté une corrélation entre l'adhésion de *Porphyromonas gingivalis* sur la langue et une augmentation de l'halitose, constatation supportée par d'autres recherches. (5,6,8,10,16)

Fusobacterium nucleatum a été impliquée dans l'apparition de l'halitose par de nombreux auteurs. (3,28,34) Cette espèce bactérienne à Gram négatif possède la capacité de produire à la fois du sulfure d'hydrogène et du sulfure diméthyl. (8,9,16,18)

Veillonella, *Actinomyces* et *Prevotella* sont les genres les plus répandus sur les faces dorsales linguales des sujets, qu'ils soient concernés ou non par l'halitose. Ce sont des bactéries prédominantes dans la production de sulfure d'hydrogène, et elles sont responsables de l'halitose lorsque leur nombre augmente. Autre élément intéressant, *Veillonella spp* et *Actinomyces spp* agissent en coopération au sein du biofilm lingual. (6,7,9,16,18)

Une autre étude a montré que les producteurs abondants de CSV incluaient les membres du genre *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Prevotella*, *Treponema*, *Eubacterium*, *Selenomonas* et *Bacteroides* (c'est-à-dire *Tannerella forsythia* et *Porphyromonas gingivalis*). (3,6,10,33) Il a récemment été trouvé que *Campylobacter rectus* est capable de produire du sulfure d'hydrogène et du sulfure diméthyl. (16)

Helicobacter pylori produit du sulfure d'hydrogène et du méthyl mercaptan, suggérant que ce microorganisme peut contribuer au développement de l'halitose. (33)

Le dos de la langue peut aussi héberger d'autres espèces bactériennes produisant des CSV. C'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*, qui est associée à une odeur caractéristique produite par une combinaison de CSV, notamment le méthyl mercaptan. (33)

En présence de cystéine et de méthionine, les bactéries probiotiques telles que *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* peuvent aussi générer des quantités considérables de CSV. (33)

Chez les sujets âgés, *Prevotella melaninogenica* et *Fusobacterium nucleatum* ont été associées avec les CSV et donc à l'halitose. De même, chez les non-fumeurs concernés par l'halitose, une forte prévalence d'*Enterobacteriaceae* et *Pseudomonadaceae* a été observée sur le dos de la langue. (33)

Dans une étude, *Prevotella spp* (notamment *Prevotella melaninogenica*) et *Porphyromonas spp* ont été retrouvées chez tous les sujets concernés par l'halitose. *Prevotella intermedia*, *Prevotella loescheii*, *Porphyromonas endodontalis* et *Porphyromonas gingivalis* produisent des quantités significativement plus élevées de sulfure que les autres bactéries orales. (4)

Chez les sujets concernés par l'halitose, la proportion de *Tannerella forsythia*, qui produit de grandes quantités de CSV, était plus élevée que chez les sujets non concernés, et pourrait signer un risque augmenté d'halitose. Il est d'ailleurs possible que *Tannerella forsythia* soit un facteur de risque important de l'halitose. (5,10,13,34)

1.3.3.2.3. Espèces fréquemment retrouvées dans la flore linguale des patients concernés par l'halitose et diversité bactérienne

Aucune association n'a été trouvée entre l'halitose et un genre spécifique de bactérie anaérobie. En revanche, une plus grande diversité bactérienne sur le dos de la langue des individus souffrant d'halitose a été mise en évidence. (7,8,30,33)

Streptococcus salivarius contribue à l'halitose intra orale par la déglycosylation des glycoprotéines salivaires, permettant la poursuite de la dégradation par les organismes à Gram négatif. D'autres études ont montré qu'*Atopobium parvulum*, également présent sur le dos de la langue, contribue à l'halitose intra orale. (33) Kazor *et al* ont également noté que les espèces les plus associées à l'halitose étaient *Atopobium parvulum*, *Eubacterium sulci*, *Solobacterium moorei*, et un phylotype de *Streptococcus*. (10)

Dans une étude analysant les échantillons de la face dorsale de la langue par des méthodes de biologie moléculaire sur des patients concernés par l'halitose et des sujets contrôle, il a été montré que les espèces les plus répandues dans le groupe halitose étaient *Lysobacter*, *Streptococcus salivarius*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella veroralis*, *Prevotella pallens*, *Atopobium parvulum*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas*, *Streptococcus oralis*. Les quantités de l'espèce *Prevotella* étaient beaucoup plus élevées dans le groupe halitose. (7)

Une autre étude utilisant l'amplification d'acide nucléique microbien et la culture bactérienne traditionnelle pour identifier les bactéries infectant la face dorsale de la langue chez les sujets concernés par l'halitose a mis en évidence que les espèces les plus répandues étaient *Streptococcus parasanguinis* et *Actinomyces odontolyticus*. *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis*, *Solobacterium moorei*, *Streptococcus oralis*, *Granulicatella adiacens*, *Streptococcus sanguinis* étaient également présentes chez les sujets concernés par l'halitose. *Solobacterium moorei* était essentielle parmi les espèces uniques dans le groupe halitose. Elle a été identifiée chez chaque sujet concerné par l'halitose, et elle était significativement associée avec la mauvaise haleine. (30)

Certaines espèces ont également été trouvées dans les échantillons obtenus à partir des sujets concernés par l'halitose, mais en plus faibles proportions : *Abiotrophia defectiva*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides stercoris*, *Cantonella clavibacter xyli*, *Dialister pneumosinter*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus malodoratus*, *Eubacterium nodatum*, *Haemophilus paraphrophilus*, *Kingella denitrificans*, *Luteococcus japonicus*, *Mobiluncus curtisii*, *Mogibacterium neglectum*, *Prevotella oris*, *Saccharothrix australiensis*, *Selenomonas infelix*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Stromatococcus muciliginosus*, *Treponema*, *Veillonella*. (30)

- ⇒ En résumé, les études démontrent que beaucoup de bactéries parodontales ont une grande capacité à former des CSV. (3,6,32) Ainsi, les bactéries prédominantes dans la production de CSV sont principalement des bactéries anaérobies à Gram négatif.
- ⇒ L'augmentation du nombre de bactéries produisant des CSV, ainsi que du nombre total de bactéries dans le biofilm lingual est directement liée à l'halitose. (8,18)

1.3.4. Maladie parodontale et halitose

Les données démontrent que les bactéries associées aux parodontites peuvent contribuer à l'halitose. (33) Cependant, bien que certaines études aient suggéré que la présence et la sévérité de la maladie parodontale puissent contribuer à l'intensité de la mauvaise haleine, d'autres ont démontré que l'halitose n'est pas systématiquement associée à la parodontite. (13,15)

La plupart des bactéries buccales produisant des composés malodorants (c'est-à-dire *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* ...) sont des pathogènes parodontaux. Il était

donc logique de penser que les patients atteints de maladie parodontale soient concernés par l'halitose. Or, Calil *et al* ont montré une faible association entre la production de CSV et la présence de maladie parodontale, suggérant ainsi que l'halitose n'est pas causée par la maladie parodontale seule, mais par une combinaison de facteurs, englobant l'état parodontal mais aussi et surtout la présence de bactéries produisant des CSV au sein de la plaque linguale. (15,18,32) Cette idée a été confirmée par Haraszthy *et al*, qui ont montré à travers leur étude que des espèces autres que des pathogènes parodontaux étaient également à l'origine de l'halitose. (30)

Certaines études ont mis en avant que la concentration en méthyl mercaptan chez les patients atteints de maladie parodontale était plus élevée que celle retrouvée chez les patients sains (environ huit fois plus élevée). Ainsi, les CSV pourraient non seulement être produits par les bactéries présentes dans le revêtement lingual, mais également par celles présentes dans d'autres niches, telles que les poches parodontales. C'est d'ailleurs à ce niveau que les CSV seraient majoritairement produits chez les patients atteints de maladie parodontale. En revanche, la production de CSV chez les patients sains serait principalement réalisée au niveau du revêtement de la langue. (16,32) Cela est en contradiction avec d'autres auteurs, qui ont montré que l'halitose, chez les patients atteints de maladie parodontale comme chez les sujets témoins, était plus fortement associée à la flore linguale qu'à la flore des poches parodontales, dont la contribution à l'halitose reste incertaine et minoritaire. (3,35)

I.4. Impact clinique

I.4.1. Sur le traitement de l'halitose

I.4.1.1. Soins de la langue

Le brossage des dents associé au brossage de la langue pourrait lutter efficacement contre l'apparition ou la récurrence de l'halitose, contrairement au brossage des dents seul. (3,5,15,16,35) Une étude a montré que l'absence d'hygiène linguale augmentait le nombre total de bactéries, notamment des microorganismes sévères anaérobies et virulents. (2) La section de la langue la plus touchée par l'accumulation de débris et de nourriture est la région postérieure. Par conséquent, si le nettoyage de la langue est entrepris, il faut se concentrer sur la partie la plus postérieure, à l'arrière de la langue. En effet, certaines études ont montré que le brossage régulier du dos de la langue jouait un rôle dans le contrôle de la charge bactérienne, et retirait l'enduit lingual. (3,9,12,35) Le brossage de la langue aurait donc un impact sur la flore linguale. Il semblerait essentiel pour prévenir les maladies orales. Dans ce contexte, les soins de la langue devraient faire partie intégrante des méthodes d'hygiène bucco-dentaire. (20)

Tout ceci contraste avec d'autres études, qui ont démontré que le brossage lingual ne réduisait pas le nombre de bactéries sur le dos de la langue, et que la flore était résistante. Aussi, l'efficacité du brossage lingual serait transitoire, les bactéries présentes au sein du biofilm lingual étant capables de croître rapidement et de produire des quantités significatives de CSV peu après le brossage de la langue. Ce dernier réalisé seul serait donc insuffisant pour contrôler l'halitose. (9,33)

I.4.1.2. Association des traitements mécaniques et chimiques

Comme abordé précédemment, il semble que l'inhibition de la prolifération des bactéries produisant des CSV, telles que *Fusobacterium nucleatum* et *Treponema denticola*, tout comme l'inhibition de l'accumulation et de la maturation de la plaque linguale, puissent effectivement supprimer l'halitose. Ainsi, l'importance du brossage de la langue, en plus des mécanismes de contrôle de la plaque, a été confirmée comme permettant de prévenir l'halitose. Associée à ces mécanismes de nettoyage mécanique, l'utilisation de bains de bouche inhibant la croissance bactérienne pourrait supprimer l'halitose sur le long terme, et ainsi avoir un effet sur la flore buccale. Le traitement de l'halitose serait donc basé en partie sur la réduction du biofilm bactérien présent sur le dos de la langue. (3,5,9,33,34)

I.4.1.3. Thérapies antimicrobiennes

La connaissance des bactéries responsables de l'halitose pourrait être utile dans le développement de thérapies antimicrobiennes. (5)

Une étude récente a montré qu'un certain nombre d'agents antimicrobiens et d'antibiotiques sont efficaces *in vitro* contre *Solobacterium moorei*, qui est associée à l'halitose, et probablement contre d'autres bactéries associées à la mauvaise haleine, pouvant mener à une possibilité de thérapie antimicrobienne contre l'halitose. Cependant, l'efficacité clinique de tels agents dans le traitement de l'halitose reste encore à déterminer. (30)

I.4.1.4. Composés pouvant faire partie intégrante des traitements

Les composés tels que le gluconate de chlorhexidine, le métronidazole et le zinc sont efficaces pour réduire la mauvaise haleine, en diminuant la charge bactérienne associée à la langue. (7)

Le zinc et le cuivre sont importants dans le contrôle et l'inhibition de la coaggrégation de *Porphyromonas gingivalis*, et limitent la colonisation de ce dernier dans le biofilm. De plus, le zinc apparaît comme un inhibiteur de la croissance des espèces *Fusobacterium* et *Prevotella*. (33)

I.4.1.5. Bains de bouche

Les bains de bouche anti halitose ont des actions multiples pour réduire la mauvaise haleine. D'une part la capture des CSV, d'autre part, la réduction de la production bactérienne de CSV sur le dos de la langue. (34)

Il semblerait qu'un bain de bouche contenant une faible concentration de chlorhexidine et 0.05% de chlorure de céthylpyridinium soit plus efficace qu'un bain de bouche contenant du fluorure dans le traitement de l'halitose, par l'inhibition de la flore linguale *in vitro* de sujets sains et concernés par l'halitose. De plus, un faible temps de contact avec un bain de bouche contenant de la chlorhexidine entraîne la mort des bactéries à Gram négatif anaérobies buccales produisant des CSV. Cela est pertinent étant donné que les bains de bouche sont fréquemment utilisés durant des laps de temps très courts en pratique. Cependant, leurs effets à long terme doivent être déterminés. (3,34)

Dans le même esprit, une autre étude a mis en évidence que le rinçage avec un bain de bouche contenant du zinc et de la chlorhexidine réduisait les niveaux de CSV ainsi que le nombre de bactéries de plusieurs espèces pouvant être associées à l'halitose. (33)

I.4.1.6. Dentifrices

L'utilisation d'un dentifrice contenant du lauryl sulfate de sodium peut prévenir la formation de CSV dans l'halitose matinale chez les sujets au parodonte sain. (33)

Du dentifrice contenant du zinc peut également réduire l'halitose. (33)

I.4.2. Sur les maladies parodontales

La connaissance de la flore associée à chaque type de maladie parodontale est utile pour mettre en place dans les plus brefs délais un traitement efficace, telle qu'une antibiothérapie, notamment dans le cas de la parodontite agressive. (27)

Le traitement parodontal conventionnel (motivation à l'hygiène, détartrage, surfaçage, maintenance) se traduit actuellement par une réduction des proportions des bactéries parodontales au sein des poches parodontales. Cependant, aucune réduction simultanée n'a été trouvée dans les proportions de ces bactéries sur les muqueuses. Cela soulève une question évidente : le traitement de la maladie parodontale doit-t-il être seulement limité au traitement du parodonte, ou bien est ce que les muqueuses buccales telles que la langue doivent également faire partie intégrante du traitement ? (11,12)

II. TRAVAUX EXPERIMENTAUX

II.1. Buts de l'étude

De par leur complexité, les caractéristiques de la flore linguale et ses relations avec l'halitose et la maladie parodontale restent peu claires. (4,18)

De nombreuses études ont émis l'hypothèse que la langue pourrait servir de réservoir bactérien, potentiellement responsable de la recontamination après le traitement parodontal. (2,5,13,14) Dans ce contexte, le brossage de la langue devrait faire partie intégrante des méthodes d'hygiène quotidiennes et du traitement parodontal, au même titre que le brossage des dents, afin d'assurer la maintenance et l'équilibre de la flore après la thérapie parodontale.

