



HAL
open science

Création d'un modèle de simulation de carie ex vivo sur dent humaine

Jonathan Schott

► **To cite this version:**

Jonathan Schott. Création d'un modèle de simulation de carie ex vivo sur dent humaine. Chirurgie. 2020. dumas-03517121

HAL Id: dumas-03517121

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03517121>

Submitted on 7 Jan 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

THESE

***POUR OBTENIR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE***

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix-Marseille Université
(Président : Monsieur le Professeur Éric BERTON)

***CREATION D'UN MODELE DE SIMULATION
DE CARIE EX VIVO SUR DENT HUMAINE***

Présentée par

SCHOTT Jonathan

Né(e) le 22 avril 1989

A Marseille

Bouches du Rhône

Thèse soutenue le **8 Décembre 2020**

Devant le jury composé de

Président : Professeur RASKIN Anne

Assesseurs : Professeur TARDIVO Delphine

Docteur LAURENT Patrick

Docteur JEANNEAU Charlotte

Invité : Docteur VIRIOT Philippe

THESE

***POUR OBTENIR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE***

Présentée et publiquement soutenue devant la

Faculté d'Odontologie de Marseille
(Doyen : Monsieur le Professeur Bruno FOTI)

Aix-Marseille Université
(Président : Monsieur le Professeur Éric BERTON)

***CREATION D'UN MODELE DE SIMULATION
DE CARIE EX VIVO SUR DENT HUMAINE***

Présentée par

SCHOTT Jonathan

Né(e) le 22 avril 1989

A Marseille

Bouches du Rhône

Thèse soutenue le **8 Décembre 2020**

Devant le jury composé de

Président : Professeur RASKIN Anne

Assesseurs : Professeur TARDIVO Delphine

Docteur LAURENT Patrick

Docteur JEANNEAU Charlotte

Invité : Docteur VIRIOT Philippe

ADMINISTRATION

Mise à jour : sept. 2020

Doyens Honoraires

Professeur	Raymond SANGIUOLO†
Professeur	Henry ZATTARA
Professeur	André SALVADORI
Professeur	Jacques DEJOU

Doyen Assesseurs

Professeur	Bruno FOTI
Professeur	Michel RUQUET
Professeur	Anne RASKIN

Directeurs de Départements

Formation Initiale	Professeur	Michel RUQUET
Recherche	Professeur	Anne RASKIN
Formation Continue	Professeur	Frédéric BUKIET

Charges de missions

Relations Internationales	Professeur	Hervé TASSERY
Internat et Diplômes d'études spécialisées CORTI	Professeur	Virginie MONNET-
Affaires générales	Docteur	Patrick TAVITIAN

Responsable des Services Administratifs et Techniques

Madame	Katia LEONI
--------	-------------

LISTE DES ENSEIGNANTS

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD

BUKIET Frédéric (58-01)
FOTI Bruno (56-02)
LE GALL Michel (56-01)
MONNET-CORTI Virginie (57-01)
ORTHLIEB Jean-Daniel (58-01)
RASKIN Anne (58-01)
RUQUET Michel (58-01)
TARDIEU Corinne (56-01)
TARDIVO Delphine (56-02)
TASSERY Hervé (58-01)

PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ABOUT Imad (65)

PROFESSEURS EMERITES

DEJOU Jacques
HUE Olivier

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES CSERD

ABOUDHARAM Gérard (58-01)	LAN Romain (56-02)
BANDON Daniel (56-01)	LAURENT Michel (58-01)
BELLONI Didier (57-01)	LAURENT Patrick (57-01)
BOHAR Jacques (56-01)	MAILLE Gérald (58-01)
CAMOIN Ariane (56-01)	PHILIP-ALLIEZ Camille (56-01)
CAMPANA Fabrice (57-01)	POMMEL Ludovic (58-01)
CATHERINE Jean-Hugues (57-01)	PRECKEL Bernard-Éric (58-01)
GAUBERT Jacques (56-01)	RÉ Jean-Philippe (58-01)
GIRAUD Thomas (58-01)	ROCHE-POGGI Philippe (57-01)
GIRAUDEAU Anne (58-01)	STEPHAN Grégory (58-01)
GUIVARC'H Maud (58-01)	TAVITIAN Patrick (58-01)
JACQUOT Bruno (58-01)	TERRER Elodie (58-01)
LABORDE Gilles (58-01)	TOSELLO Alain (58-01)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES ASSOCIES

BALLESTER Benoît (58-01)
BLANCHET Isabelle (56-01)
MENSE Chloé (58-01)
SILVESTRI Frédéric (58-01)

ASSISTANTS HOSPITALIERS ET UNIVERSITAIRES

AL AZAWI Hala (56-01)	HAHN-GOLETTI Larissa (58-01)
ANTEZACK Angeline (57-01)	LIOTARD Alicia (58-01)
ARNIER Canelle (56-01)	MANSUY Charlotte (58-01)
BACHET-DORISON Damienne (56-01)	MARTIN William (56-01)
CAMBON Isabelle (56-01)	MATTERA Rémi (56-01)
CASAZZA Estelle (56-01)	MELLOUL Sébastien (57-01)
CASTRO Romain (57-01)	PARFU Anne (58-01)
DAVID Laura (56-01)	PASCHEL Laura (58-01)
DEVICTOR Alix (58-01)	PILLIOL Virginie (58-01)
DODDS Mélina (58-01)	REPETTO Andréa (58-01)
DRAUSSIN Thierry (56-02)	ROMANET Yvan (57-01)
DUMAS Cathy (57-01)	SANTUNIONE Charlotte (58-01)
HADJ-SAID Mehdi (57-01)	VINAÏ Michael (56-01)

ASSISTANTS DES UNIVERSITES ASSOCIES

GRINE Ghilès (57-01)
HOUVENAEGHEL Brice (57-01)

Intitulés des sections CNU :

- 56^{ème} section : Développement, croissance et prévention
 - 56-01 Odontologie pédiatrique et orthopédie dento-faciale
 - 56-02 : Prévention – Epidémiologie – Economie de la santé – Odontologie légale
- 57^{ème} section : Chirurgie orale ; Parodontologie ; Biologie Orale
 - 57-01 : Chirurgie orale – Parodontologie – Biologie orale
- 58^{ème} section : Réhabilitation orale
 - 58-01 : Dentisterie restauratrice – Endodontie – Prothèses – Fonction-Dysfonction – Imagerie – Biomatériaux

L'auteur s'engage à respecter les droits des tiers, et notamment les droits de propriété intellectuelle. Dans l'hypothèse où la thèse comporterait des éléments protégés par un droit quelconque, l'auteur doit solliciter les autorisations nécessaires à leur utilisation, leur reproduction et leur représentation auprès du ou des titulaires des droits. L'auteur est responsable du contenu de sa thèse. Il garantit l'Université contre tout recours. Elle ne pourra en aucun cas être tenue responsable de l'atteinte aux droits d'un tiers

Je remercie...

Ma présidente du jury, le professeur Anne Raskin, particulièrement présente lors de la dernière année de mon cursus. Merci pour votre sens de l'écoute, votre enthousiasme, votre rigueur (notamment à propos des fautes d'orthographe, qui je l'espère, seront absentes de ce manuscrit) mais aussi votre humanité. Vous rendez l'enseignement et la pratique clinique meilleurs chaque jour.

Le Professeur Delphine Tardivo, mentor et amie, sans qui ma reconversion n'aurait sans doute pas été possible. Toutes ces heures passées au rez-de-chaussée du Pavillon Dentaire ont été bénéfiques et me serviront toute ma vie pour la pratique de la dentisterie. Merci pour ta bienveillance, ton humour et ta sagacité.

Mon directeur de thèse, le Docteur Patrick Laurent, qui aura eu le courage de m'encadrer du début à la fin de ce travail de thèse mais également depuis mes débuts à la Faculté. Je me souviens de vos séances « d'ARC », c'est ce qui m'a décidé à vouloir travailler avec vous. J'aime votre esprit critique et votre pertinence. Merci de m'avoir consacré tout ce temps et cette énergie.

Le Docteur Charlotte Jeanneau, que j'ai appris à connaître pendant ces deux années passées au laboratoire. Tu as toujours su jongler avec brio entre tes travaux de recherche, ceux de Sophie, les miens, tes préparations de TP... j'en oublie sûrement ! C'est cette capacité à pouvoir tout faire en même temps, à avoir la bonne idée quand il faut, qui m'a permis d'avancer et de pouvoir enfin te présenter ce travail. Merci pour ton aide, ton dévouement et ta bonne humeur.

Le Docteur Philippe Viriot, collaborateur et ami, tu me permets d'exercer chaque jour mon métier dans les meilleures conditions qui soient. Ton savoir, savoir-faire et savoir-être sont une source d'inspiration inestimable dans ma pratique quotidienne. T'inclure dans ce travail de recherche me permet de te remercier à ma façon pour ta prévenance et ton soutien.