Nous l'avons vu, la langue, à cause de sa morphologie, est une niche idéale pour héberger les microorganismes, notamment les espèces anaérobies, qui dégradent les substances présentes sur la langue, ce qui aboutit au relâchement de CSV, à l'origine de l'halitose. (2,14-16,35) Parmi ces espèces, il est désormais admis que les pathogènes parodontaux ont une forte capacité à produire des CSV. (3,6,32) Un enduit lingual plus important a été observé chez les patients atteints de maladie parodontale, ce qui laisse présager que ces sujets présenteraient manifestement une flore microbienne plus favorable à la production de CSV qu'un individu sain. (3,33,35)

La langue constitue-t-elle réellement un réservoir bactérien jouant un rôle dans l'halitose et dans la réinfection des surfaces buccales après le traitement parodontal ? Les patients atteints de maladie parodontale souffrent-ils effectivement plus fréquemment de mauvaise haleine ? Si oui, est-ce uniquement dû aux pathogènes parodontaux ou existe-t-il d'autres bactéries spécifiques de l'halitose ? Le brossage de la langue réduit-il la quantité de bactéries retrouvées au sein de la flore linguale ou s'avère-t-il peu efficace ?

Autant de questions auxquelles nous avons tenté de répondre dans cette étude, en recherchant la présence de bactéries potentiellement responsables des maladies parodontales et de l'halitose au sein de la flore linguale de deux groupes, l'un comprenant des sujets sains, l'autre des patients atteints de maladie parodontale.

II.2. Matériel et méthodes

II.2.1. Critères d'exclusion et d'inclusion

Les sujets ayant utilisé des bains de bouche antiseptiques durant la semaine précédant le prélèvement, ainsi que ceux ayant pris des antibiotiques durant le mois précédent, ont été exclus de l'étude. Les patients porteurs de prothèses amovibles totales ou partielles, ainsi que ceux atteints de pathologies générales connues pour jouer un rôle dans l'apparition de l'halitose (telles que le diabète ou l'insuffisance rénale) ont également été exclus.

Dans ces conditions, les patients atteints d'une maladie parodontale quelle qu'elle soit ont été inclus dans l'étude, de même que les sujets témoins.

II.2.2. Les prélèvements

Nous avons réalisé des prélèvements sur la langue de 20 patients atteints de maladie parodontale, et de 20 sujets témoins.

Au préalable, une fiche de consentement explicative a systématiquement été lue et signée par le sujet et l'investigateur. (Annexe 1)

L'investigateur s'assurait de la bonne compréhension du protocole de prélèvement par le sujet et répondait aux éventuelles questions.

Enfin, un questionnaire était complété par l'investigateur (Annexe 2). Concernant le type de parodontite, le diagnostic a systématiquement été posé par le praticien chez qui les prélèvements ont été effectués. La présence de plaque et de tartre a été observée sur toutes les dents, et a été notée positive pour au moins une dent concernée par arcade. Le brossage des dents et de la langue a été pris en compte uniquement à partir de un brossage par jour. La présence d'une cavité carieuse visible a été considérée comme une carie active. L'halitose a été prise en compte lorsque le patient déclarait souffrir de mauvaise haleine et/ou lorsqu'elle était ressentie par l'investigateur qui réalisait les prélèvements.

II.2.2.1. Matériel de prélèvement

Pour chacun des prélèvements, nous avons utilisé un set d'examen, un flacon stérile contenant 5 ml de sérum physiologique, une brosse à dents INAVA 15/100^{ème}.

II.2.2.2. Protocole de prélèvement

Les prélèvements sur les patients malades ont été réalisés au sein du CHU Pellegrin, ainsi qu'au sein d'un cabinet ayant une activité de parodontologie exclusive.

Les prélèvements sur les sujets sains ont été réalisés au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté d'odontologie.

Afin d'éviter autant que possible les biais, les prélèvements ont été réalisés par la même personne, et le même protocole a été suivi rigoureusement pour chacun des prélèvements :

- La brosse à dents était stérilisée : une minute à 600 Watts au micro-ondes dans un verre d'eau ; (36)
- Le patient était invité à avaler sa salive et à tirer la langue ;
- A l'aide de la brosse à dents, la face dorsale de la langue était grattée délicatement, en prenant garde de ne toucher aucun autre élément de la cavité buccale. Des mouvements d'avant en arrière et de gauche à droite étaient réalisés, pendant au moins 10 secondes (et au plus 15 secondes). La partie postérieure de la langue était atteinte autant que possible ;

- La brosse à dents était ensuite immergée dans les 5ml de sérum physiologique stérile, dans un premier temps sans toucher les parois, puis en frottant les parois ;

Le prélèvement était ensuite transporté au laboratoire afin d'être mis en culture dans les plus brefs délais.

II.2.3. Mise en culture



Figure 1 - Mise en place de l'échantillon dans le spectrophotomètre et lecture de la densité optique

(Crédit photo : A.Mailharrin)

Après mesure de la densité optique (DO_{550nm}) de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre, des dilutions à 10^{-2} et 10^{-4} sont mises en culture.

II.2.3.1. Géloses utilisées

Dans ce travail, seuls les pathogènes parodontaux nous intéressaient. Par conséquent, nous avons utilisé des géloses FAA (Fastidious Anaerobe Agar), qui permettent uniquement aux bactéries anaérobies à Gram négatif de se développer telles que *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Campylobacter rectus*...

Nous avons également utilisé des GS (Gélose au Sang), peu sélectives, favorisant essentiellement la croissance des bactéries à Gram positif, telles que *Peptostreptococcus* ou *Actinomyces*, susceptibles de nous intéresser.

II.2.3.2. Protocole

Après passage au vortex, on prend 50 μ l de la solution à 10^{-2} que l'on déposera au centre de la gélose FAA. On étalera grâce à la technique en râteau : une pipette pasteur est passée à la flamme et transformée en râteau, qui nous servira à étaler la goutte centrale de manière uniforme sur toute la surface de la gélose.



Figure 2 - Dépôt de 50µl au centre de la gélose FAA et étalement en râteau
(Crédit photo : A.Mailharrin)

Nous ferons de même sur la gélose au sang.

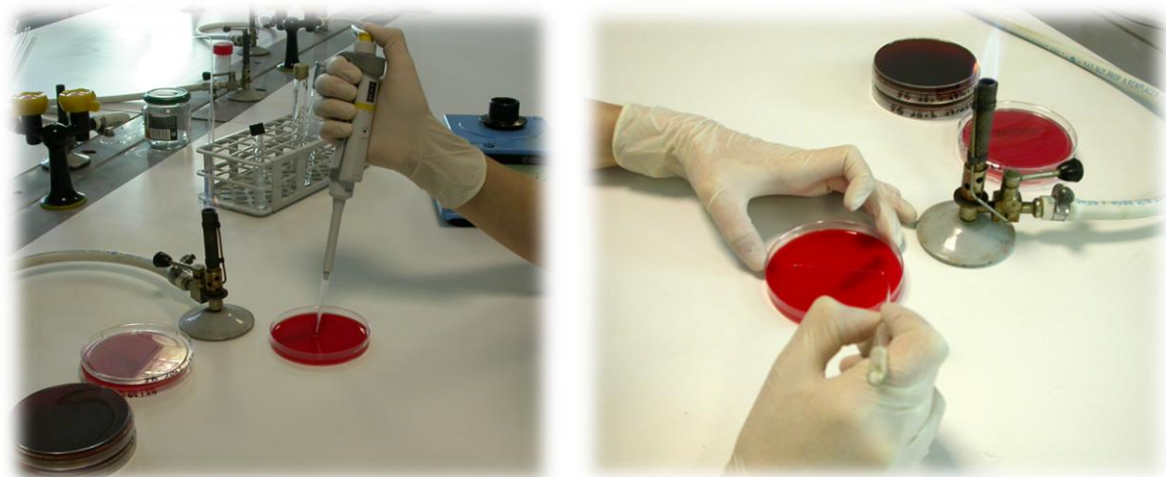


Figure 3 - Dépôt de 50µl au centre de la gélose au sang et étalement en râteau
(Crédit photo : A.Mailharrin)

Nous suivrons exactement le même protocole pour la suspension diluée à 10^{-4} : après passage au vortex, on prend 50µl de la solution à 10^{-4} que l'on déposera au centre de la gélose FAA. On étalera grâce à la technique en râteau.

Nous ferons de même sur la gélose au sang.

II.2.3.3. Mise en anaérobiose

Les 4 géloses sont ensuite placées en anaérobiose (Anaerogen, Oxoid, France) à 37°C durant 2 jours.



Figure 4 - Géloses en anaérobiose
(Crédit photo : A.Mailharrin)

II.2.4. Analyse des cultures

II.2.4.1. Observation

On observe chacune des géloses. On élimine celles qui ne sont pas exploitables : colonies trop serrées et donc non prélevables, ou au contraire celles sur lesquelles rien n'a poussé.

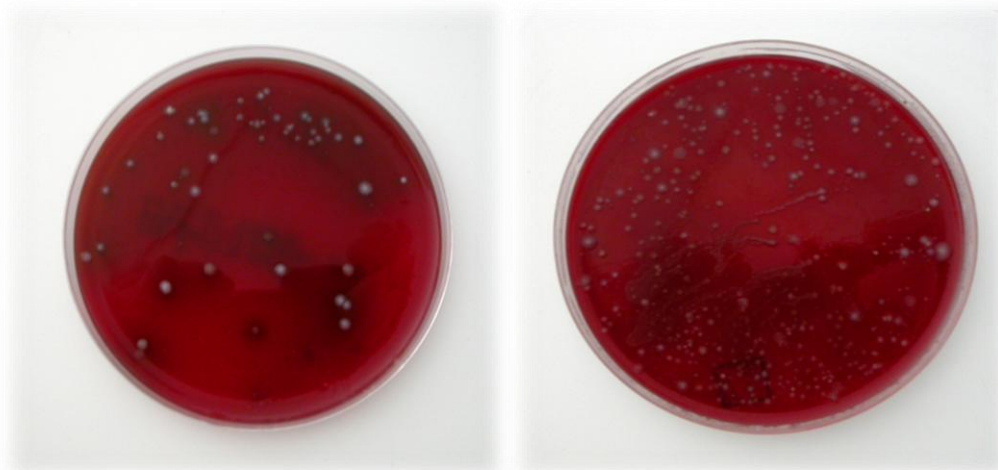


Figure 5 - Après mise en anaérobiose a 37°C, observation d'une gélose au sang à gauche, et d'une gélose fastidious anaerobe agar à droite (dilutions à 10⁻⁴ et 10⁻² respectivement)
(Crédit photo : A.Mailharrin)

II.2.4.2. Comptage

Chacune des colonies visibles à la surface de la gélose est comptabilisée. On rapporte en UFC/ml (Unité Formant Colonie) grâce à la formule suivante : nombre de colonies x le facteur de dilution x 20.

Lorsque les colonies sont très nombreuses, et donc difficiles à compter, on dessine un carré de 1cm par 1cm, on compte les colonies qui se situent à l'intérieur de ce carré, puis on rapporte en UFC/ml grâce à la formule suivante : nombre de colonies x le facteur de dilution x 20 x 55,3896.

II.2.4.3. Description des colonies

Chaque colonie différente est observée et décrite : couleur, diamètre, aspect, forme, hémolyse ...

Chaque colonie différente est mise en suspension dans 500µl d'eau distillée stérile.

II.2.5. Coloration de Gram et observation au microscope optique

Cette coloration de Gram a pour but de déterminer le Gram de la bactérie, mais également sa morphologie.

La préparation doit être pure : aussi, si après la coloration de Gram, on observe un mélange de deux types de bactéries (cocci et bacilles, ou bacilles et filaments ...), un réisolement est effectué sur une gélose FAA, que l'on remet en anaérobiose à 37°C, en suivant exactement le même protocole que celui décrit précédemment. Les géloses seront ensuite analysées, et chaque colonie différente prélevée et colorée.

II.2.6. Mise en culture en milieu liquide

Les bactéries à Gram négatif sont mises en culture en milieu liquide dans du WCA (Wilkins et Chalgren Anaerobe), milieu de culture favorable à la croissance des bactéries anaérobies.

Certaines bactéries à Gram positif sont également conservées, et mise en culture dans le même milieu liquide, notamment les cocci à Gram positif (possibles *Peptostreptococcus*), et les bacilles à Gram positif (possibles *Actinomyces*).