Sommaire

1	Introduction.....	1
1.1	LESION CARIEUSE ET BACTERIES CARIOGENES	1
1.1.1	Physiopathologie de la carie.....	1
1.1.2	Etiologie de la carie	6
1.1.3	Développement carieux	8
1.2	LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE LA LESION CARIEUSE	10
1.2.1	Modèles de déminéralisation.....	10
1.2.2	Modèle d'étude du biofilm carieux.....	10
1.2.3	Modèle de carie simplifié	11
1.3	INTERETS ET LIMITES DES MODELES EXISTANTS.....	13
1.3.1	Intérêt des modèles.....	13
1.3.2	Limite des modèles.....	13
2	Matériels et méthodes	14
2.1	Conception expérimentale	14
2.2	Culture de dents entières humaines	14
2.3	Analyse du biofilm	16
2.4	Analyse de la déminéralisation	16
2.5	Coupes histologiques des tissus déminéralisés.....	17
2.6	Coloration de Gram	18
2.7	Immunofluorescence sur coupes histologiques.....	19
3	Résultats.....	20
3.1	Mesure du pH au cours du temps	20
3.2	Mise en évidence radiographique de la déminéralisation.....	20
3.3	Mise en évidence photographique de la croissance bactérienne.....	21
3.4	Croissance du biofilm bactérien sur le modèle et identification des espèces bactériennes	22
3.4.1	Croissance du biofilm bactérien	22
3.4.2	Identification des espèces par coloration de Gram	23
3.5	Mise en évidence des bactéries à l'intérieur de la dentine infectée	24
4	Discussion	26
5	Conclusion	27
6	Bibliographie.....	I

Table des illustrations

FIGURE 1. STRUCTURE ET ANATOMIE DE LA COURONNE DENTAIRE (SOURCE : UFSBD)	1
FIGURE 2. COUPE HISTOLOGIQUE D'UNE DENT VUE AU MICROSCOPE (BARRE=200µM). COLORATION A L'HEMATOXYLINE/EOSINE. (2)	2
FIGURE 3. ILLUSTRATION D'ACTINOMYCES NAESLUNDII EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (SOURCE : MICROBEWIKI.KENYON.EDU).....	3
FIGURE 4. ILLUSTRATION DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (SOURCE : MICROBEWIKI.KENYON.EDU).....	3
FIGURE 5. ILLUSTRATION DE STREPTOCOCCUS MUTANS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE (SOURCE : MICROBEWIKI.KENYON.EDU).....	4
FIGURE 6. RELATION ENTRE LES MODIFICATIONS DE PH ET LA BALANCE REMINERALISATION/DEMINERALISATION A LA SURFACE DE LA DENT (ILLUSTRATION PERSONNELLE D'APRES (12)).	5
FIGURE 7. EQUILIBRE DEMINERALISATION-REMINERALISATION EN RAISON D'UNE NEUTRALISATION DE L'ACIDE DUE AU POUVOIR TAMPON DE LA SALIVE (ILLUSTRATION PERSONNELLE D'APRES (13)).	5
FIGURE 8. DESEQUILIBRE DANS LE SENS D'UNE DEMINERALISATION EN RAISON D'UNE INSUFFISANCE DES RESSOURCES LOCALES A NEUTRALISER L'ACIDE PRODUIT (ILLUSTRATION PERSONNELLE D'APRES (13)). ...	6
FIGURE 9. DIAGRAMME DE KEYES MODIFIE PAR NEWBRUN (1978)	7
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DE LA DENTINE CIRCUMPULPAIRE OU ORTHODENTINE (ILLUSTRATION PERSONNELLE D'APRES (24)).	9
FIGURE 11. TRANCHES DE DENTINES SUSPENDUES DANS UN MILIEU DE CROISSANCE PERMETTANT LA FORMATION DU BIOFILM (A, B) LES BACTERIES ADHERENTES A LA TRANCHE DE DENTINE VONT FORMER LE BIOFILM (C) (43).....	12
FIGURE 13. CAVITE DENTAIRE SUR LA FACE OCCLUSALE	14
FIGURE 12. ASSEMBLAGE DU RESERVOIR SUR LA DENT	14
FIGURE 14. MONTAGE DU MODELE DE CARIE	15
FIGURE 15. PROTOCOLE DE CULTURE DE DENTS HUMAINES D'APRES (45).	16
FIGURE 16. SCHEMA DE DIAGNOSTIC DU SYSTEME SOPROLIFE®	16
FIGURE 17. DENT MISE EN BLOC DE PARAFFINE.	17
FIGURE 18. ILLUSTRATION DES COUPES AU MICROTOME.	17
FIGURE 19. SCHEMA DE LA COLORATION DE GRAM	18
FIGURE 20. MESURE DU PH AU COURS DU TEMPS.....	20
FIGURE 21. MISE EN EVIDENCE RADIOGRAPHIQUE DE LA DEMINERALISATION	20
FIGURE 22. MISE EN EVIDENCE PHOTOGRAPHIQUE DE LA DEMINERALISATION EN LUMIERE NATURELLE.....	21
FIGURE 23. MISE EN EVIDENCE PHOTOGRAPHIQUE DE LA DEMINERALISATION EN LUMIERE NATURELLE.....	21
FIGURE 24. MISE EN EVIDENCE PHOTOGRAPHIQUE DE LA DEMINERALISATION EN LUMIERE FLUORESCENTE ..	21
FIGURE 25. MISE EN EVIDENCE PHOTOGRAPHIQUE DE LA DEMINERALISATION EN LUMIERE FLUORESCENTE ..	22
FIGURE 26. CAVITE DE LA DENT TEMOIN	22
FIGURE 27. PRESENCE DE BIOFILM BACTERIEN SUR LA FACE OCCLUSALE.	23
FIGURE 28. OBSERVATION MICROSCOPIQUE (COLORATION DE GRAM) DU BIOFILM FORME A LA SURFACE DES DENTS. BARRE = 50µM.	23
FIGURE 29. OBSERVATION MICROSCOPIQUE (COLORATION DE GRAM) DU BIOFILM FORME A LA SURFACE DES DENTS. BARRE = 100µM.	24
FIGURE 30. MARQUAGE DAPI DES COUPES DE DENTS	25

1 Introduction

1.1 LESION CARIEUSE ET BACTERIES CARIOGENES

1.1.1 Physiopathologie de la carie

1.1.1.1 Organe dentaire

La dent est composée de trois parties distinctes : la couronne, la racine et le ligament. La couronne est formée de trois couches différenciées : l'émail, la dentine et la pulpe (Figure 1).

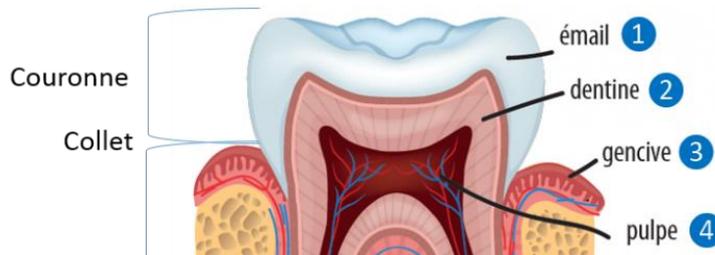


Figure 1. Structure et anatomie de la couronne dentaire (Source : UFSBD)

L'émail est une structure minéralisée d'origine épithéliale qui forme un recouvrement protecteur au niveau de la couronne des dents (Figure 1). Il ne peut pas se régénérer en cas d'altération mais peut bénéficier de précipitation de phosphate de calcium d'origine salivaire ou exogène. Il contient près de 96% de phase minérale ce qui en fait le tissu le plus dur du corps humain, les 4% restants constituent la phase organique (1).

La dentine est un tissu moins minéralisé que l'émail, comportant 70% de phase minérale, 20% de matrice organique collagénique et 10% d'eau. La phase minérale est constituée de cristaux d'hydroxyapatite, la matrice organique est composée à 90% de collagène de type I et 10% de protéines non collagéniques et de molécules de la matrice extracellulaire. La pré-dentine est la dentine nouvellement formée avant la calcification et la maturation. C'est la partie la plus interne de la dentine située au contact du tissu pulpaire. (2) Le manteau dentinaire, couche de dentine dépourvue de canalicule, épaisse de 7 à 30µm, constitue la périphérie de la dentine coronaire. Cette zone correspond à la formation de la première couche de dentine produite par des odontoblastes non polarisés ne possédant pas de prolongements. Dès que les odontoblastes pulpaires sont polarisés, la formation de dentine primaire débute. Celle-ci s'achève avec la mise en fonction de la dent sur l'arcade. Ultérieurement, les odontoblastes contribuent à la formation de dentine secondaire. Cette sécrétion est continue tout au long de la vie de la dent et va en ralentissant. Ceci a pour conséquence une diminution du volume pulpaire de façon centripète et un allongement des tubuli dentinaires contenant les prolongements odontoblastiques (1).

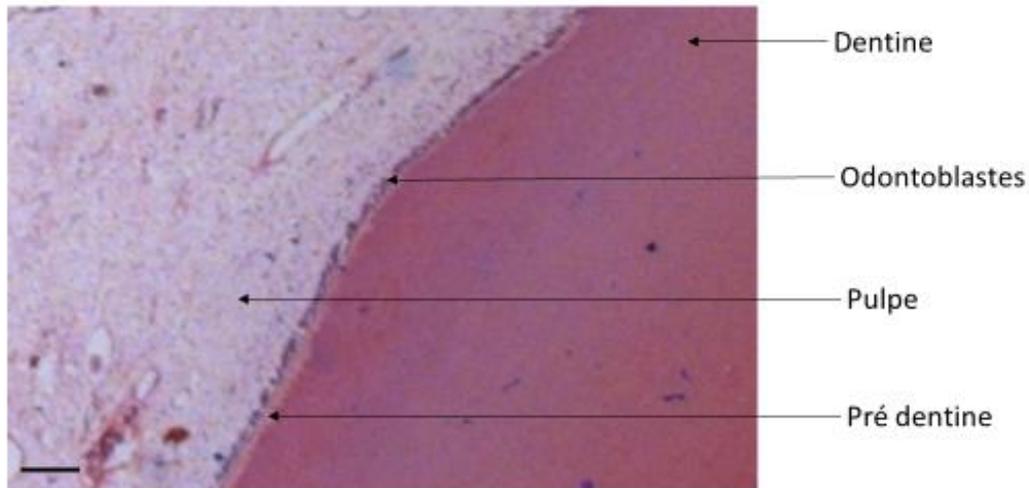


Figure 2. Coupe histologique d'une dent vue au microscope (Barre=200µm). Coloration à l'hématoxyline/éosine. (2)

La pulpe, tissu conjonctif lâche et spécialisé, est entouré par la dentine (Figure 2). La pulpe est confinée dans un espace presque totalement clos et inextensible, divisé en une portion large située à l'intérieur de la couronne : la chambre pulpaire, et une portion plus étroite située à l'intérieur de la racine : le canal radiculaire. A l'extrémité de la racine subsiste un orifice : le foramen apical par lequel cheminent les éléments assurant la vascularisation et l'innervation du tissu.

Les principales fonctions de la pulpe sont la formation des dentines primaire, secondaire et tertiaire. Elle assure également la nutrition et l'immunité et permet une réponse neurosensorielle par la transmission d'information douloureuse au cerveau. Ces fonctions s'exercent lors de stimuli physico-chimiques (acidité, température, produits métaboliques du processus carieux...) ou mécaniques (abrasions, éviction carieuse...). Les odontoblastes participent à la formation de la dentine, les fibroblastes et les cellules souches pulpaires sont responsables du maintien de la structure et de la nutrition tandis que les cellules dendritiques pulpaires permettent d'activer la réponse immunitaire (1,3).