Les tubes à essai sont placés à l'étuve à 37°C pendant deux jours minimum. A l'issue de cette période, on observe si la culture est suffisamment riche. Si tel est le cas, elle est congelée (à -80°C, après ajout de glycérol), pour procéder à l'identification dans un second temps.

II.2.7. Identification

II.2.7.1. Par les méthodes biochimiques : les galeries API

II.2.7.1.1 Décongélation et mise en culture

Les souches bactériennes sont décongelées dans un premier temps puis remises en culture en milieu liquide dans du WCA. Les bouillons seront placés durant 48h à l'étuve.

Lorsque la culture est suffisamment riche, on prélève le culot à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée, et l'on dépose quelques gouttes au centre de deux géloses au sang, que l'on étalera grâce à la technique en râteau décrite précédemment. Les géloses seront ensuite placées en anaérobiose à 37°C pendant 48h.

II.2.7.1.2. Réalisation des galeries API 20A

Ce sont des galeries spécifiques des bactéries anaérobies.

On récupère grâce à un écouvillon les bactéries sur les géloses au sang, que l'on disperse dans une ampoule contenant une solution fournie avec le kit de galeries, de manière à obtenir une suspension trouble, riche en bactéries.

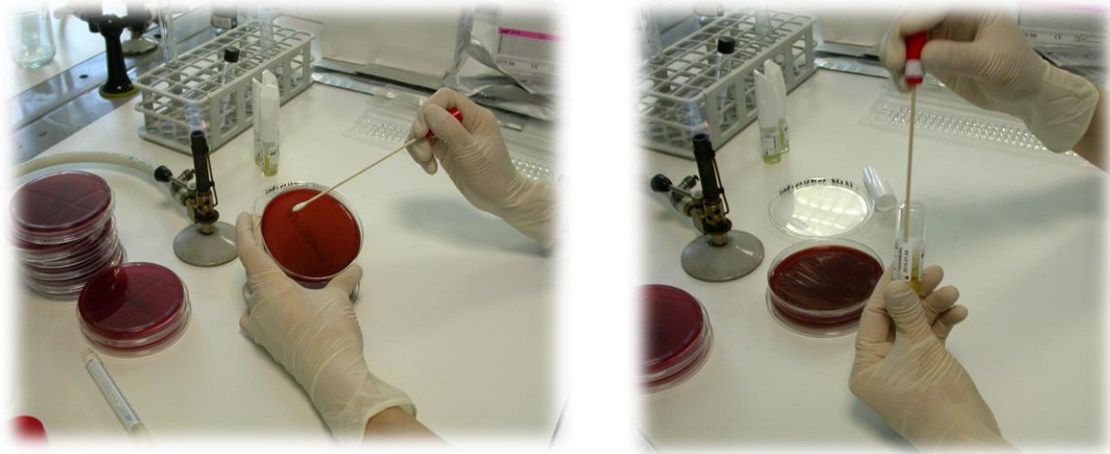


Figure 6 - Recueil des colonies présentes à la surface de la gélose grâce à un écouvillon puis dispersion dans l'ampoule
(Crédit photo : A.Mailharrin)

A l'aide de la pipette pasteur, on remplit ensuite les microtubes de chaque galerie. On rajoute 3 gouttes de paraffine dans le microtube contenant l'indole. Le seul microtube complètement rempli est celui contenant la gélatinase.



Figure 7 - Microtubes remplis à l'aide de la pipette pasteur
(Crédit photo : A.Mailharrin)

Les galeries sont ensuite placées 24h en anaérobiose à 37°C.

II.2.7.1.3. Lecture des galeries

La lecture des galeries se fait selon les indications du fabricant, certaines réactions nécessitant l'ajout de réactifs (xylène puis réactif d'ehrich dans le microtube contenant l'indole), l'observation de la migration des pigments (dans le microtube contenant la gélatinase) ou de la fluorescence sous rayonnement ultraviolet (du microtube contenant l'esculine).

Dans le microtube contenant l'urée, une couleur jaune/orangée signe un résultat négatif, une couleur rouge un résultat positif.

Pour tous les microtubes contenant différents sucres (glucose, mannitol, lactose, saccharose, maltose, xylose, arabinose, glycérol, cellobiose, mannose, mélézitose, raffinose, sorbitol, rhamnose, tréhalose), une couleur jaune signe un résultat positif, une couleur violette un résultat négatif. Quand il est difficile de trancher et que la couleur n'est pas franchement jaune ni violette, on peut rajouter une goutte de BCP (Pourpre de Bromocrésol).

On réalise le test de la catalase dans un microtube contenant un des sucres : on y dépose une goutte de H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). Le résultat est positif si l'on observe une réaction. Dans le cas contraire, il s'agit d'un résultat négatif.

A l'issue de tous ces tests, on obtient une succession de résultats positifs et négatifs pour chaque souche analysée : il s'agit du profil biochimique de la bactérie, que l'on va comparer à des profils types afin de l'identifier.



Figure 8 - Profil biochimique d'un *Fusobacterium nucleatum*
(Crédit photo : A.Mailharrin)

II.2.7.2. Par les méthodes de biologie moléculaire : PCR (Polymerase Chain Reaction)

Il arrive parfois que le profil obtenu ne corresponde à aucun des profils proposés. Dans ce cas là, nous avons refait la galerie API 20A pour éviter une possible erreur de manipulation. Lorsque l'identification restait malgré tout impossible, et/ou que le profil biochimique était douteux, nous avons utilisé la biologie moléculaire.

II.2.7.2.1. Extraction d'ADN

Dans un premier temps, la souche à identifier est décongelée, et mise en culture dans du bouillon WCA, que nous laisserons à l'étuve à 37°C toute la nuit.

Puis nous procéderons à l'extraction d'ADN en suivant un protocole différent pour les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. (GenElute™, Bacterial Genomic, DNA Kit).

II.2.7.2.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN par électrophorèse

La présence de smear signe une dégradation de l'ADN, et donc une mauvaise qualité de ce dernier.

II.2.7.2.3. Préparation du mix

La quantité nécessaire correspondant au nombre d'échantillons est préparé. Il ne faut pas oublier d'intégrer un témoin positif (souche de référence ATCC ou American Type Cell Culture), ainsi qu'un témoin négatif (ou l'ADN bactérien est remplacé par de l'eau milliQ ; ce témoin négatif permet de vérifier l'absence de contamination).

Le mix est bien mélangé, puis 48µL de ce mix sont déposés dans chacun des tubes stériles.

2µL d'ADN de chaque échantillon sont rajoutés dans chacun des tubes (excepté pour le témoin négatif), ainsi que 25µL d'huile minérale afin d'éviter l'évaporation lors de la PCR.

Le mix pour un échantillon est le suivant :

ACTINOMYCES NAESLUNDI, (37)

- Tampon 10x = 5µl
- dNTP = 1µL
- Amorce ANF (10µM/L) = 2,5µL
- Amorce ANR (10µM/L) = 2,5µL
- Taq = 0,25µL
- Eau milliQ = 36,75µL

TANNERELLA FORSYTHIA, (38)

- Tampon 10x = 5µL
- dNTP = 1µL
- Amorce TFF (10µM/L) = 1,5µL
- Amorce TFR (10µM/L) = 1,5µL
- MgCl₂ = 6µL
- Taq = 0,25µL
- Eau milliQ = 32,75µL

FUSOBACTERIUM NUCLEATUM, (39)

- Tampon 10x = 5µL
- dNTP = 1µL
- Amorce FADA1 (100µM/L) = 2,5µL
- Amorce FADA2 (100µM/L) = 2,5µL
- Taq = 0,25µL
- Eau milliQ = 36,75µL

AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMMITANS, (40)

- Tampon 10x = 5µL
- dNTP = 1µL
- Amorce FU1 (10µM/L) = 2,5µL
- Amorce FU2 (10µM/L) = 2,5µL
- Taq = 0,25µL
- Eau milliQ = 36,75µL

Tous les réactifs utilisés proviennent du kit Qiagen. Le nombre d'unités de Taq par µl est de 2,5U/µl. La concentration de MgCl₂ dans le tampon est de 1,5mM. La concentration initiale de dNTP est de 10mM de chaque.

II.2.7.2.4. PCR

Chaque espèce bactérienne est soumise à un programme spécifique dans le thermocycler (MJ Research).

	Etape 1 - Dénaturation initiale/prédénaturation	Etape 2 - Dénaturation	Etape 3 - Hybridation	Etape 4 - Elongation	Etape 5 - Elongation finale	Etape 6 - Conservation	Nombre de cycles
AN (37)	94°C - 5 minutes	94°C - 1 minute	57°C - 1 minute	72°C - 1 minute	72°C - 10 minutes	4°C - à l'infini	35
TF	94°C - 3 minutes	94°C - 1 minute	60°C - 1 minute	72°C - 1 minute	72°C - 10 minutes	4°C - à l'infini	35
FN (39)	94°C - 4 minutes	94°C - 30 secondes	55,8°C - 30 secondes	72°C - 40 secondes	72°C - 6 minutes	4°C - à l'infini	30
AA (40)	94°C - 5 minutes	94°C - 1 minute	55°C - 1 minute	72°C - 30 secondes	72°C - 5 minutes	4°C - à l'infini	30

Cycle

Tableau 1 - Conditions utilisées pour la PCR d'*Actinomyces naeslundii* (AN), *Tannerella forsythia* (TF), *Fusobacterium nucleatum* (FN) et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA)

Pour Tannerella forsythia, le programme utilisé est celui correspondant à la Taq Polymerase (kit Qiagen).

II.2.7.2.4. Electrophorèse

A la fin du programme, les tubes sont récupérés et placés dans de la glace. Nous réalisons ensuite l'électrophorèse sur gel d'agarose (10%) après ajout de bromure d'éthidium. La migration a lieu pendant une heure sous un voltage de 150V.

A l'issue de cette électrophorèse, le gel est observé sous un rayonnement ultraviolet :

- ⇒ Un amplicon de 988 paires de bases confirme que l'échantillon est un *Actinomyces naeslundii*. (37) (Figure 15)
- ⇒ Pour *Tannerella forsythia*, la taille attendue de l'amplicon est de 127 paires de bases. (41)
- ⇒ Un amplicon de 232 paires de bases confirme que l'échantillon est un *Fusobacterium nucleatum*. (39)
- ⇒ Un amplicon de 500 paires de bases confirme que l'échantillon est un *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. (40)

II.2.7.3. Par les méthodes de biologie moléculaire : le séquençage

Le séquençage permet de déterminer l'enchaînement des bases de l'ADN. Cette technique comporte en effet dans le milieu réactionnel, en plus des amorces, des nucléotides, de l'ADN à séquencer et de l'ADN polymérase, des didésoxyribonucléotides, ayant la particularité de stopper la synthèse de l'ADN, chacun étant marqué par un fluorochrome différent. Aussi, l'ADN polymérase utilise de manière aléatoire les nucléotides pour synthétiser un brin complémentaire à l'ADN matrice, et lorsqu'elle tombe sur un didésoxyribonucléotide, la synthèse s'arrête prématurément. Puisqu'un grand nombre de réactions a lieu dans le tube, il existe statistiquement des chaînes de toutes les tailles, correspondant à un arrêt de la synthèse à chaque nucléotide. On fait alors migrer les différents fragments obtenus et on obtient une succession de bandes colorées, chacune correspondant au dernier nucléotide incorporé. Il suffit alors de lire la succession des couleurs pour connaître la séquence de l'ADN, étape assurée par les photorécepteurs. L'analyse de la séquence nucléotidique obtenue a été réalisée à l'aide du logiciel BLAST.

II.2.8. Analyse statistique

Le t-test, ou test de Student nous a permis de réaliser la comparaison des moyennes pour le nombre de colonies retrouvées sur les différents milieux de culture, entre les différents groupes étudiés (malades vs témoins ; halitose vs non halitose ; brossage lingual vs absence de brossage lingual).

Les données ont été analysées grâce au logiciel GraphPad, et présentées sous forme de moyenne \pm écart type.

L'hypothèse nulle H_0 n'est pas rejetée si $p > 0,05$. Dans le cas contraire ($p < 0,05$), H_0 est rejetée, le test est significatif.

III. RESULTATS

III.1. Description de la population

	Age	Sexe	Plaque	Tartre	Brossage dentaire	Brossage lingual	Caries actives	Obturations	Halitose	Type de parodontite
Sujet 1	28	F	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Chronique
Sujet 2	55	F	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non	Chronique
Sujet 3	60	F	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Chronique récidivante
Sujet 4	32	F	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Chronique
Sujet 5	65	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Chronique
Sujet 6	48	M	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Oui	Chronique
Sujet 7	58	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Chronique
Sujet 8	49	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Chronique stabilisée
Sujet 9	45	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Chronique persistante
Sujet 10	47	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Agressive
Sujet 11	51	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Chronique stabilisée
Sujet 12	52	F	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Agressive récidivante
Sujet 13	67	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non	Chronique
Sujet 14	54	M	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui	Agressive
Sujet 15	54	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Non	Chronique
Sujet 16	38	M	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Non	Chronique
Sujet 17	58	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non	Agressive stabilisée
Sujet 18	67	M	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non	Chronique
Sujet 19	66	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non	Chronique
Sujet 20	47	F	Oui	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui	Chronique

Tableau 2 - Description du groupe de malades

La présence de plaque/tartre a été observée sur toutes les dents. Le brossage dentaire/lingual a été pris en compte à partir de un brossage par jour. La présence d'une cavité carieuse visible a été considérée comme une carie active. Le diagnostic du type de parodontite rencontré a été systématiquement effectué par le praticien traitant. L'halitose a été prise en compte lorsque le patient déclarait souffrir de mauvaise haleine et/ou lorsqu'elle était ressentie par l'investigateur qui réalisait les prélèvements.

Le groupe de malades, composé de 16 femmes (80% des sujets) et de 4 hommes (20%) atteints de maladie parodontale, avait un âge moyen de 52 ans. L'examen clinique visuel endo buccal a mis en évidence la présence de plaque chez 6 patients (soit 30%), la présence de tartre chez 11 patients (soit 55%), la présence de caries actives chez 1 patient (soit 5%), et la présence d'obturations chez 16 patients (soit 80%). L'ensemble du groupe se brossait les dents quotidiennement. En revanche, seulement 6 patients (soit 30%) pratiquaient le brossage lingual quotidiennement.

9 patients (soit 45%) souffraient d'halitose. Concernant le type de parodontite, 16 patients (soit 80%) étaient atteints d'une parodontite chronique (stabilisée, persistante, récidivante ou active) et 4 patients (soit 20%) étaient atteints d'une parodontite agressive (récidivante, stabilisée ou active).

	Age	Sexe	Plaque	Tartre	Brossage des dents	Brossage lingual	Caries actives	Obturations	Halitose
Sujet 21	25	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Sujet 22	25	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Non	Non
Sujet 23	55	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Sujet 24	32	M	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
Sujet 25	27	F	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui
Sujet 26	56	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Sujet 27	58	F	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sujet 28	56	F	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sujet 29	49	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Sujet 30	55	F	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Non	Non
Sujet 31	49	F	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
Sujet 32	50	M	Non	Oui	Oui	Oui	Non	Oui	Oui
Sujet 33	56	F	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui	Oui
Sujet 34	49	M	Non	Oui	Oui	Non	Non	Non	Non
Sujet 35	50	M	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Sujet 36	54	M	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Sujet 37	53	F	Non	Non	Oui	Non	Non	Oui	Non
Sujet 38	53	F	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Sujet 39	48	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Sujet 40	55	F	Non	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui

Tableau 3 - Description du groupe de témoins

La présence de plaque/tartre a été observée sur toutes les dents. Le brossage dentaire/lingual a été pris en compte à partir de un brossage par jour. La présence d'une cavité carieuse visible a été considérée comme une carie active. L'halitose a été prise en compte lorsque le sujet déclarait souffrir de mauvaise haleine et/ou lorsqu'elle était ressentie par l'investigateur qui réalisait les prélèvements.

Le groupe de témoins, composé de 15 femmes (75% des sujets) et de 5 hommes (25%) non atteints de maladie parodontale, avait un âge moyen de 48 ans. L'examen clinique visuel endo buccal a mis en évidence l'absence de plaque pour l'ensemble des sujets, la présence de tartre chez 7 sujets (soit 35%), la présence de caries actives chez 2 sujets (soit 10%) et la présence d'obturations chez 16 sujets (soit 80%). L'ensemble du groupe se brossait les dents quotidiennement. En revanche, seulement 8 sujets (soit 40%) pratiquaient le brossage lingual quotidiennement. 9 sujets (soit 45%) souffraient d'halitose.

III.2. Analyse quantitative du nombre de bactéries présentes au sein de la flore linguale des différents groupes

III.2.1. Synthèse des données

	Sujet atteint de maladie parodontale	Nombre de colonies retrouvées sur GS	Nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA	Nombre total de colonies (GS+FAA)
Sujet 1	Oui	8,19	7,20	8,24
Sujet 2	Oui	8,10	7,83	8,29
Sujet 3	Oui	7,91	6,48	7,93
Sujet 4	Oui	7,76	7,15	7,86
Sujet 5	Oui	7,76	7,15	7,86
Sujet 6	Oui	7,85	7,74	7,88
Sujet 7	Oui	8,83	7,38	8,85
Sujet 8	Oui	8,21	7,48	8,29
Sujet 9	Oui	8,55	7,34	8,57
Sujet 10	Oui	7,66	5,68	7,67
Sujet 11	Oui	8,32	5,79	8,32
Sujet 12	Oui	8,00	7,56	8,13
Sujet 13	Oui	8,43	7,48	8,47
Sujet 14	Oui	7,78	6,30	7,79
Sujet 15	Oui	8,01	6,51	8,02
Sujet 16	Oui	7,79	6,53	7,82
Sujet 17	Oui	8,52	7,30	8,54
Sujet 18	Oui	7,60	7,60	8,67
Sujet 19	Oui	N/A	7,20	7,45
Sujet 20	Oui	8,26	5,00	8,27
Sujet 21	Non	8,15	7,66	8,27
Sujet 22	Non	8,03	7,48	8,13
Sujet 23	Non	6,66	5,08	6,67
Sujet 24	Non	7,90	7,45	8,03
Sujet 25	Non	7,96	7,08	8,02
Sujet 26	Non	8,61	8,19	8,75
Sujet 27	Non	7,89	7,97	8,24
Sujet 28	Non	8,55	5,97	8,55
Sujet 29	Non	8,29	6,65	8,30
Sujet 30	Non	7,26	8,33	8,37
Sujet 31	Non	8,20	7,30	8,25
Sujet 32	Non	8,70	7,86	8,75
Sujet 33	Non	7,53	6,81	7,61
Sujet 34	Non	8,67	7,86	8,74
Sujet 35	Non	8,09	7,26	8,15
Sujet 36	Non	8,78	5,68	8,78
Sujet 37	Non	8,00	6,07	8,15
Sujet 38	Non	8,28	7,30	8,33
Sujet 39	Non	8,49	6,19	8,50
Sujet 40	Non	8,85	5,76	8,85

Tableau 4 - Nombre de colonies retrouvées sur les différents milieux de culture (exprimé en log UFC/ml) au sein de la flore linguale des patients atteints de maladie parodontale, et des sujets témoins

N/A : non applicable.

	Sujet concerné par l'halitose	Nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA	Nombre total de colonies (GS+FAA)
Sujet 1	Oui	7,20	8,24
Sujet 3	Oui	6,48	7,93
Sujet 4	Oui	7,15	7,86
Sujet 6	Oui	7,74	7,88
Sujet 8	Oui	7,48	8,29
Sujet 11	Oui	5,79	8,32
Sujet 12	Oui	7,56	8,13
Sujet 14	Oui	6,30	7,79
Sujet 20	Oui	5,00	8,27
Sujet 23	Oui	5,08	6,67
Sujet 24	Oui	7,45	8,03
Sujet 25	Oui	7,08	8,02
Sujet 26	Oui	8,19	8,75
Sujet 31	Oui	7,30	8,25
Sujet 32	Oui	7,86	8,75
Sujet 33	Oui	6,81	7,61
Sujet 39	Oui	6,19	8,50
Sujet 40	Oui	5,76	8,85
Sujet 2	Non	7,83	8,29
Sujet 5	Non	7,15	7,86
Sujet 7	Non	7,38	8,85
Sujet 9	Non	7,34	8,57
Sujet 10	Non	5,68	7,67
Sujet 13	Non	7,48	8,47
Sujet 15	Non	6,51	8,02
Sujet 16	Non	6,53	7,82
Sujet 17	Non	7,30	8,54
Sujet 18	Non	7,60	8,67
Sujet 19	Non	7,20	7,45
Sujet 21	Non	7,66	8,27
Sujet 22	Non	7,48	8,13
Sujet 27	Non	7,97	8,24
Sujet 28	Non	5,97	8,55
Sujet 29	Non	6,65	8,30
Sujet 30	Non	8,33	8,37
Sujet 34	Non	7,86	8,74
Sujet 35	Non	7,26	8,15
Sujet 36	Non	5,68	8,78
Sujet 37	Non	6,07	8,15
Sujet 38	Non	7,30	8,33

Tableau 5 – Nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA et sur GS + FAA (exprimé en log UFC/ml) au sein de la flore linguale des sujets concernés par l'halitose, et des sujets non concernés

	Pratique du brossage lingual	Nombre total de colonies (GS+FAA)
Sujet 1	Oui	8,24
Sujet 3	Oui	7,93
Sujet 4	Oui	7,86
Sujet 12	Oui	8,13
Sujet 16	Oui	7,82
Sujet 20	Oui	8,27
Sujet 24	Oui	8,03
Sujet 25	Oui	8,02
Sujet 27	Oui	8,24
Sujet 28	Oui	8,55
Sujet 30	Oui	8,37
Sujet 31	Oui	8,25
Sujet 32	Oui	8,75
Sujet 38	Oui	8,33
Sujet 2	Non	8,29
Sujet 5	Non	7,86
Sujet 6	Non	7,88
Sujet 7	Non	8,85
Sujet 8	Non	8,29
Sujet 9	Non	8,57
Sujet 10	Non	7,67
Sujet 11	Non	8,32
Sujet 13	Non	8,47
Sujet 14	Non	7,79
Sujet 15	Non	8,02
Sujet 17	Non	8,54
Sujet 18	Non	8,67
Sujet 19	Non	7,45
Sujet 21	Non	8,27
Sujet 22	Non	8,13
Sujet 23	Non	6,67
Sujet 26	Non	8,75
Sujet 29	Non	8,30
Sujet 33	Non	7,61
Sujet 34	Non	8,74
Sujet 35	Non	8,15
Sujet 36	Non	8,78
Sujet 37	Non	8,15
Sujet 39	Non	8,50
Sujet 40	Non	8,85

Tableau 6 - Nombre total de colonies retrouvées sur GS + FAA (exprimé en log UFC/ml) au sein de la flore linguale des sujets pratiquant le brossage lingual, et des sujets ne le pratiquant pas

III.2.2. Analyse statistique

L'observation des données précédentes nous amène à nous poser les six questions suivantes :

- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur GS entre le groupe de patients malades (atteints de maladie parodontale) et le groupe de sujets témoins ?
- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA entre le groupe de patients malades et le groupe de sujets témoins ?
- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de patients malades et le groupe de sujets témoins ?
- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA entre le groupe de sujets concernés par l'halitose et le groupe de sujets non concernés ?
- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de sujets concernés par l'halitose, et le groupe de sujets non concernés ?
- Au sein de la flore linguale, existe-t-il une différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de sujets qui pratiquent le brossage lingual, et le groupe de sujets qui ne le pratiquent pas ?

Nous avons obtenu les résultats suivants :

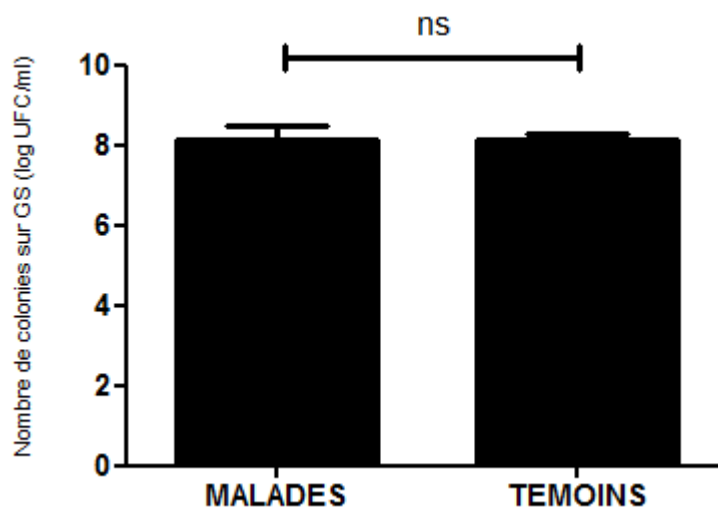


Figure 9 – Relation entre l'état parodontal et le nombre de colonies retrouvées sur gélose au sang

- ⇒ L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur gélose au sang entre le groupe de patients malades, et le groupe de sujets témoins.

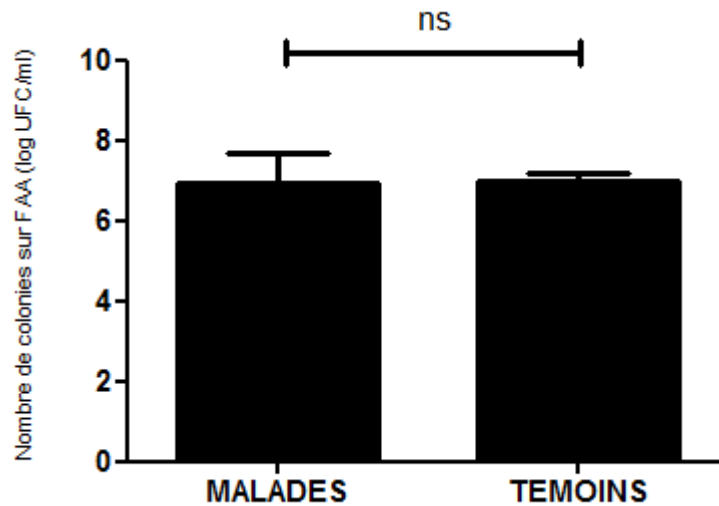


Figure 10 – Relation entre l'état parodontal et le nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA

⇒ L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA entre le groupe de patients malades, et le groupe de sujets témoins. Il ne semble pas y avoir de relation significative entre l'état parodontal et le nombre de bactéries anaérobies à Gram négatif retrouvées à la surface linguale.