1.1.1.2 Bactéries cariogènes

La flore buccale est constituée de plus de 500 espèces bactériennes (4). Chaque dent, une fois son éruption faite, est couverte par une communauté microbienne commensale, principalement composée de bactéries Gram-positif. Ces bactéries adhèrent, sous la forme d'un biofilm, à la surface de l'émail. Ce dernier constitue une barrière mécanique aux micro-organismes et protège les tissus moins résistants de la dent : la dentine et la pulpe. Dans un environnement riche en sucres, la croissance de certaines populations spécifiques de bactéries est favorisée, telles que *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* et *Actinomyces*. Elles sont un indicateur du processus carieux actif et constituent les espèces colonisatrices primaires des surfaces dentaires.

Les streptocoques et lactobacilles sont des bactéries Gram-positif et anaérobies facultatifs. Elles sont capables d'utiliser la respiration si l'oxygène est présent, ou d'utiliser la fermentation s'il est manquant pour produire de l'énergie. Elles font également partie du groupe des bactéries acidophiles, c'est-à-dire que leur croissance est favorisée dans un milieu acide (5). Le rôle des Actinomyces n'est pas clairement défini dans la littérature. Ils sont ubiquitaires et leur nombre varie peu entre les sites sains et les sites cariés (6).

- Genre **Actinomyces** (Figure 3) : c'est un groupe de bactéries anaérobies strictes et facultatives, dont certaines sont présentes dans l'environnement buccal : *A. graevenitzii*, *A. radicenti*, *A. naeslundii*, *A. viscosus*. Elles ont la forme de bacilles, non mobiles, retrouvées principalement dans les caries, les infections endodontiques et péri-apicales, les cellulites et les abcès parodontaux. *Actinomyces naeslundii* et *Actinomyces viscosus* sont des colonisateurs précoces de la cavité buccale, elles vont faciliter l'adhésion d'autres espèces (7).

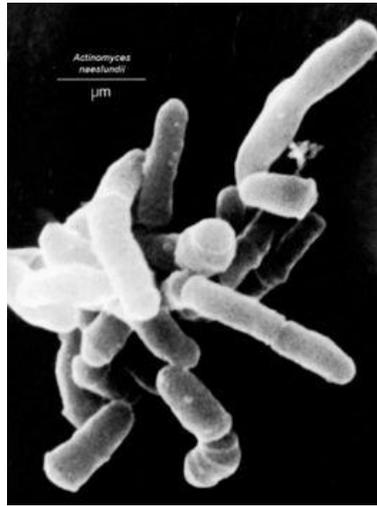


Figure 3. Illustration d'*Actinomyces naeslundii* en microscopie électronique à balayage (Source : microbewiki.kenyon.edu)

- Genre **Lactobacillus** (Figure 4) : il existe plusieurs espèces buccales : *L. acidophilus* (Figure 4), *L. casei*, *L. fermentum*, *L. oris*, *L. salivarius*. Elles ont la forme de bacilles et font partie du groupe des **bactéries lactiques**, leur activité métabolique produit principalement de l'acide lactique. Elles sont anaérobies mais aérotoles. Leur croissance est possible entre 2°C et 53°C, elle est optimale dans un environnement acide (pH 5,5 à 6,2), elles sont dites **acidophiles**. Elles colonisent préférentiellement les sites permettant une rétention mécanique car leur capacité d'adhésion aux surfaces lisses est faible. Elles sont impliquées dans le processus carieux et dans la progression de la carie au sein de la dentine par leur caractère **acidophile** et **acidogène** (8).

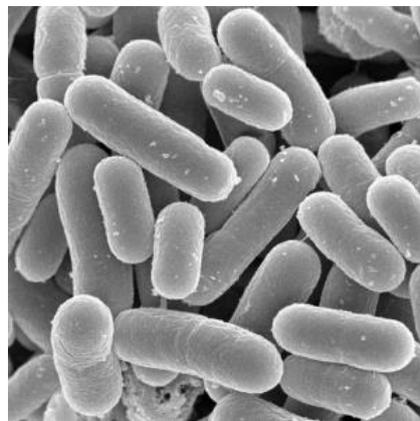


Figure 4. Illustration de *Lactobacillus acidophilus* en microscopie électronique à balayage (Source : microbewiki.kenyon.edu)

- Genre ***Streptococcus*** (Figure 5) : La majorité des streptocoques appartient à la flore commensale des cavités naturelles de l'homme (rhino-pharynx, cavité buccale, tractus digestif et voies génitales), ces bactéries adhèrent aux cellules épithéliales de l'hôte. Ils ont la forme de coques regroupés en paires ou en chaînettes, ils sont anaérobies mais aérotolestants. *S. mutans* (Figure 4) et *S. sobrinus* sont fortement impliqués dans le processus carieux (9).

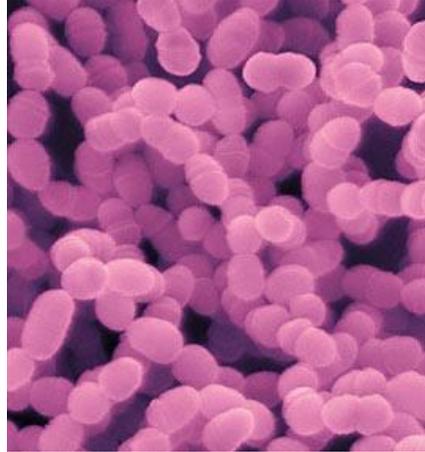


Figure 5. Illustration de *Streptococcus mutans* en microscopie électronique à balayage (Source : microbewiki.kenyon.edu)

1.1.1.3 Sucres et acides

La plaque dentaire représente un écosystème microbien dans lequel les bactéries du type « *non mutans* » (principalement les Streptocoques *non mutans* et les *Actinomyces*) sont les microorganismes clés du maintien de l'équilibre dynamique de la surface dentaire. Quelques minutes après que la plaque a été exposée aux glucides présents dans l'alimentation, les acides organiques produits par les bactéries cariogènes font baisser le pH à l'interface plaque/émail. La haute solubilité de l'émail en dessous de pH 5,3 entraîne un risque élevé de déminéralisation tant que le pH est maintenu sous le seuil critique de pH 5,5. Ce processus de déminéralisation est généralement considéré comme l'étiologie primaire de la formation de la carie (10). L'élimination des acides se fait progressivement par trois mécanismes :

- Diffusion hors de la plaque dans la salive
- Neutralisation par le pouvoir tampon salivaire ou par production de dérivés azotés de certaines bactéries de la plaque (ex : *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*)
- Transformation des acides (ex : acide lactique) en acides plus faibles (ex : acide acétique et propionique) lorsque l'acide lactique est métabolisé après épuisement des sources glucidiques

L'adaptation microbienne au milieu acide joue un rôle essentiel dans la déstabilisation de l'homéostasie de la plaque dentaire, la balance déminéralisation/reminéralisation tend vers la perte de minéral, c'est le **stade acidogène**. La prise répétée de glucose favorise le maintien de l'environnement acide, *Streptococcus mutans* comme *Lactobacillus*, peuvent proliférer au détriment d'autres bactéries et favoriser le développement de lésions carieuses, c'est le **stade acidurique** (11) (Figure 6).

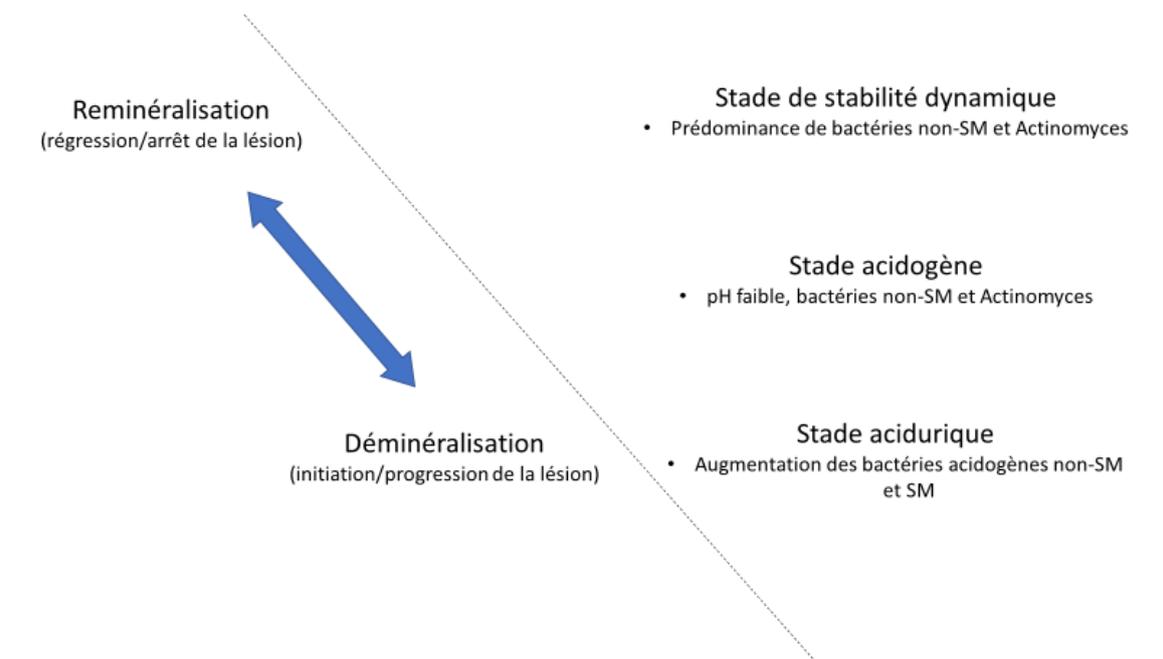


Figure 6. Relation entre les modifications de pH et la balance reminéralisation/déminéralisation à la surface de la dent (illustration personnelle d'après (12)).

Les glucides fermentescibles se retrouvent sous forme de monosaccharides (glucose, fructose) et de disaccharides (saccharose, lactose). Si l'effet tampon de la salive n'est pas capable de modérer la chute de pH, le phosphate et le calcium des couches superficielles d'émail se solubilisent : c'est la **déminéralisation**. Lorsque le pH repasse au-dessus du seuil critique, le phosphate et le calcium regagnent l'émail : c'est la **reminéralisation**.