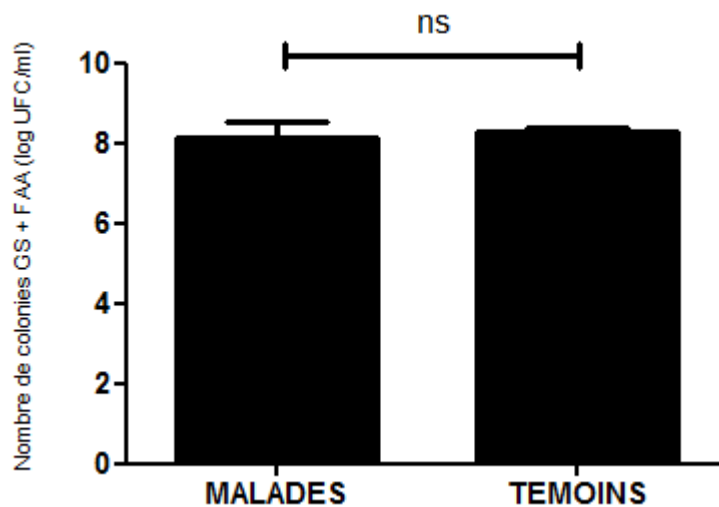


Figure 11 – Relation entre l'état parodontal et le nombre total de colonies

⇒ L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de patients malades, et le groupe de sujets témoins. Il ne semble pas y avoir de relation significative entre l'état parodontal et le nombre total de bactéries retrouvées à la surface linguale.

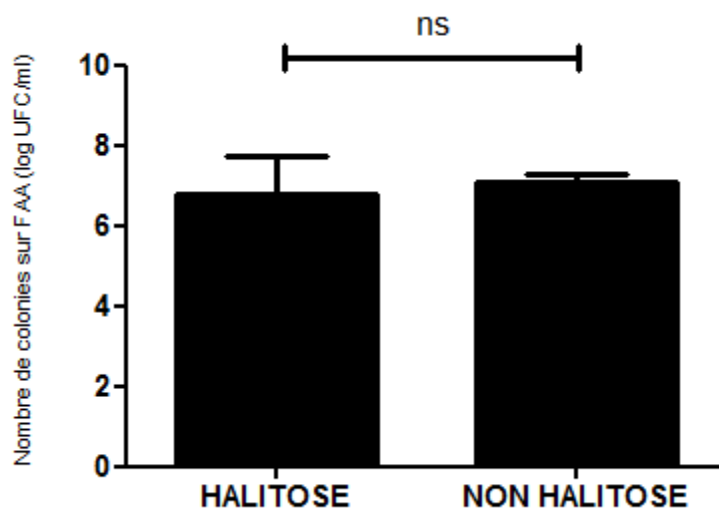


Figure 12 – Relation entre l’halitose et le nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA

⇒ L’analyse statistique montre qu’il n’existe pas de différence significative en matière de nombre de colonies retrouvées sur gélose FAA entre le groupe de sujets concernés par l’halitose, et le groupe de sujets non concernés. Il ne semble pas y avoir de relation significative entre l’halitose et le nombre de bactéries anaérobies à Gram négatif retrouvées à la surface linguale.

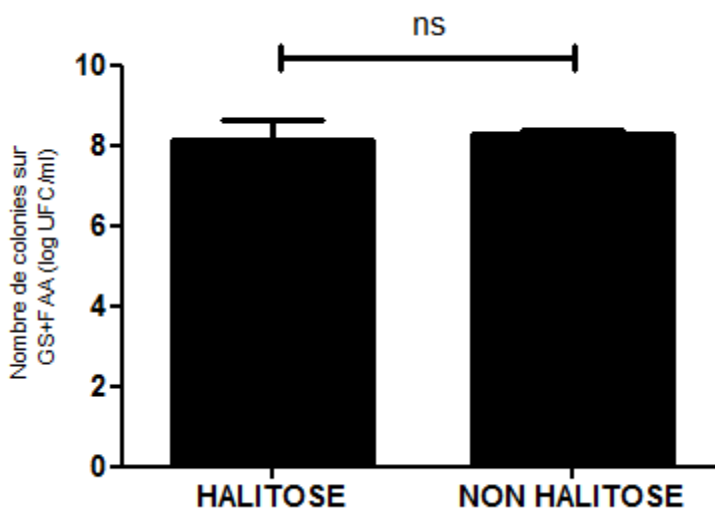


Figure 13 – Relation entre l’halitose et le nombre total de colonies

⇒ L’analyse statistique montre qu’il n’existe pas de différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de sujets concernés par l’halitose, et le groupe de sujets non concernés. Il ne semble pas y avoir de relation significative entre l’halitose et le nombre total de bactéries retrouvées à la surface linguale.

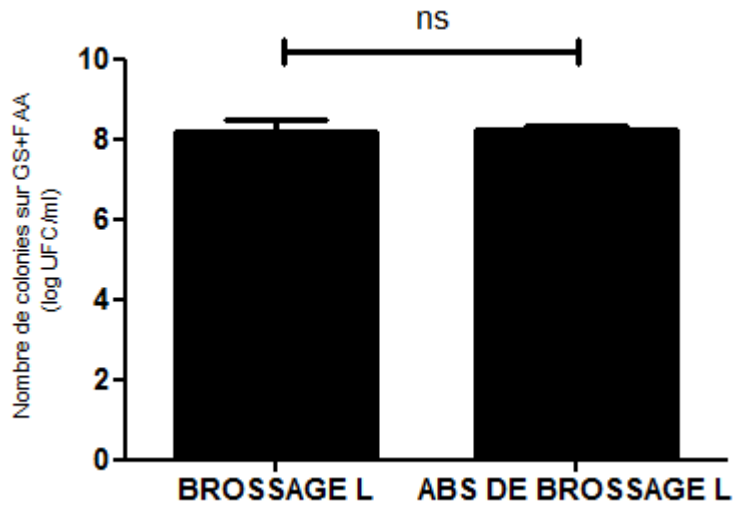


Figure 14 – Relation entre la pratique du brossage lingual et le nombre total de colonies

⇒ L'analyse statistique montre qu'il n'existe pas de différence significative en matière de nombre total de colonies retrouvées sur GS+FAA entre le groupe de sujets pratiquant le brossage lingual, et le groupe de sujets ne le pratiquant pas. Il ne semble pas y avoir de relation significative entre la pratique du brossage lingual et le nombre total de bactéries retrouvées à la surface linguale.

III.3. Analyse qualitative des espèces bactériennes retrouvées au sein de la flore linguale des différents groupes

III.3.1. Résultats des identifications par les méthodes biochimiques : les galeries API

Les profils biochimiques obtenus sur 142 souches bactériennes ont permis de différencier 21 espèces, notamment *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces meyeri*, *Actinomyces viscosus 1*, *Actinomyces viscosus 2*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus constellatus*, *Gemella morbillorum*, *Veillonella parvula*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Propionipropionicum avidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces israelii*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ureolyticus*, *Bacteroides uniformis*.

Pour certaines de ces espèces, l'identification a été confirmée ou infirmée par les techniques de PCR et/ou de séquençage.

III.3.2. Résultats des identifications par les méthodes de biologie moléculaire : PCR et séquençage

38 souches présumées *Actinomyces naeslundii* ont effectivement été confirmées par PCR.

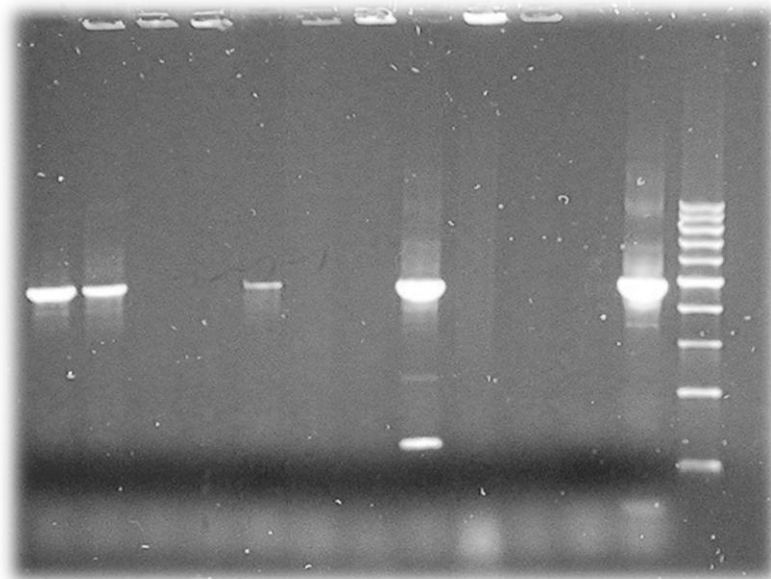


Figure 15 - Gel obtenu à l'issue de la PCR et de l'électrophorèse des échantillons présumés *Actinomyces naeslundii*

Les échantillons positifs se situent dans les puits 1,2, 5 et 8. Le témoin positif a été placé dans le puit 12. Le témoin négatif se situe dans le puit 11.

(Crédit photo : A.Mailharrin).

3 souches présumées *Fusobacterium nucleatum* ont effectivement été confirmées par PCR. Les 3 souches ont été séquencées, ce qui nous a permis de valider nos identifications.

Nous avons testé des souches (bacilles à Gram négatif) non identifiables par galerie API avec différents primers ; l'amplification avec les primers de *Tannerella forsythia* a donné un amplicon

différent de celui décrit dans la littérature. Nous avons donc décidé de séquencer cet amplicon, ce qui a mis en évidence que notre souche pouvait être soit une espèce d'*Abiotrophia*, soit une espèce de *Granulicatella*.

L'amplification avec les primers d'*Aggregatibacter actinomycetemcommitans* a donné deux amplicons en adéquation avec ceux décrits dans la littérature.

III.3.3. Synthèse des données

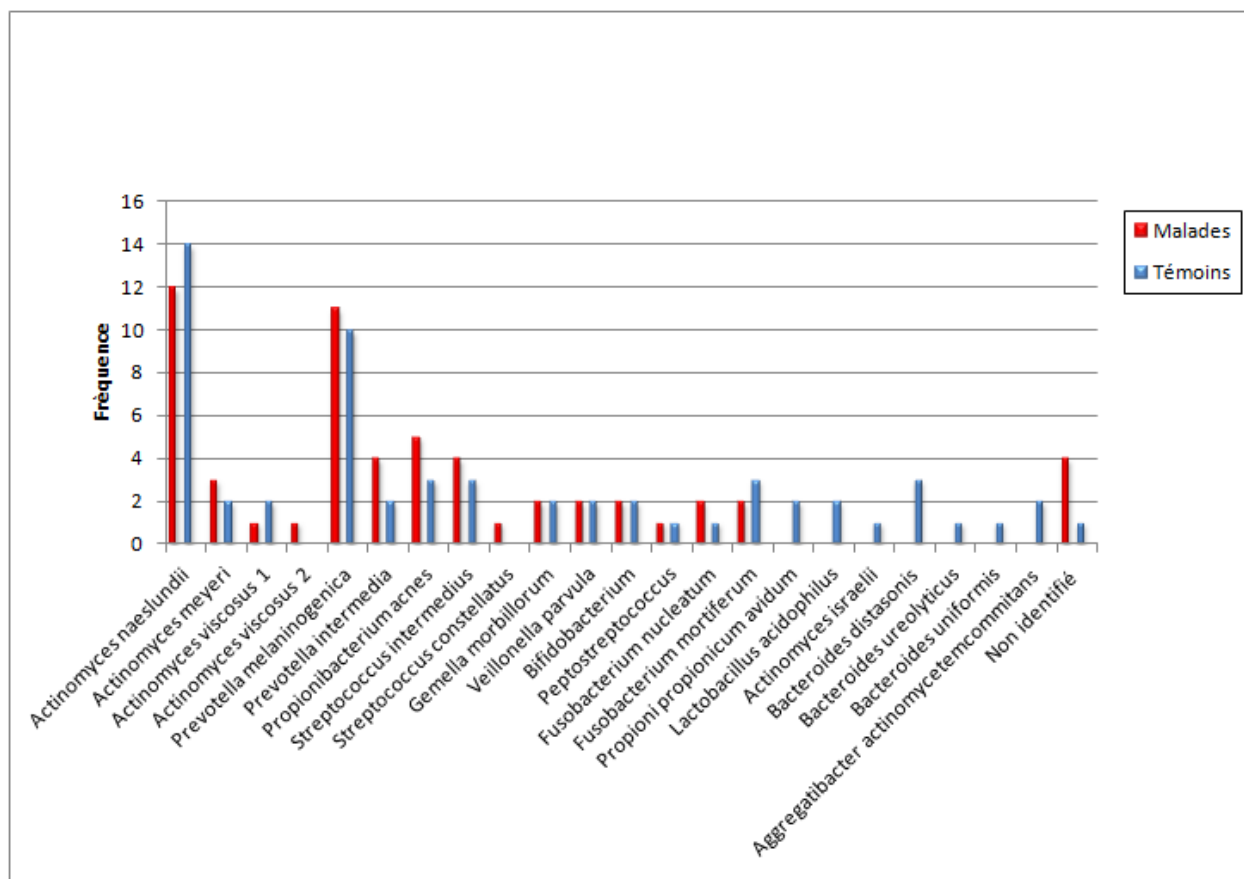


Figure 16 - Espèces retrouvées au sein de la flore linguale des patients atteints de maladie parodontale et des sujets témoins

La fréquence est exprimée en nombre de souches

- ⇒ Il existe une plus grande diversité bactérienne chez les sujets témoins comparé aux patients malades. Toutefois, les espèces uniquement rencontrées chez les témoins, excepté *Aggregatibacter actinomycetemcommitans*, ne sont pas des pathogènes parodontaux. Elles pourraient donc faire partie d'une flore commensale protectrice, en équilibre avec les pathogènes parodontaux.
- ⇒ Les pathogènes parodontaux sont présents chez les malades et chez les témoins. Toutefois, ils représentent la moitié de l'ensemble des espèces retrouvées sur la langue des malades, contre le tiers de l'ensemble des espèces retrouvées sur la langue des témoins.
- ⇒ Notons que certains pathogènes parodontaux, tels que *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* sont plus fréquemment rencontrés chez les malades.

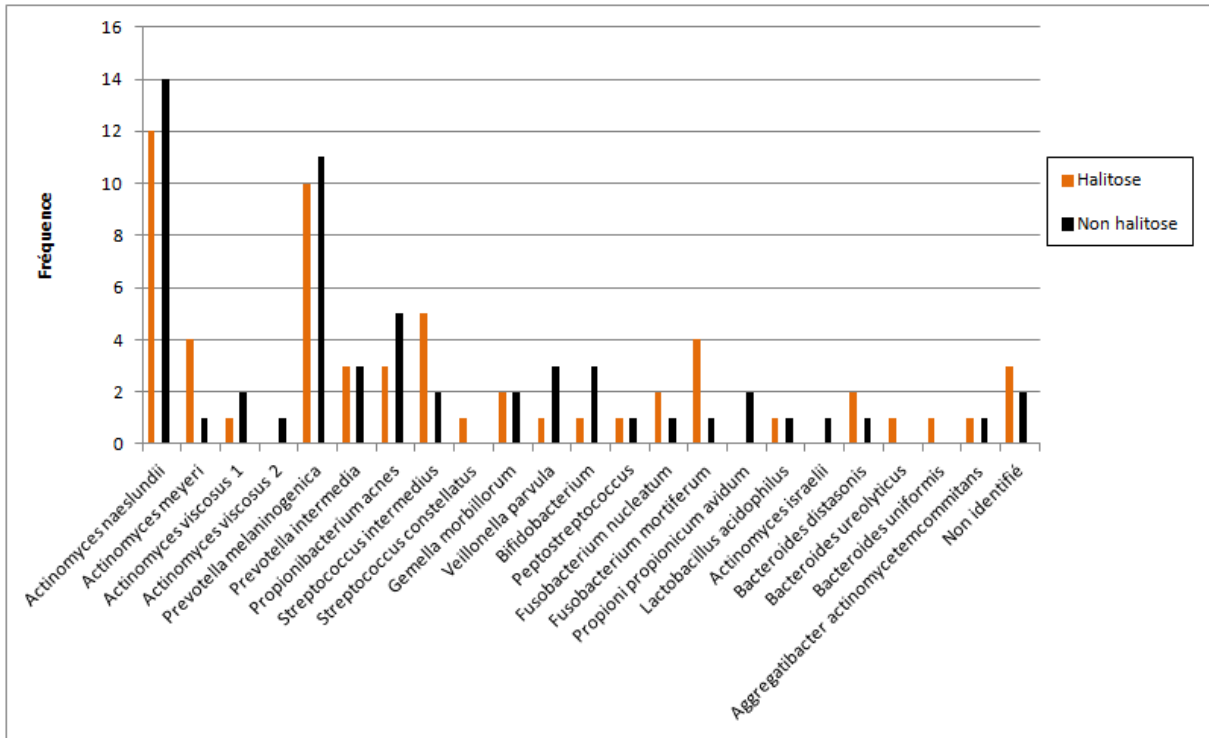


Figure 17 - Espèces retrouvées au sein de la flore linguale des sujets concernés par l'halitose, et des sujets non concernés

La fréquence est exprimée en nombre de souches.

- ⇒ La diversité bactérienne est équivalente au sein de la flore linguale des deux groupes.
- ⇒ L'espèce *Fusobacterium*, connue pour produire de fortes quantités de CSV, est retrouvée plus fréquemment chez les sujets atteints d'halitose.

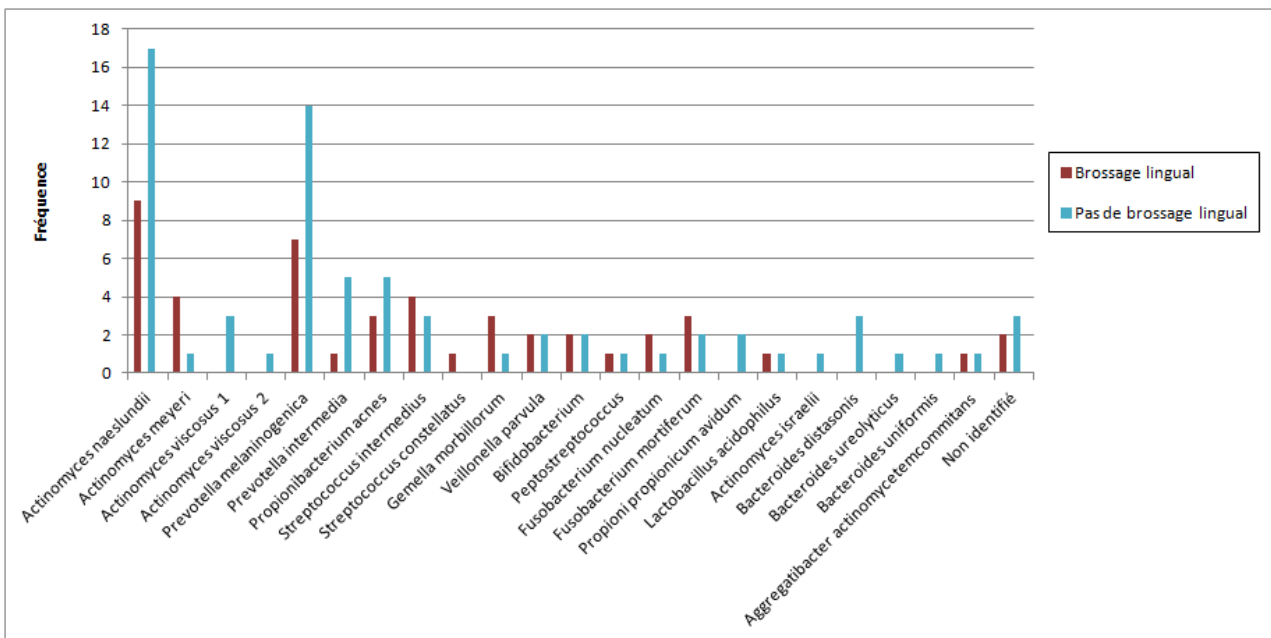


Figure 18 - Espèces retrouvées au sein de la flore linguale des sujets pratiquant le brossage lingual, et des sujets ne le pratiquant pas

La fréquence est exprimée en nombre de souches.

- ⇒ On note une plus grande diversité bactérienne chez les sujets ne pratiquant pas le brossage lingual (21 espèces bactériennes différentes retrouvées au sein de la flore linguale des sujets ne pratiquant pas le brossage lingual contre 15 espèces bactériennes différentes chez les sujets le pratiquant).
- ⇒ De plus, parmi les pathogènes parodontaux, *Prevotella intermedia* est plus fréquemment retrouvé au sein de la flore linguale des sujets ne pratiquant pas le brossage lingual.

IV. DISCUSSION

L'objectif principal de ce travail était de mieux clarifier les relations entre la flore linguale et les maladies parodontales et l'halitose, en recherchant les bactéries potentiellement responsables de ces pathologies (autrement dit les bactéries anaérobies à Gram négatif) au sein de la flore linguale, par la mise en place de méthodes de prélèvement, de culture et d'identification, représentant l'objectif secondaire.

Les techniques de prélèvement et d'identification ont été validées et nous ont permis de recueillir une flore riche et complexe. Une grande partie des souches bactériennes isolées a pu être identifiée, par des méthodes biochimiques (galeries API) et/ou par des méthodes de biologie moléculaire (PCR et/ou séquençage). Certaines souches nous ont posé problème, notamment *Fusobacterium nucleatum*, puisque seulement 3 souches ont pu être confirmées par PCR et par séquençage. En nous référant aux travaux de Liu *et al*, nous avons utilisé des amorces spécifiques du gène FadA codant pour un facteur de virulence propre au *Fusobacterium nucleatum*. (39) Il est possible que nos isolats cliniques, négatifs lors de la PCR, ne possèdent pas ce gène. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait refaire une PCR en utilisant des amorces différentes. Pour *Tannerella forsythia*, un amplicon de 420 paires de bases a été trouvé. Nous avons utilisé les mêmes amorces que celles décrites dans l'article de Decat *et al*, ce dernier s'appuyant sur les travaux de Shelburne *et al*, notamment en ce qui concerne la taille de l'amplicon attendue, qui devrait être de 127 paires de bases. (38,41) Cela ne correspond pas à notre résultat. Le séquençage n'a pas permis une identification précise. On peut expliquer cela par une faible spécificité des amorces, qui a entraîné une faible taille du produit de séquençage, ce qui a pu fausser ou rendre imprécise la comparaison avec la base de données et donc l'identification. La quasi-totalité des souches *Actinomyces naeslundii* a pu être identifiée par les méthodes biochimiques, identifications confirmées par PCR, les travaux de Tang *et al* nous ayant servi de référence. (37) Toutefois, les amorces utilisées sont spécifiques du gène de l'ARNr 16S, qui fait une longueur de plus de 1500 paires de bases ; amplifier l'ADN 16S impose donc le séquençage pour avoir une identification précise. Il sera réalisé ultérieurement.

Notons que les sujets concernés par l'halitose sont aussi nombreux au sein du groupe de patients atteints de maladie parodontale qu'au sein du groupe de sujets témoins. Par conséquent, dans notre étude, les patients atteints de maladie parodontale ne semblent pas être plus fréquemment touchés par l'halitose. Cela est confirmé par Faveri *et al*, Riggio *et al*, Tanaka *et al*, Calil *et al*, Nakano *et al* et Ademovski *et al*, qui ont démontré que l'halitose n'était pas systématiquement associée à la maladie parodontale, et que beaucoup d'individus au parodonte sain étaient concernés par l'halitose, les bactéries productrices de CSV au sein de la flore linguale pouvant être responsables de la mauvaise haleine chez des sujets au parodonte sain. (2,7,13,15,32,33) Van der Sleen *et al* ont d'ailleurs mis en avant que bien que les poches parodontales puissent être à l'origine d'odeurs désagréables, leur contribution à l'halitose reste incertaine et minoritaire. (35) Enfin, Morita *et al* ont également montré que l'halitose était plus fortement associée à la flore linguale qu'à la sévérité de la maladie parodontale. (3)

Autre observation, sur les 14 sujets qui se brossent la langue, 9 sont concernés par l'halitose. L'efficacité du brossage lingual seul sur l'halitose semble donc limitée. Les raisons possibles sont multiples :

- Problème de technique de brossage ;
- Le prélèvement a été effectué à distance du brossage (qui était pratiqué une fois par jour le soir dans la quasi-totalité des cas, ce qui renvoie à l'idée que les bactéries au sein du biofilm lingual sont capables de croître très rapidement, et de produire des quantités significatives de CSV peu après le brossage de la langue) ; (9,33)
- Dans notre étude, il a été demandé aux sujets de cesser les bains de bouche une semaine avant le prélèvement. Par conséquent, nous pouvons uniquement juger de l'efficacité du brossage lingual seul sur l'halitose.

Sur les 20 patients atteints de maladie parodontale, seulement 6 pratiquent un brossage lingual quotidien. Sur les 20 sujets indemnes de parodontite, seulement 8 le pratiquent. Ces observations mettent en évidence que le nettoyage de la langue n'est pas une technique systématiquement intégrée dans le traitement parodontal, ni dans les méthodes d'hygiène bucco dentaires, ce qui est probablement lié au manque de sensibilisation des patients et/ou à la difficulté de ces derniers à réaliser le brossage

lingual, de par l'inconfort de la méthode. Ces observations sont en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature par Aas *et al* et Bordas *et al*. (1,9)

En ce qui concerne les résultats quantitatifs, on ne note pas de différence significative dans le nombre de bactéries anaérobies à Gram négatif (sur gélose FAA), ni dans le nombre total de bactéries (sur GS+gélose FAA) dans aucun des groupes. Cela est à mettre en relation avec l'analyse qualitative, comme ce qui va suivre :

Malades/témoins - La charge bactérienne linguale ne paraît pas plus élevée chez les patients atteints de maladie parodontale. Il ne semble donc pas y avoir de relation significative entre l'état parodontal et la quantité de bactéries présentes sur la langue. A notre connaissance, aucun article ne compare la quantité de pathogènes parodontaux sur le dos de la langue de sujets malades et témoins. Il est donc difficile de faire un lien avec ce qui a été décrit dans la littérature. Toutefois, des résultats contradictoires concernant la charge bactérienne salivaire chez des malades et des témoins ont été mis en avant ; Gomez *et al* n'ont trouvé aucune différence significative (12) alors que He *et al*, a contrario, ont mis en évidence une différence significative. (27) Cependant, l'analyse qualitative nous montre que les pathogènes parodontaux représentent environ la moitié de l'ensemble des espèces présentes au sein de la flore linguale des patients du groupe malade, et que *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum*, connus pour être des pathogènes parodontaux, sont plus fréquemment retrouvés. Chez les témoins, on note certes la présence de pathogènes parodontaux, mais représentant seulement un tiers de l'ensemble des espèces présentes au sein de la flore linguale. De plus, excepté *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, les espèces spécifiquement retrouvées, telles que *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides ureolyticus* ne sont pas connues pour être des bactéries parodontales virulentes.