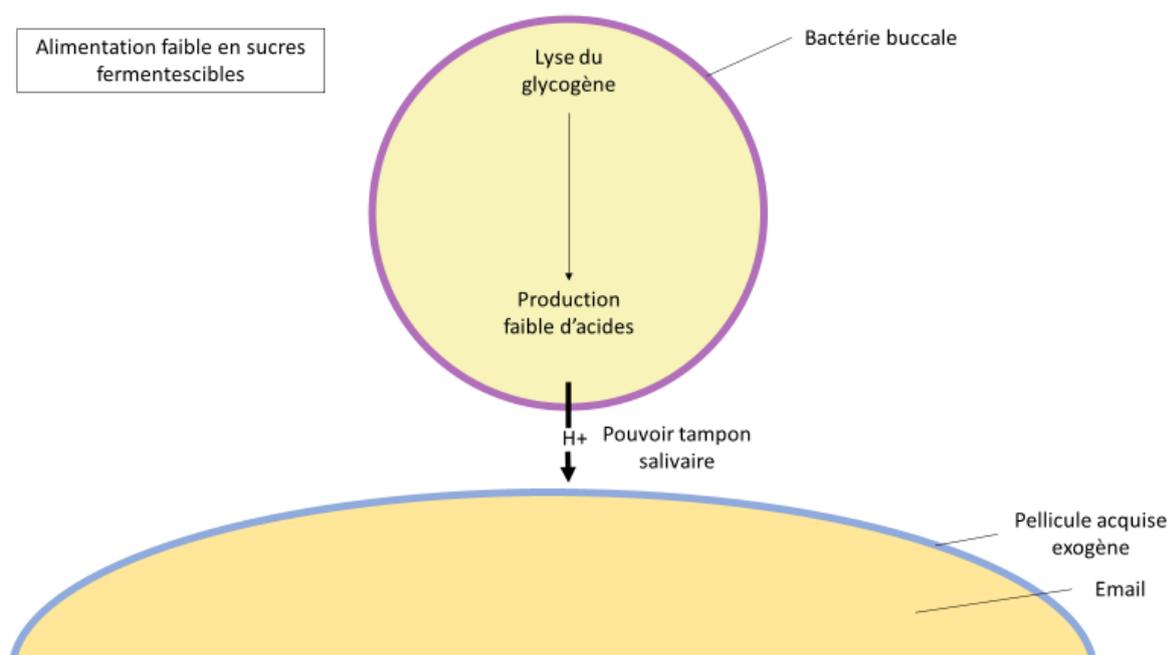


Figure 7. Equilibre déminéralisation-reminéralisation en raison d'une neutralisation de l'acide due au pouvoir tampon de la salive (illustration personnelle d'après (13)).

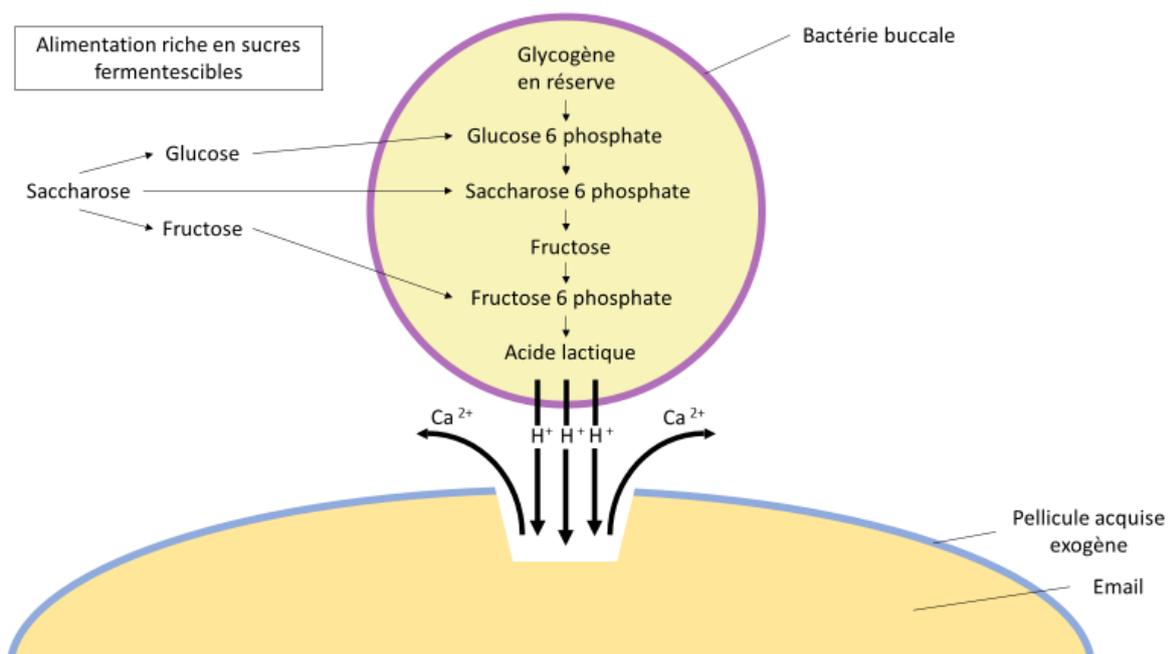


Figure 8. Déséquilibre dans le sens d'une déminéralisation en raison d'une insuffisance des ressources locales à neutraliser l'acide produit (illustration personnelle d'après (13)).

Par fermentation de ces sucres, *S. mutans* peut produire du lactate, du formate, de l'acétate et de l'éthanol (9) (Figure 7). Quand le glucose est abondant, le lactate est le produit majoritaire (12) (Figure 8). L'acide lactique produit se complexe au calcium présent dans les cristaux d'hydroxyapatite à la surface des dents et entraîne la déminéralisation. La croissance des bactéries acidophiles, comme l'espèce *Lactobacillus*, participe à la diminution du pH du milieu buccal, favorisant leur propre prolifération (13).

L'acide lactique est l'agent le plus couramment utilisé dans le processus de déminéralisation artificiel. Il a été démontré qu'une solution de lactate de sodium en présence d'hydroxyapatite, le composé principal du tissu dentaire, produit lentement des lésions carieuses similaires à celles produites *in vivo* (14).

1.1.2 Etiologie de la carie

La carie est une maladie causée par la prolifération de bactéries fermentant les aliments et produisant des acides qui dissolvent les tissus dentaires (15). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, la carie dentaire est qualifiée de « troisième fléau mondial », après les maladies cardiovasculaires et les néoplasies, c'est la pathologie chronique la plus répandue dans le monde. Au cours des dernières décennies, le processus carieux a été beaucoup mieux défini sur plusieurs aspects, comme la microbiologie buccale, le rôle de la salive, la structure des tissus dentaires, la cinétique de déminéralisation/reminéralisation et les facteurs contribuant à sa formation (15). Il est maintenant bien établi que des épisodes de déminéralisations et de reminéralisations se produisent dans la bouche et qu'un déséquilibre de ce processus peut mener à une cavitation des tissus dentaires.

Le terme de carie dentaire désigne à la fois le **résultat**, les **signes** et les **symptômes** d'une dissolution des surfaces dentaires causée par des événements métaboliques se déroulant dans le **biofilm buccal** (plaque dentaire) recouvrant la zone affectée (16).

La formation de la carie dépend principalement de trois facteurs principaux décrits par Keyes en 1962 et modifié par Newbrun en 1978 (Figure 9) :

- Le terrain (l'hôte)
- La microflore (les bactéries)
- Le temps
- L'environnement (le temps et le régime alimentaire)

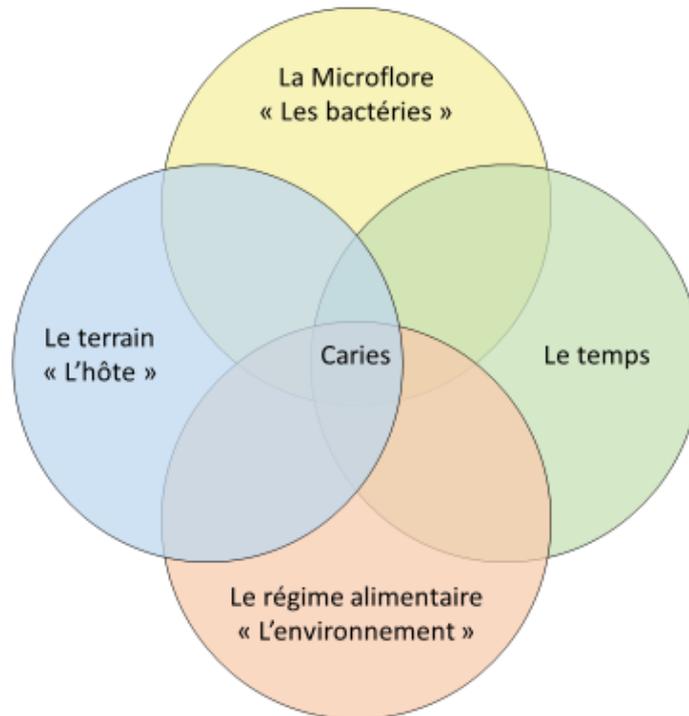


Figure 9. Diagramme de Keyes modifié par Newbrun (1978)

La susceptibilité de l'hôte dépend de la composition et la structure minérale de l'émail, de la quantité et de la qualité de la salive et de sa réponse immunitaire.

Les principaux agents microbiens impliqués dans le processus carieux sont :

- *Streptococcus mutans*
- *Lactobacillus spp* (spp = plusieurs espèces)
- *Actinomyces spp*

Lorsque l'équilibre intrabuccal est rompu, les espèces acidogènes prédominent (*Lactobacillus* et *S. mutans* en font partie) et la sécrétion d'acides à partir d'hydrates de carbone augmente. Cette augmentation entraîne une diminution du pH de l'environnement buccal en dessous du seuil critique (pH 5,5), la reminéralisation et le pouvoir tampon de la salive ne suffisent plus à s'opposer à la dissolution de l'émail ce qui provoque la formation de cavités sur les surfaces dentaires. Les bactéries pénètrent dans la dentine puis dans la pulpe si le processus carieux n'est pas stoppé (17).