- ⇒ En accord avec la théorie écologique de Marsh, (42) nous pouvons supposer que les pathogènes parodontaux retrouvés au sein de la flore linguale des sujets témoins, minoritaires, doivent faire partie de la flore commensale, en équilibre avec les autres espèces retrouvées, compatibles avec un état parodontal sain. A l'inverse, si la langue ne contient pas une charge bactérienne suffisante pour provoquer une maladie parodontale chez les malades (comme le montre l'analyse quantitative), on ne note pas comme chez les témoins une flore spécifique non pathogène. Ceci, associé au fait que la moitié de l'ensemble des espèces retrouvées sont des pathogènes parodontaux, nous amène à penser que ces derniers doivent probablement être capables de réinfecter la plaque gingivale après la thérapie parodontale, entraînant une possible récurrence de la pathologie. Cette hypothèse est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature, notamment par Faveri *et al*, Kishi *et al*, Allaker *et al*, Danser *et al*, Tanaka *et al*, Chardin *et al* et Calil *et al*, qui ont suggéré que la flore linguale pouvait effectivement jouer un rôle dans la recolonisation des surfaces dentaires après un traitement parodontal. (2,6,8,11,13-15)

Halitose/non halitose - La charge bactérienne et la diversité bactérienne retrouvées au sein de la flore linguale des sujets concernés par l'halitose ne semblent pas plus élevées que chez les sujets non concernés, contrairement à ce qui a été décrit dans la littérature par Riggio *et al*, Allaker *et al*, Bordas *et al*, Dixon *et al*, Washio *et al*, Haraszthy *et al* et Ademovski *et al*, qui ont mis en avant un effet quantitatif plutôt que qualitatif. (7-9,17,18,30,33)

- ⇒ Le genre *Fusobacterium*, connu pour produire de fortes quantités de CSV, est retrouvé plus fréquemment chez les sujets concernés par l'halitose. Cela est en accord avec les conclusions de Bordas *et al*, Amou *et al*, Washio *et al*, Samaranyake *et al* et Raangs *et al*, suggérant que la présence de *Fusobacterium* dans la plaque linguale est positivement corrélée à l'halitose. (9,16,18,28,34) Mais ce n'est pas le cas des autres bactéries parodontales, laissant supposer que d'autres espèces doivent être impliquées dans l'halitose, comme *Solobacterium moorei* par exemple, ce qui a déjà été suggéré par Kazor *et al*, Tanaka *et al*, Haraszthy *et al*. (10,13,30)

- ⇒ En accord avec les observations de Haraszthy *et al*, notons que le genre *Bacteroides* (notamment *Bacteroides uniformis* et *Bacteroides ureolyticus*) est uniquement retrouvé chez les patients concernés par l'halitose. (30) Toutefois, leur fréquence est très faible dans notre étude, donc on ne peut pas affirmer que ces espèces soient spécifiquement associées à l'halitose.

Brossage lingual/pas de brossage lingual - La charge bactérienne présente à la surface linguale ne semble pas plus élevée chez les sujets ne pratiquant pas le brossage lingual comme on pourrait s'y attendre. Bien que les avis soient très partagés en ce qui concerne l'efficacité du brossage lingual, nos résultats sont en accord avec ceux de Bordas *et al* et d'Ademovski *et al*, qui ont rapporté que le brossage lingual ne réduisait pas le nombre de bactéries sur le dos de la langue, suggérant que ce dernier effectué seul serait peu efficace, ou d'une efficacité transitoire, le biofilm lingual étant résistant, se reformant très rapidement après élimination. (9,33) Toutefois, l'analyse qualitative modère un peu ces observations, puisqu'elle met en évidence une plus grande diversité bactérienne chez les sujets ne pratiquant pas le brossage lingual (21 espèces au total contre 15 chez les sujets pratiquant le brossage lingual). De plus, parmi les pathogènes parodontaux, notons que *Prevotella intermedia* est plus fréquemment retrouvé au sein de la flore linguale des sujets ne pratiquant pas le brossage lingual.

- ⇒ Le seul pathogène parodontal retrouvé plus fréquemment chez les sujets pratiquant le brossage lingual est *Fusobacterium*, dont on connaît les capacités d'adhérence. Si le brossage lingual ne semble pas réduire la charge bactérienne présente à la surface de la langue comme nous l'a montré l'analyse quantitative, il semble avoir un impact sur la diversité bactérienne. Pour une efficacité totale, il semble judicieux, comme cela a été suggéré dans la littérature par Morita *et al*, Yasukawa *et al*, Bordas *et al* et Raangs *et al*, d'associer l'action mécanique (brossage lingual) à une action chimique (utilisation de bains de bouche), ce qui pourrait notamment avoir une action sur le nombre de bactéries, mais aussi sur l'halitose à long terme et sur l'élimination de bactéries plus adhérentes, telles que *Fusobacterium nucleatum*. (3,5,9,34)

D'une manière générale, les deux espèces retrouvées le plus fréquemment au sein de la flore linguale de tous les sujets étaient *Actinomyces naeslundii* puis *Prevotella melaninogenica*. Cela est en accord avec les résultats trouvés dans la littérature, puisque les genres *Actinomyces* et *Prevotella* étaient effectivement décrits comme les plus répandus sur les faces dorsales linguales de tous les sujets. (6,7,9,16,18) La langue semble donc être un réservoir de ces deux bactéries buccales ; *Actinomyces naeslundii* est impliquée dans les caries radiculaires, (notamment dans leur initiation), et est considérée comme un composant majeur du biofilm buccal, comme décrit par Tang *et al*, Ellen, Henssge *et al* et Al-Ahmad *et al*. Ainsi, ce pathogène serait un colonisateur précoce du biofilm, permettant le développement d'une communauté au sein du biofilm, avec une diversité bactérienne de plus en plus importante conduisant à des états pathologiques tels que les caries et les maladies parodontales. (37,43-45) *Prevotella melaninogenica* produit des quantités importantes de CSV, et a été impliquée dans l'halitose, ce qui a été suggéré par Tyrrell *et al*, Riggio *et al*, Tanner *et al*, Haraszthy *et al* et Ademovski *et al*. (4,7,19,30,33)

Il existe certains biais dans notre étude, et certains de nos résultats sont donc à confirmer :

- En ce qui concerne l'analyse quantitative, les colonies ont été comptées et converties en log UFC/ml comme décrit précédemment. Bien souvent, et malgré une dilution, les cultures étaient riches. Aussi, bien que réalisé systématiquement par le même opérateur, le comptage s'est avéré être une technique imparfaite. Cependant, à l'échelle du nombre important de bactéries, une erreur de quelques colonies s'avère négligeable.
- L'échantillon prélevé sur le dos de la langue a été dilué, puis mis en culture. Par conséquent, seules les bactéries capables de croître sur les différents milieux de culture ont par la suite été identifiées par les méthodes moléculaires. La numération des bactéries viables et les techniques de culture sélectionnent certaines bactéries présentes au sein de l'échantillon (notamment les bactéries les moins exigeantes, à croissance rapide) entraînant une sous-estimation de la diversité microbienne effective de l'échantillon, pouvant mener à des résultats

faussés. (9,12,23,29,30,45) De plus, Aas *et al*, Bordas *et al*, Nonnenmacher *et al* et Haraszthy *et al* s'accordent sur le fait que beaucoup d'espèces présentes dans la cavité buccale ne sont pas cultivables, les espèces non cultivables étant les plus nombreuses. (1,9,29,30) La PCR, réalisée immédiatement au sein de l'échantillon prélevé, sans passer par les méthodes de culture, comme décrit dans les articles de Aas *et al*, Faveri *et al*, Yasukawa *et al*, Kishi *et al*, Riggio *et al*, Kazor *et al*, Tanaka *et al*, Amou *et al*, Tachibana *et al* et Ademovski *et al* permet de contourner cet obstacle en identifiant à la fois les microorganismes cultivables et non cultivables. (1,2,5–7,10,13,16,20,33) Cela est à relativiser cependant, car les méthodes de culture ont un rôle important dans la découverte microbiologique, laissant l'opportunité de détecter des espèces inattendues, contrairement aux méthodes moléculaires classiques les plus répandues.(4)

- La mesure de l'halitose dans notre étude a été effectuée de manière subjective (méthode organoleptique, basée sur les dires du sujet et/ou sur le ressenti de l'investigateur), contrairement à ce qui est décrit dans les articles de Yasukawa *et al*, Kishi *et al*, Riggio *et al*, Kazor *et al*, Tanaka *et al*, Calil *et al*, Amou *et al*, Washio *et al*, Haraszthy *et al* et Ademovski *et al*, ou l'évaluation est objective, basée sur la mesure des CSV grâce à l'halimètre ou à la chromatographie en phase gazeuse, en plus des méthodes organoleptiques. (5–7,10,13,15,16,18,30,33) Cependant, certains auteurs ont rapporté que l'évaluation de l'halitose grâce à l'halimètre était significativement corrélée avec les mesures obtenues par la méthode organoleptique. (10)
- Concernant le brossage lingual, la taille des échantillons est différente (26 sujets ne pratiquant pas le brossage lingual contre 14 le pratiquant). De plus, nous avons inclus les sujets dans le groupe brossage lingual uniquement sur les dires du sujet sans vérifier que le brossage était effectivement et correctement effectué. Dans ce contexte, les conclusions avancées restent hypothétiques, aucune certitude ne pouvant être avancée face à des échantillons dont la taille n'est pas comparable.

Nous l'avons compris, des différences dans les méthodes d'échantillonnage et d'analyses microbiologiques peuvent expliquer les différences entre nos résultats et ceux décrits dans la littérature, notamment en ce qui concerne la diversité et la quantité de bactéries retrouvées dans le groupe halitose. Cela d'autant plus que la détection des pathogènes parodontaux présumés dépend fortement des techniques utilisées. Une autre explication réside dans le fait que les espèces bactériennes sont très spécifiques des populations prélevées, et peuvent varier entre différentes populations et différentes régions géographiques. (23,27,29,33)

Les investigations doivent donc être poursuivies, en essayant de limiter les biais et de modifier certains paramètres, notamment :

- En réalisant des prélèvements sur des échantillons dont la taille serait plus importante.
- En comparant le nombre et le type de bactéries retrouvées chez un groupe de sujets pratiquant le brossage lingual seul, et un groupe pratiquant le brossage lingual couplé à l'utilisation d'un bain de bouche, pour observer s'il existe comme supposé ici une action significative sur l'halitose, une diminution du nombre de bactéries ainsi que de la présence de bactéries adhérentes telles *Fusobacterium nucleatum* dans le groupe « Brossage lingual associé à l'utilisation d'un bain de bouche »
- En effectuant une mesure plus précise de l'halitose, basée sur une évaluation objective. (halimètre et/ou chromatographie en phase gazeuse).
- En utilisant la biologie moléculaire (PCR et séquençage) pour vérifier les souches uniquement identifiées par les méthodes biochimiques, notamment *Prevotella melaninogenica*.
- En élargissant le type de bactéries recherchées puisque des études récentes ont suggéré qu'il pouvait exister des bactéries spécifiques de l'halitose, telles que *Solobacterium moorei*.
- En effectuant des prélèvements de flore linguale et de flore sous gingivale sur chacun des sujets du groupe « malade » et « témoin » avant et après la thérapie parodontale, afin de comparer la charge bactérienne et les espèces présentes au niveau des différents sites.

CONCLUSION

La flore retrouvée sur la face dorsale de la langue est riche et complexe, et la détermination de sa réelle implication dans l'apparition ou la récurrence de l'halitose et des maladies parodontales s'est avérée compliquée. De plus, comme suggéré par He *et al* et Kazor *et al*, les espèces bactériennes retrouvées sont très spécifiques des populations prélevées, dépendent des techniques de prélèvement, d'identification et de culture, et nécessitent des échantillons de taille suffisante pour pouvoir détecter des différences significatives dans les compositions microbiennes, notamment pour identifier avec précision les espèces qui sont spécifiquement associées à la santé ou à la maladie. Cependant, nos résultats montrent que la langue est un réservoir de bactéries, dont la chef de file est indéniablement *Actinomyces naeslundii*. Cette bactérie, bien que connue comme étant impliquée dans certaines pathologies buccales, en particulier les caries radiculaires, est certainement sous-estimée. Amou *et al* ont d'ailleurs suggéré que la présence du genre *Actinomyces* dans le biofilm lingual pourrait être responsable de la mauvaise haleine, au même titre que *Prevotella*, par l'intermédiaire de ses produits métaboliques. Les investigations doivent être poursuivies pour connaître le rôle exact de cette bactérie dans les pathologies buccales.

Nous l'avons vu, certains pathogènes parodontaux sont plus fréquemment retrouvés au sein de la flore linguale des patients atteints de maladie parodontale. Bien qu'aucune espèce bactérienne n'ait été spécifiquement associée à l'halitose, ni dans la littérature, ni dans notre étude, certains pathogènes parodontaux connus pour être de forts producteurs de CSV sont plus fréquemment retrouvés sur la langue des patients concernés par l'halitose. Ces observations nous amènent donc à penser que la flore linguale peut jouer un rôle dans l'apparition, ou tout au moins la récurrence des pathologies buccales.