1.1.3 Développement carieux

Les colonisateurs précoces des surfaces dentaires sont les espèces du genre *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Haemophilus*, *Neisseria* et *Veillonella* (11). Après cavitation, une sélection bactérienne s'effectue en l'espace de 4 semaines : le nombre de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus casei* augmente de 1 à 5% et la proportion de *Streptococcus mutans* diminue. Lorsque la carie atteint la dentine, la proportion d'*Actinomyces* et de *Lactobacillus* augmente fortement jusqu'à égaler celle de *Streptococcus*. *Lactobacillus* est en contact avec la dentine tandis que *Streptococcus mutans* reste à l'interface avec la salive (11). De nombreuses recherches ont suggéré que *Streptococcus mutans* est le principal agent pathogène de la carie dentaire humaine. En effet, les *Streptococcus mutans* sont fréquemment isolés des cavités de lésions carieuses, ils induisent la formation de caries chez les animaux nourris avec une alimentation riche en saccharose, ils sont acidogènes et acidophiles et ils sont capables de produire des protéoglycanes qui favorisent l'adhésion bactérienne à la surface des dents et entre elles. Les travaux de Tanzer et al (18) confirment le rôle central de *Streptococcus mutans* dans l'initiation des caries dentaires de l'émail et des surfaces radiculaires (11). Cependant, de récentes études indiquent que les bactéries acidophiles autre que *Streptococcus mutans*, les streptocoques non mutans et les *Actinomyces* sont aussi responsables de l'initiation de la carie comme *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces gerencseriae* et *Veillonella spp* (11,19). *Streptococcus mutans* est principalement retrouvé dans les lésions carieuses précoces alors que *Lactobacillus* est l'espèce majoritaire dans les caries profondes (8,20,21).

Le processus carieux commence toujours par une déminéralisation chimique locale des tissus durs à la surface de la dent, ce phénomène n'est visible qu'au microscope. La progression du processus carieux peut impliquer l'émail, la dentine ou le cément. Le diagnostic clinique est difficile lorsque les surfaces paraissent intactes à l'échelle macroscopique. Les caries peuvent affecter toutes les structures dentaires, préférentiellement dans les zones de stagnation de la plaque. Le premier signe clinique d'apparition d'une lésion carieuse est la tâche blanche (ou « white spot »), cette lésion est composée d'un corps poreux recouvert d'une zone de surface minéralisée. La lésion progresse le long des prismes d'émail et son aspect permet d'évaluer son activité : une lésion mate et poreuse caractérise une lésion active tandis qu'une surface lisse et brillante ou un aspect brun reflètent une faible activité et une progression lente. Lorsque la lésion atteint la dentine, sa progression est facilitée le long des tubuli en direction de la pulpe. La dentine « **circumpulpaire** » (portion de dentine adjacente à la pulpe) est constituée de la dentine **inter-tubulaire** (entre les tubuli) et la dentine **intra-tubulaire** (dentine hyperminéralisée déposée secondairement à l'intérieur du tubulus) ce qui induit une diminution de son diamètre (Figure 10). La diminution du diamètre est d'autant plus importante que l'on s'éloigne de la pulpe. Cette dentine contribue au ralentissement de la progression carieuse par sa nature plus résistante aux attaques acides et en limitant la diffusion des bactéries de plus gros diamètre à travers la lumière tubulaire dans le cas de caries peu profondes.

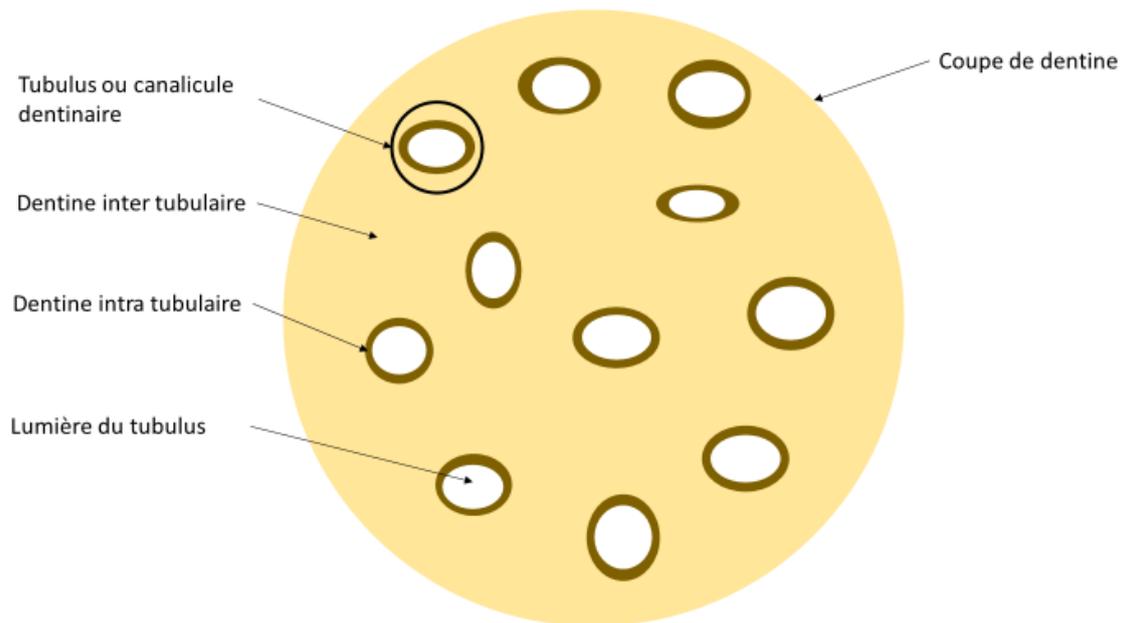


Figure 10. Représentation schématique de la structure de la dentine circumpulpaire ou orthodentine (Illustration personnelle d'après (24)).

Les lésions dans la dentine inter-tubulaire progressent deux fois plus vite que dans l'émail (22). La dentine cariée est constituée de deux couches : la dentine infectée, non reminéralisable et la dentine affectée, potentiellement reminéralisable. La **dentine infectée** est la partie superficielle de la carie avec une dentine décomposée et colonisée par les bactéries et leurs métabolites. La **dentine affectée** est la partie la plus profonde de la carie, elle est partiellement déminéralisée et la structure collagénique est toujours présente (23,24). En réponse à la lésion carieuse, la pulpe est capable de synthétiser un tissu cicatriciel appelé **dentine tertiaire**. Cette dernière comprend deux types de dentines qui diffèrent par la nature de la réponse pulpaire observée, la structure de la dentine formée et le type de cellules impliqué : ce sont la **dentine réactionnelle** et la **dentine réparatrice**. La dentine réactionnelle est produite par les odontoblastes qui se sont différenciés au cours du développement du germe dentaire. Elle est rencontrée généralement sous les caries dentinaires initiales, peu profondes, évoluant lentement le long de la jonction émail-dentine, c'est une dentine hyperminéralisée avec des tubuli partiellement ou totalement obstrués par des dépôts minéraux (25,26). Lorsque la progression carieuse s'accélère, la carie passant d'un stade de lésion chronique à un stade de lésion active, la dentine réactionnelle sclérotique est détruite et des signes d'atteintes pulpaires apparaissent. Il se produit alors une nécrose des odontoblastes en regard de la lésion carieuse (27). La pulpe est capable de produire une barrière dentinaire : la **dentine réparatrice**, cette dernière est fabriquée lorsque la carie atteint la pulpe et sa formation est facilitée lorsqu'un coiffage pulpaire est réalisé. Les conditions permettant la mise en place de cette barrière sont l'absence de réactions inflammatoires sévères, une densité suffisante de cellules, une vascularisation adéquate dans la pulpe et un matériau de coiffage biocompatible et bioactif. À proximité de la pulpe lésée et activés par certaines molécules du complément, les cellules souches et les fibroblastes pulpaires de la région sous-odontoblastique vont se diviser, puis migrer au contact de la zone de nécrose. Ils se différencient en odontoblastes de remplacement ou odontoblastes de deuxième génération qui vont produire de la dentine réparatrice et former un pont dentinaire minéralisé (28).

1.2 LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE LA LESION CARIEUSE

1.2.1 Modèles de déminéralisation

Il existe quatre modèles différents pour étudier les effets de la déminéralisation (29–31) :

- La déminéralisation chimique *in vitro*
- La déminéralisation biologique *in vitro*
- La déminéralisation *in situ*
- La déminéralisation *in vivo* (étude clinique)

1.2.1.1 La déminéralisation chimique *in vitro*

Une solution tampon à pH acide, généralement de l'acide lactique, formique ou propionique (15) est mise en contact avec un échantillon de tissu dentaire. La déminéralisation est mise en évidence après 2 à 15 semaines d'incubation grâce à des tests de dureté, à la microscopie à lumière polarisée, à la microradiographie ou à la microscopie à laser confocal (30). Cette déminéralisation peut être induite à l'aide de deux procédés : une déminéralisation statique ou cyclique. La déminéralisation cyclique alterne des cycles de déminéralisation/reminéralisation grâce à une variation de pH mimant les événements de la cavité orale tandis que la déminéralisation statique ne fait pas intervenir d'étape de reminéralisation. Les avantages de ce modèle sont sa rapidité et simplicité de mise en place, son coût peu élevé et sa reproductibilité. En revanche c'est le modèle avec le moins de corrélation avec la réalité car il ne mime pas la formation du biofilm qui est l'élément clé dans la formation de lésions.

1.2.1.2 La déminéralisation biologique

Elle met en jeu des mono ou cocultures de biofilms bactériens incubés dans des conditions similaires à la cavité orale. La majeure partie des études utilise *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus casei* ou un microcosme extrait de salive humaine pour produire un biofilm complexe. La culture d'un microcosme complexe rend difficile l'identification des espèces et la quantification du nombre de bactéries impliquées dans le processus. Les effets de la déminéralisation biologique sur du tissu dentaire sont identiques à la déminéralisation chimique. Ce modèle est plus pertinent que le modèle chimique mais ne permet pas de faire varier le pH de façon cyclique.

1.2.1.3 La déminéralisation *in situ*

Elle est faite sur des échantillons de dents incubés directement dans la bouche de patients volontaires, cela permet un contact direct avec l'environnement buccal. Les patients doivent tremper l'appareil dans une solution sucrée 8 à 10 fois par jour pour mimer des conditions à haut risque carieux. Les effets de la déminéralisation sont observés par les mêmes techniques citées précédemment. Ce modèle permet une meilleure pertinence que les modèles *in vitro*, cependant leur temps de mise en place est plus long, plus coûteux et dépend de la compliance du patient.

1.2.1.4 La déminéralisation *in vivo*

Ce protocole est très complexe à mettre en place et très peu de questions peuvent être traitées à cause des nombreux problèmes éthiques que soulèvent ces expérimentations, ils sont cependant les plus proches de la réalité clinique lorsqu'ils sont accessibles.

1.2.2 Modèle d'étude du biofilm carieux

Il existe plusieurs techniques d'études *in vitro* de la carie via l'étude du biofilm bactérien (32) illustrées à l'aide de 3 modèles : les modèles fermés, les modèles ouverts et les modèles à bioréacteurs.

1.2.2.1 Les modèles fermés :

Les modèles fermés sont les plus simples et rapides à réaliser. Ils ont cependant le défaut de s'éloigner des conditions réelles de la formation du biofilm *in vivo*.

Le modèle sur **boîte d'Agar** est le plus simple des modèles de biofilm. Il consiste à faire pousser des colonies bactériennes sur une matrice extracellulaire d'agar. Ce modèle a été utilisé pour déterminer la sensibilité des bactéries buccales aux produits chimiques (33,34).

Le modèle sur **plaque multi-puits** permet d'obtenir une grande quantité de résultats. Les bactéries peuvent être cultivées en conditions aérobies ou anaérobies, avec ou sans agitation, soit en monocultures, cocultures ou un panel de bactéries définies cultivables dans les mêmes conditions. La sensibilité du biofilm à divers agents chimiques et à différentes concentrations peut être testée. Les modèles multi puits ont été utilisés pour tester l'effet d'enzymes hydrolytiques comme potentiels produits de contrôle de plaque (35,36).

1.2.2.2 Les modèles ouverts :

Ils permettent un accès continu du milieu de croissance et des nutriments aux bactéries et une élimination des déchets du système. Ces modèles permettent la croissance bactérienne dans un état d'équilibre où la densité bactérienne, la concentration en substrat et les produits métaboliques sont maintenus constants.

La **chambre d'écoulement** consiste en un réservoir de milieu relié à une ou plusieurs chambres de profondeur fixe (37,38). Les chambres sont inoculées avec une culture bactérienne avant d'installer le réservoir de milieu. Ce modèle permet de tester la formation de biofilm sur une ou plusieurs espèces bactériennes différentes.

Le modèle de culture sur **fermenteur à profondeur constante** (CDFF) permet d'éliminer la variable du temps lorsqu'on étudie la sensibilité du biofilm à un produit (39).

La **bouche artificielle** simule les conditions de l'environnement microbien oral *in vivo* dans des conditions expérimentales contrôlées, permettant de se rapprocher des conditions idéales de formation du biofilm buccal (40).

1.2.2.3 Les modèles à bioréacteurs :

Les modèles à **bioréacteurs** sont des systèmes de culture où le milieu neuf est délivré à la même vitesse que l'élimination du milieu usé. Le volume de culture est constant tout en renouvelant les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne et en éliminant les produits du métabolisme et les excès de milieu. Parmi ces modèles il existe le **réacteur à biofilms** (13), les **bouches artificielles contrôlées par ordinateur** (AMCC) (41) et les **cultures continues multi stations** (MSCBM) (42).

1.2.3 Modèle de carie simplifié

Parallèlement aux recherches sur le biofilm carieux, d'autres équipes se sont concentrées sur la confection d'un modèle d'étude « *ex vivo* ». Les tests *in vitro* diffèrent des tests *ex vivo* car ces derniers utilisent un tissu ou un organe intact maintenu vivant pendant une courte durée dans un milieu de culture. Ils permettent l'étude des propriétés cariogéniques du biofilm comme sa composition microbienne et biochimique ou sa structure (arrangement spatial des bactéries et matrice extracellulaire). L'ensemble des modèles microbiens est à ce jour utilisé pour étudier la

déminéralisation (ou l'inhibition de la déminéralisation). Il existe de nombreux modèles microbiens décrits dans la littérature, ils sont classés selon différentes conditions comme le nombre d'espèces de bactéries utilisées (mono ou multi espèces), le temps d'exposition du modèle (court ou long), le type d'exposition au sucre (continu ou intermittent) et le type de culture (statique ou flux continu). Il existe deux grandes catégories : les **modèles statiques** et les **modèles continus** (43).

Le modèle statique est proposé par Ccahuana-Vasquez et Curry (44). Il permet l'étude des effets de la chlorhexidine sur le biofilm bactérien. La déminéralisation est évaluée grâce à l'utilisation de tranches de dentine ou d'émail. L'échantillon est suspendu dans le milieu permettant l'adhésion des bactéries durant les premières phases de formation du biofilm, il permet de déterminer le pH du milieu, de détecter la concentration en calcium pour évaluer la déminéralisation et de quantifier la présence de produits métaboliques bactériens. Ce modèle est utilisé pour démontrer l'effet du fluor sur la diminution de la déminéralisation, l'effet antimicrobien du fer et d'autres produits naturels, le potentiel cariogénique d'une alimentation riche en sucres et l'effet du dentifrice sur la stabilité du biofilm (43,45–52). (Figure 11).

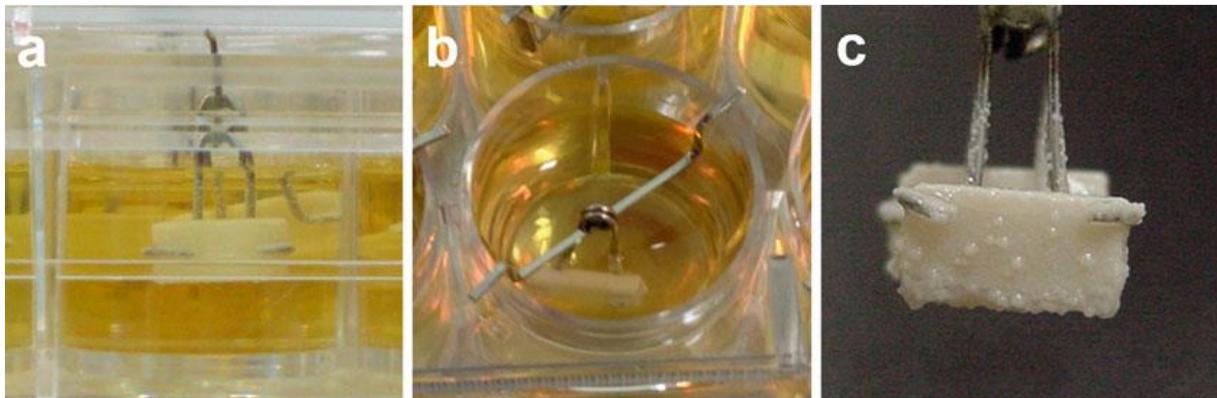


Figure 11. Tranches de dentines suspendues dans un milieu de croissance permettant la formation du biofilm (a, b) les bactéries adhérentes à la tranche de dentine vont former le biofilm (c) (43).

Le modèle continu ou modèle microbien à flux continu est mis au point récemment par Amaechi *et al.* Il reprend toutes les caractéristiques du modèle statique mais le milieu de culture est en débit continu au contact de la tranche de dentine pour simuler la salive dans les conditions *in vivo*. Ce modèle permet d'évaluer les effets de produits anti-carieux sur la réduction de la déminéralisation (53,54). Ce sont ces modèles qui nous ont inspirés pour la création du modèle de carie sur dent entière présenté dans notre travail.

Les études *in vivo* sur l'animal et sur l'humain sont plus rares, liées aux problèmes éthiques qu'engendre ce genre d'expérimentation (40). Des essais sur des rats sont menés pour établir le lien de la nicotine sur le risque carieux (55) ou l'incidence de *Streptococcus mutans* dans la sévérité des caries (56). Une seule étude est menée chez l'humain : des disques de dentine stérilisés issus de dents de bovins sont incubés dans la bouche de volontaires au contact des dents postérieures afin de recréer le plus fidèlement possible les conditions ad hoc de la formation de la carie (57). Les études cliniques sont considérées comme le « gold standard » pour l'évaluation des propriétés et des performances des matériaux dentaires (58). En contrepartie, ce type d'étude est cher, requiert une période d'évaluation plus longue et est particulièrement soumis à l'effet opérateur (59). En outre, lorsqu'il s'agit d'études sur l'humain, certains aspects de l'expérimentation de la carie, comme l'utilisation de protocoles favorisant la formation de caries sur un sujet sont incompatibles avec l'éthique (60).

1.3 INTERETS ET LIMITES DES MODELES EXISTANTS

1.3.1 Intérêt des modèles

La carie dentaire est une maladie qui affecte une personne sur deux (61). À la suite du diagnostic d'une carie, il existe des moyens de minimiser les dommages causés. Les différents modèles de biofilms présentent une manière éthique d'explorer de nouvelles opportunités d'étude et de combattre la carie dentaire. Le développement des divers modèles de biofilm ont permis de mieux comprendre la cinétique de sa formation ainsi que sa composition. A titre d'exemples, les modèles d'étude de la carie sont utilisés pour mieux contrôler le pH dans la cavité buccale, pour améliorer la reminéralisation de l'émail et de la dentine, pour inhiber la croissance des bactéries cariogènes ou leur métabolisme pour les rendre moins nocives (62).

L'évolution des connaissances sur la réponse du complexe dentino-pulpaire ont permis de développer de nouvelles techniques de traitement de la carie. Il est admis aujourd'hui que l'excavation partielle (ou approche « **stepwise** ») du tissu carieux est préférable à une excavation totale, réduisant le risque d'atteinte pulpaire et augmentant le pronostic de conservation de la dent à long terme (63,64). A l'avenir les modèles de biofilm pourraient être utilisés pour développer une nouvelle génération de matériaux de restauration dentaire et de coiffage pulpaire ou de minimiser la formation de caries secondaires (65,66).

1.3.2 Limite des modèles

L'utilisation de modèles d'études *in vitro* facilite l'expérimentation au détriment de la pertinence clinique. Les modèles *in vitro* ne permettent pas de mettre en lumière toutes les variables présentes dans la réalité clinique. Ils sont simplifiés par l'utilisation de tranches de dents ou par l'utilisation d'une seule espèce bactérienne pour simuler la formation du biofilm carieux, ainsi, chaque modèle permet de répondre à une question spécifique (45). Dans la littérature, il n'existe pas de modèle simulant une carie sur dent vivante humaine entière.

L'objectif de ce travail est de développer un modèle de simulation de la carie dentaire sur des dents humaines saines, extraites pour raisons orthodontiques et maintenues vivantes dans un milieu de culture. Cette simulation de la carie *ex vivo* sur dent entière permettra d'évaluer les effets antibactériens des différents biomatériaux utilisés en chirurgie dentaire et d'étudier dans le même temps leur biocompatibilité au contact de la pulpe sur des dents cariées artificiellement. A ce jour, seuls des modèles sur dents saines ont été proposés (67).