Si l'intégration du brossage lingual dans le plan de traitement contre l'halitose est fréquente, ce n'est pas encore le cas dans le traitement parodontal conventionnel. Pourtant, la flore linguale contient des pathogènes parodontaux, qui, à défaut de provoquer une maladie parodontale, peuvent alimenter la flore gingivale après un traitement classique. Là encore, les investigations doivent être poursuivies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *J Clin Microbiol.* nov 2005;43(11):5721-32.
2. Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. Microbiota of the dorsum of the tongue after plaque accumulation: an experimental study in humans. *J Periodontol.* sept 2006;77(9):1539-46.
3. Morita M, Wang HL. Association between oral malodor and adult periodontitis: a review. *J Clin Periodontol.* sept 2001;28(9):813-9.
4. Tyrrell KL, Citron DM, Warren YA, Nachnani S, Goldstein EJC. Anaerobic bacteria cultured from the tongue dorsum of subjects with oral malodor. *Anaerobe.* oct 2003;9(5):243-6.
5. Yasukawa T, Ohmori M, Sato S. The relationship between physiologic halitosis and periodontopathic bacteria of the tongue and gingival sulcus. *Odontol Soc Nippon Dent Univ.* févr 2010;98(1):44-51.
6. Kishi M, Ohara-Nemoto Y, Takahashi M, Kishi K, Kimura S, Aizawa F, et al. Prediction of periodontopathic bacteria in dental plaque of periodontal healthy subjects by measurement of volatile sulfur compounds in mouth air. *Arch Oral Biol.* mars 2013;58(3):324-30.
7. Riggio MP, Lennon A, Rolph HJ, Hodge PJ, Donaldson A, Maxwell AJ, et al. Molecular identification of bacteria on the tongue dorsum of subjects with and without halitosis. *Oral Dis.* avr 2008;14(3):251-8.
8. Allaker RP, Waite RD, Hickling J, North M, McNab R, Bosma MP, et al. Topographic distribution of bacteria associated with oral malodour on the tongue. *Arch Oral Biol.* avr 2008;53 Suppl 1:S8-12.
9. Bordas A, McNab R, Staples AM, Bowman J, Kanapka J, Bosma MP. Impact of different tongue cleaning methods on the bacterial load of the tongue dorsum. *Arch Oral Biol.* avr 2008;53 Suppl 1:S13-8.
10. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol.* févr 2003;41(2):558-63.
11. Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol.* mai 1996;67(5):478-85.
12. Mantilla Gómez S, Danser MM, Sipos PM, Rowshani B, van der Velden U, van der Weijden GA. Tongue coating and salivary bacterial counts in healthy/gingivitis subjects and periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* oct 2001;28(10):970-8.

13. Tanaka M, Yamamoto Y, Kuboniwa M, Nonaka A, Nishida N, Maeda K, et al. Contribution of periodontal pathogens on tongue dorsa analyzed with real-time PCR to oral malodor. *Microbes Infect Inst Pasteur.* oct 2004;6(12):1078-83.
14. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M. *Microbiologie en odonto-stomatologie.* Paris: Maloine; 2006.
15. Calil C, Liberato FL, Pereira AC, de Castro Meneghim M, Goodson JM, Groppo FC. The relationship between volatile sulphur compounds, tongue coating and periodontal disease. *Int J Dent Hyg.* nov 2009;7(4):251-5.
16. Amou T, Hinode D, Yoshioka M, Grenier D. Relationship between halitosis and periodontal disease - associated oral bacteria in tongue coatings. *Int J Dent Hyg.* 26 juill 2013;
17. Dixon B. Bad breath tied to tongue. *Lancet Infect Dis.* nov 2005;5(11):672.
18. Washio J, Sato T, Koseki T, Takahashi N. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *J Med Microbiol.* sept 2005;54(Pt 9):889-95.
19. Tanner ACR, Paster BJ, Lu SC, Kanasi E, Kent R Jr, Van Dyke T, et al. Subgingival and tongue microbiota during early periodontitis. *J Dent Res.* avr 2006;85(4):318-23.
20. Tachibana M, Yoshida A, Ansai T, Takata Y, Akifusa S, Fukuhara M, et al. Prevalence of periodontopathic bacteria on the tongue dorsum of elderly people. *Gerodontology.* juin 2006;23(2):123-6.
21. Mouton C, Robert J-C, Sixou J-L, Trahan L. *Bactériologie bucco-dentaire.* Paris; Milan; Barcelone: Masson; 1994.
22. Bercy P, Tenenbaum H. *Parodontologie: Du diagnostic à la pratique.* De Boeck Supérieur; 1996. 288 p.
23. Braga RRR, Carvalho MAR, Bruña-Romero O, Teixeira RE, Costa JE, Mendes EN, et al. Quantification of five putative periodontal pathogens in female patients with and without chronic periodontitis by real-time polymerase chain reaction. *Anaerobe.* juin 2010;16(3):234-9.
24. Hajishengallis G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* janv 2014;35(1):3-11.
25. Lamont RJ. *Oral microbiology at a glance.* Chichester, West Sussex, U.K. ; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010. 85 p.
26. Tenorio EL, Klein BA, Cheung WS, Hu LT. Identification of interspecies interactions affecting *Porphyromonas gingivalis* virulence phenotypes. *J Oral Microbiol [Internet].* 17 oct 2011 [cité 26 mars 2014];3.
27. He J, Huang W, Pan Z, Cui H, Qi G, Zhou X, et al. Quantitative analysis of microbiota in saliva, supragingival, and subgingival plaque of Chinese adults with chronic periodontitis. *Clin Oral Investig.* déc 2012;16(6):1579-88.

28. Samaranayake LP. *Essential Microbiology for Dentistry*. Churchill Livingstone; 2006. 371 p.
29. Nonnenmacher C, Dalpke A, Mutters R, Heeg K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. *J Microbiol Methods*. oct 2004;59(1):117-25.
30. Haraszthy VI, Zambon JJ, Sreenivasan PK, Zambon MM, Gerber D, Rego R, et al. Identification of oral bacterial species associated with halitosis. *J Am Dent Assoc* 1939. août 2007;138(8):1113-20.
31. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. juin 2010;53:28-44.
32. Nakano Y, Yoshimura M, Koga T. Correlation between oral malodor and periodontal bacteria. *Microbes Infect Inst Pasteur*. mai 2002;4(6):679-83.
33. Ademovski SE, Persson GR, Winkel E, Tangerman A, Lingström P, Renvert S. The short-term treatment effects on the microbiota at the dorsum of the tongue in intra-oral halitosis patients--a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. mars 2013;17(2):463-73.
34. Raangs GC, Winkel EG, van Winkelhoff AJ. In vitro antimicrobial effects of two antihalitosis mouth rinses on oral pathogens and human tongue microbiota. *Int J Dent Hyg*. août 2013;11(3):203-7.
35. Van der Sleen MI, Slot DE, Van Trijffel E, Winkel EG, Van der Weijden GA. Effectiveness of mechanical tongue cleaning on breath odour and tongue coating: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. nov 2010;8(4):258-68.
36. Feuillolay C, Vezin J-C, Gatignol J-P, Roques C. Décontamination/assainissement des brosses à dents : étude sur des brosses Inava. *Clinic (Paris)*. sept 2013;34:427-33.
37. Tang G, Samaranayake LP, Yip H-K. Genotypic diversity of oral *Actinomyces naeslundii* genospecies 1 and 2 in caries-active preschool children. *Oral Microbiol Immunol*. déc 2004;19(6):371-8.
38. Decat E, Cosyn J, De Bruyn H, Miremadi R, Saerens B, Van Mechelen E, et al. Optimization of quantitative polymerase chain reactions for detection and quantification of eight periodontal bacterial pathogens. *BMC Res Notes*. 2012;5:664.
39. Liu P, Liu Y, Wang J, Guo Y, Zhang Y, Xiao S. Detection of *fusobacterium nucleatum* and *fadA* adhesin gene in patients with orthodontic gingivitis and non-orthodontic periodontal inflammation. *PloS One*. 2014;9(1):e85280.
40. Malheiros V de J, Avila-Campos MJ. Detection of pathogens from periodontal lesions. *Rev Saúde Pública*. oct 2004;38(5):723-8.
41. Shelburne CE, Prabhu A, Gleason RM, Mullally BH, Coulter WA. Quantitation of *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque comparison of immunoassay and quantitative polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods*. janv 2000;39(2):97-107.
42. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol Read Engl*. févr 2003;149(Pt 2):279-94.

43. Ellen RP. Establishment and distribution of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* in the human oral cavity. *Infect Immun.* nov 1976;14(5):1119-24.
44. Henssge U, Do T, Radford DR, Gilbert SC, Clark D, Beighton D. Emended description of *Actinomyces naeslundii* and descriptions of *Actinomyces oris* sp. nov. and *Actinomyces johnsonii* sp. nov., previously identified as *Actinomyces naeslundii* genospecies 1, 2 and WVA 963. *Int J Syst Evol Microbiol.* mars 2009;59(Pt 3):509-16.
45. Al-Ahmad A, Wunder A, Ausschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, et al. The in vivo dynamics of *Streptococcus* spp., *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. *J Med Microbiol.* 5 janv 2007;56(5):681-7.

ANNEXES

ANNEXE 1 - DOCUMENT D'INFORMATION - ETUDE
EXPERIMENTALE DE LA FLORE LINGUALE CHEZ LES PATIENTS
ATTEINTS DE MALADIE PARODONTALE ET/OU D'HALITOSE

UFR d'Odontologie de Bordeaux

Personne qui dirige et surveille la recherche - Docteur Cécile BADET

Madame, Monsieur,

Vous avez la possibilité de participer à une étude proposée par Aurore MAILHARRIN, dans le cadre de sa thèse de Docteur en Chirurgie Dentaire.

La lecture de ce document vous apportera toutes les informations nécessaires en ce qui concerne les différents aspects de cette étude.

Votre participation se fait sur la base du volontariat, et vous avez parfaitement le droit de refuser d'y participer.

But de la recherche

La parodontite est une maladie inflammatoire des tissus supports de la dent, provoquée par des bactéries spécifiques, entraînant une destruction progressive de l'os alvéolaire et du ligament parodontal, avec formation de poches et récessions, aboutissant, à terme, à la perte de la dent.

L'halitose, ou « mauvaise haleine », est un état relativement commun dans la population adulte. Elle est principalement due à des produits métaboliques générés par des bactéries présentes dans la cavité buccale.

Les bactéries à l'origine de l'halitose et des maladies parodontales sont connues, et quasiment identiques.

La langue constitue un réservoir de nombreuses espèces bactériennes. La population bactérienne vivant sur la langue (flore linguale) a été relativement peu étudiée jusqu'ici. Le but de cette étude est donc de réaliser des prélèvements au niveau de la langue, afin d'identifier des bactéries potentiellement responsables des maladies parodontales et de l'halitose, au sein de cette flore linguale.

Qui peut participer ?

Toute personne atteinte de maladie parodontale, n'ayant pas été traitée par un antibiotique durant le mois précédant le prélèvement, et n'ayant pas utilisé de bain de bouche durant la semaine précédant le prélèvement.

Dans les mêmes conditions, toute personne saine (non atteinte par une maladie parodontale), afin de constituer le groupe témoin.

Comment va se dérouler le prélèvement ?

En premier lieu, vous devrez répondre à un questionnaire médical (antécédents médicaux, chirurgicaux, traitements en cours).

Puis un examen endo buccal sera réalisé sommairement.

Le prélèvement sera ensuite réalisé : à l'aide d'une brosse à dents souple stérile, on effectuera un léger « grattage » du dos de la langue, pendant dix secondes (prélèvement indolore). L'échantillon sera mis en suspension dans un tube contenant du sérum physiologique, et étudié ultérieurement au laboratoire de microbiologie à L'UFR d'Odontologie de Bordeaux.

Autres informations

Dans le cadre de cette étude, un traitement informatique de vos données personnelles va être mis en œuvre afin de nous permettre d'analyser les résultats.

Ces données seront identifiées à l'aide d'un code, et de vos initiales, de manière à ce que vous conserviez l'anonymat. Toutes les informations obtenues à partir des prélèvements, ou de votre questionnaire médical resteront strictement confidentielles.

Les prélèvements ne seront pas conservés une fois les résultats obtenus.

Vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment, et poser vos questions à Aurore Mailharrin, qui se doit d'y répondre.

Avant de procéder au prélèvement, un accord oral vous sera demandé, ainsi que la signature de ce document.

Signatures de l'investigateur et du patient

ANNEXE 2 - FICHE PATIENT

ATTENTION : Le patient ne doit pas avoir fait de bain de bouche durant la semaine précédant le prélèvement.

Le patient ne doit pas avoir pris d'antibiotiques durant le mois précédant le prélèvement.

I. DONNEES PERSONNELLES

Nom :

Prénom :

Age :

Sexe :

Antécédents médicaux :

Antécédents chirurgicaux :

Traitements en cours :

II. EXAMEN ENDO BUCCAL

Schéma dentaire : (marquer les dents absentes, la présence de caries, d'obturations, la mobilité ...)

18 17 16 15 14 13 12 11 21 22 23 24 25 26 27 28

48 47 46 45 44 43 42 41 31 32 33 34 35 36 37 38

Hygiène :

- Présence ou absence de plaque ?
- Présence ou absence de tartre ?
- Techniques :
 - Brossage des dents : oui ou non ?
 - Si oui, combien de fois par jour ?
 - Brossage de la langue : oui ou non ?

Dents cariées :

Maladie parodontale :

- Présence ou absence ?

- Traitée ou pas ?
Si traitée, comment ?
- Localisée ou généralisée ?
- Chronique ou agressive ?
- Mobilité de chaque dent : (possibilité de marquer sur le schéma M0, M1, M2, M3 en fonction du degré de mobilité).

Halitose :

- Le patient a-t-il la sensation d'avoir « mauvaise haleine » ?
- Est-ce son entourage qui le lui fait remarquer ?
- Halitose perçue par le praticien ?

Vu, Le Président du Jury,

Date, Signature :

Vu, le Directeur de l'UFR des Sciences Odontologiques,

Date, Signature :

Vu, le Président de l'Université de Bordeaux,

Date, Signature :