2 Matériels et méthodes

2.1 Conception expérimentale

L'expérimentation consiste à incuber des dents de sagesse extraites en bloc opératoire et indemnes de lésion carieuse avec une suspension de *Streptococcus mutans* afin d'observer une déminéralisation d'origine bactérienne et la colonisation des bactéries dans les tubuli dentinaires à l'interface de la lésion formée dans une cavité réalisée artificiellement. Au terme de chaque période de culture, la formation des zones de déminéralisation est étudiée à la fluorescence. Les dents sont ensuite déminéralisées dans un bain d'acide et coulées en bloc de paraffine. Des coupes histologiques sont réalisées à partir des dents mises en bloc de paraffine pour observer la présence de bactéries au microscope et par marquage immunohistochimique.

Le détail des méthodes employées est exposé dans les paragraphes suivants.

2.2 Culture de dents entières humaines

Des dents de sagesse extraites en bloc opératoire et indemnes de lésion carieuse sont prélevées, stockées à 4°C dans du milieu de culture de cellules eucaryotes, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) additionnées d'antibiotique (pénicilline 400UI/ml et streptomycine 400µm/ml) et d'antifongique (amphotéricine B 0,75µg/ml) et transportées au laboratoire pour l'expérimentation. Après avoir éliminé les débris du sac péri-coronaire, les structures ligamentaires et péri-apicales, les dents sont nettoyées avec une solution tampon Phosphate Buffer Saline (PBS). Une cavité est réalisée sur chacune des dents à l'aide d'une fraise tronconique diamantée montée sur turbine sous irrigation (Figure 12).

Les cavités dentinaires sont préparées au centre de la face occlusale de chaque dent, suffisamment larges et profondes pour permettre un contact entre la dentine cavitaire et le milieu de culture sans toutefois provoquer d'effraction pulpaire.

Un tube Eppendorf 1,5mL est placé contre la face occlusale de la dent afin de créer un réservoir au contact de la cavité. Le montage est étanchéifié avec du ruban en téflon et des bandelettes de parafilm (Figure 13).



Figure 12. Cavité dentinaire sur la face occlusale

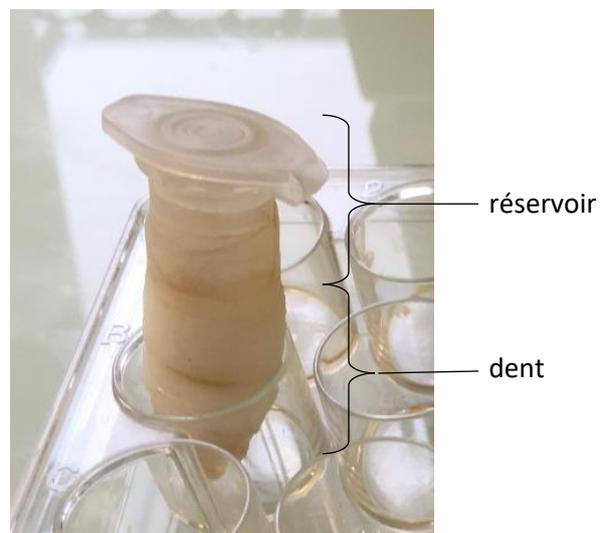


Figure 13. Assemblage du réservoir sur la dent

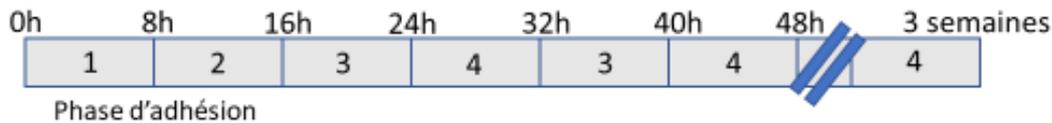
Une solution de MEM (10mL) supplémentée avec 10% de Sérum de Vœux Fœtal (SVF), 400UI/mL de pénicilline, 400µg/mL de streptomycine, 0.50 µg/mL d'amphotéricine B et 2mM de L-glutamine est placée dans le fond d'un tube Falcon stérile de 50mL. Le montage est suspendu à l'aide d'un fil dentaire dans le tube Falcon de manière à immerger seulement les racines de la dent dans la solution de MEM (Figure 14).



Figure 14. Montage du modèle de carie

De cette manière, le tissu pulpaire reste vivant grâce à la diffusion par les racines de ce milieu de culture dans la chambre pulpaire.

De la salive prélevée sur un expérimentateur puis filtrée est incubée over-night à 37°C dans des tubes Eppendorf (300µL/tube). Une suspension fraîche de *S. mutans* en BHI (Brain Heart Infusion) en phase exponentielle de croissance, lorsque leur viabilité est maximale (DO 0.6) est diluée au 1/500ème en milieu BHI + 1% sucrose. Cette solution bactérienne est incubée dans le tube Eppendorf durant 8 heures à 37°C, 5% CO₂, c'est la phase d'adhésion des bactéries à l'émail. Une fois la phase d'adhésion terminée, le milieu de culture est changé par du milieu BHI classique, c'est la phase de jeûne. Après 24 heures d'incubation, les bactéries reçoivent des bains de milieu BHI supplémenté de 10% sucrose 8 fois par jour, durant 3min. Une alternance de phase de jeûne et de bains de sucres sont réalisées sur 28 jours. Le pH du milieu est mesuré entre les changements de bain de BHI et chaque matin à l'aide d'un papier pH. Ce protocole a été mis au point par Bennett T. Amaechi et al. et schématisé dans la Figure 15 suivante :



1	Incubation avec 30ml d'extrait salivaire filtré à 0,22µm
2	Inoculation de 100µl de solution bactérienne <i>S. mutans</i> (DO ₆₀₀ 1,6) + BHI 1% sucrose filtré à 0,22µm
3	Remplacement de la solution de BHI
4	Bains de sucrose 10% pendant 3 minutes 8 fois par jour pendant 3 semaines

Figure 15. Protocole de culture de dents humaines d'après (45).

Une dent « témoin » a suivi le même traitement précédemment décrit à l'exception que *S.mutans* n'a pas été ajouté dans la phase d'adhésion.

2.3 Analyse du biofilm

Après trois semaines d'incubation, le biofilm accumulé est photographié au microscope puis récupéré par grattage et re-suspendu dans de l'eau stérile pour étalement sur boîte de pétri et coloration de Gram.

2.4 Analyse de la déminéralisation

La déminéralisation est étudiée par radiographie avant le début de l'expérience, à 5 jours d'incubation et à 3 semaines, le temps d'exposition radiographique est identique pour chaque cliché réalisé afin de pouvoir comparer et quantifier la déminéralisation dans le temps. La déminéralisation est évaluée par diminution de la radio-opacité de la dent au niveau de la zone d'intérêt.

La déminéralisation est également évaluée grâce à un outil de diagnostic de détection des caries par auto-fluorescence de la dent : le système SOPROLIFE®. Une carie active profonde apparaîtra vert/noir en fluorescence tandis qu'une carie superficielle apparaîtra rouge dans la dentine infectée. Dans la dentine affectée, un processus carieux lent apparaîtra vert/gris (Figure 16).

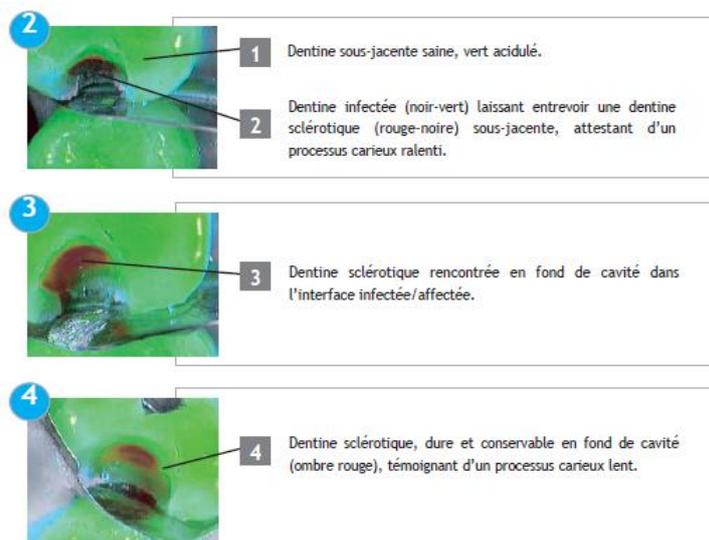


Figure 16. Schéma de diagnostic du système Soprolife®

2.5 Coupes histologiques des tissus déminéralisés

Au terme de la période de culture (21 jours), les dents sont nettoyées à la seringue Air/Eau puis fixées au formol 4% pendant 7 jours et enfin déminéralisées dans un bain de formiate de sodium pendant 21 jours. La déminéralisation est contrôlée par un cliché radiographique numérique et la solution de déminéralisation est renouvelée toutes les semaines.

Les dents sont ensuite rincées à l'eau distillée sous agitation pendant 8h, puis déshydratées par des passages dans des bains d'alcool à 70°, 95° puis 100° (24 heures chacun). Après un passage dans un bain de xylène (4 heures), les dents sont imprégnées par la paraffine liquide (2 bains de 12h en étuve à 60°) et finalement incluses dans des blocs de paraffine (Figure 17).

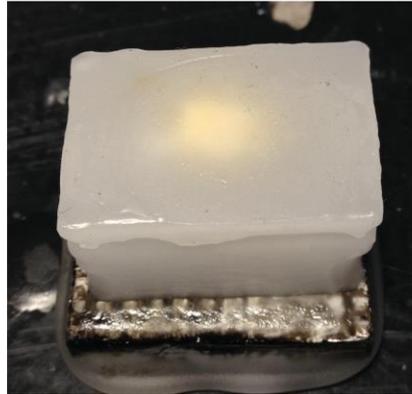


Figure 17. Dent mise en bloc de paraffine.

Des coupes sériées de 6µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome (Minot Leitz 1512, Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France) muni d'une lame D à 6° d'inclinaison. Les coupes sont montées sur des lames (Superfrost Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Allemagne), étalées à l'aide d'eau distillée sur une plaque chauffante (46°C) puis placées dans un séchoir à lame pendant 20 minutes à 60°C (Figure 18).

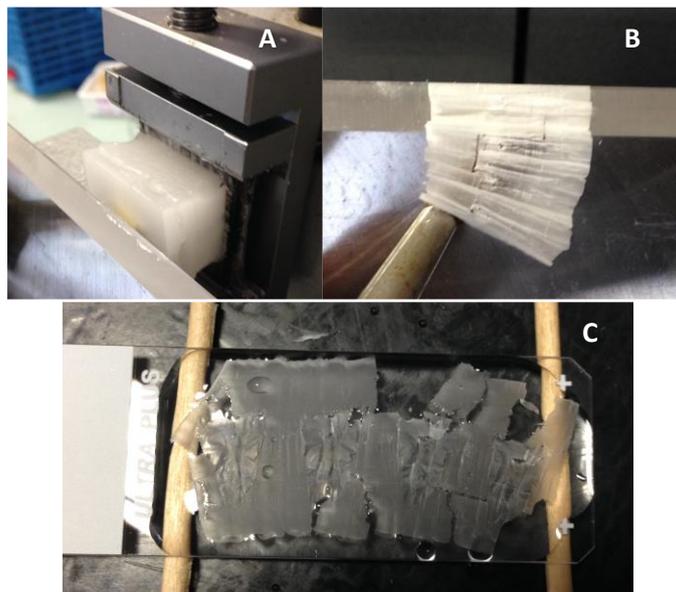


Figure 18. Illustration des coupes au microtome. A = Bloc monté sur le microtome. B = échantillon découpé. C = montage de l'échantillon sur lame de microscope.

Pour chaque dent, des colorations histologiques sont réalisées à l'Hématoxyline-Eosine et à la coloration de Gram.

2.6 Coloration de Gram sur frottis bactérien

Cette coloration permet de différencier les bactéries à Gram positif (en violet) et les bactéries à Gram négatif (en rose) (Figure 19). La différence entre les deux types de bactéries est basée sur la composition en peptidoglycanes et le nombre de paroi. Les bactéries à Gram positif ont une multitude de peptidoglycanes sur leur unique paroi tandis que les bactéries à Gram négatif possèdent deux parois comprenant une faible quantité de peptidoglycanes en surface.

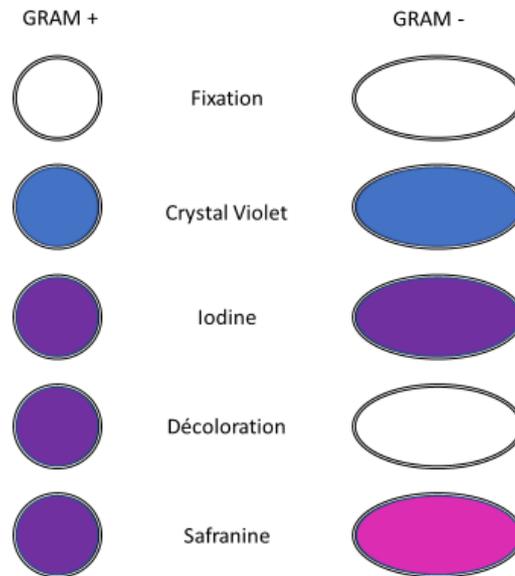


Figure 19. Schéma de la coloration de Gram

Les frottis sont récupérés sur le biofilm accumulé à l'intérieur du réservoir bactérien du montage présenté dans le chapitre [2.2 Culture de dents entières humaines](#). La procédure de coloration est détaillée ci-après :

- Crystal Violet, 1 minute
- Lavage à l'eau distillée, 1 minute
- Solution iodée de Gram, 5 minutes
- Lavage à l'eau distillée, 1 minute
- Différenciation dans l'alcool 100%, 10 secondes
- Lavage à l'eau distillée, 1 minute
- Safranine, 30-60 secondes
- Lavage à l'eau distillée, 1 minute
- Tartrazine, 5-10 secondes
- Lavage à l'alcool 100%, 10 secondes
- Xylène, 2 minutes
- Milieu de montage (Lemonvitrex®) entre lame et lamelle couvre objet

2.7 Immunofluorescence sur coupes histologiques

Les marquages fluorescents sur coupes de dents ont été utilisés pour détecter l'ADN bactérien à l'interface de déminéralisation dentinaire à l'aide d'un marqueur des séquences riches en Adénine et Thymines d'ADN : le DAPI.

Les coupes sélectionnées ont été déparaffinées comme décrit précédemment. Après réhydratation, les coupes ont été plongées dans un bain de PBS pendant 5 minutes. Les coupes ont été incubées avec 1 µg/mL de DAPI. Après 45mn d'incubation, les coupes sont rincées 3 fois en PBS et montées entre lames et lamelles avec un milieu de montage aqueux, Glycergel Mounting Medium (Dako® CA, USA).

3 Résultats

3.1 Mesure du pH au cours du temps

Le graphique ci-dessous représente la valeur de pH du milieu bactérien dans le modèle. Le pH diminue rapidement et atteint le seuil critique de pH 5,5 après 6h d'incubation. Il y a ensuite une stagnation du pH à 5 (Figure 20).

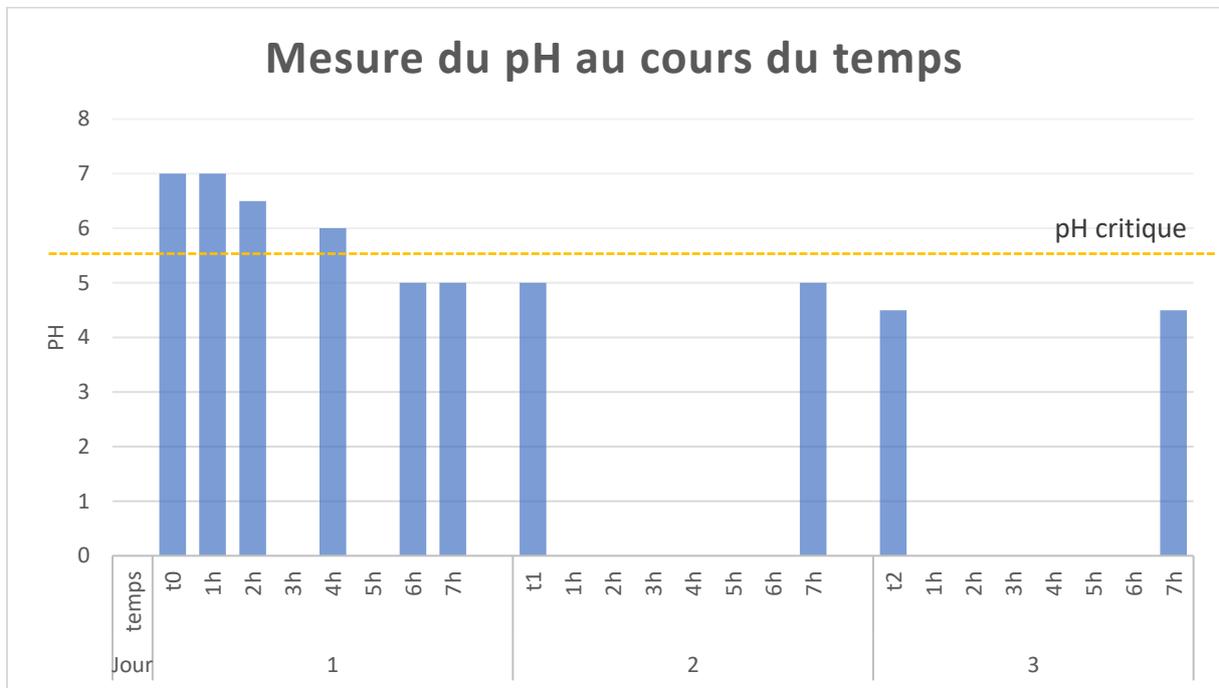


Figure 20. Mesure du pH au cours du temps

3.2 Mise en évidence radiographique de la déminéralisation

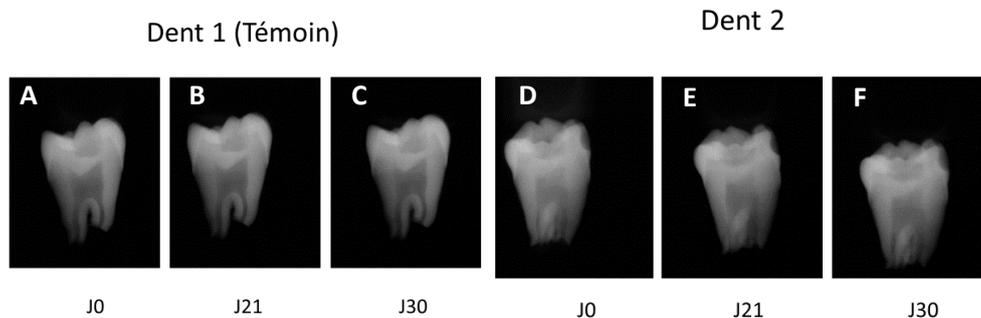


Figure 21. Mise en évidence radiographique de la déminéralisation. A-F = radiographies à différents jours d'incubation

Il n'existe pas de variation de la radio-opacité des dents testées après un mois de déminéralisation. Ce modèle de culture ne permet pas de valider la déminéralisation radiographiquement (Figure 21).

3.3 Mise en évidence photographique de la croissance bactérienne

Rappel : En lumière naturelle, les zones de déminéralisation amélaire apparaissent blanches (Figure 22).

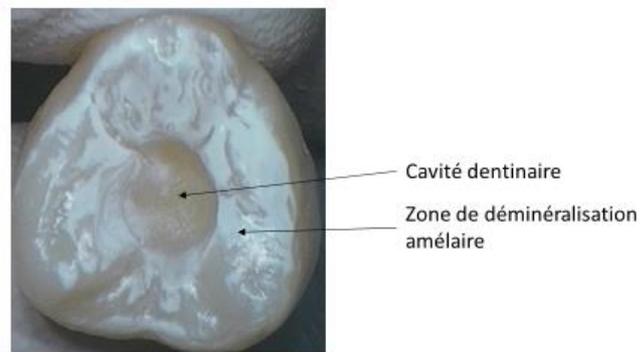


Figure 22. Mise en évidence photographique de la déminéralisation en lumière naturelle

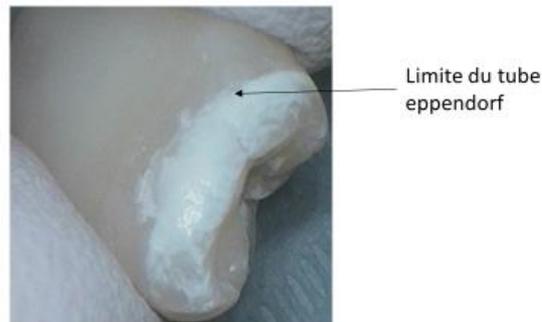


Figure 23. Mise en évidence photographique de la déminéralisation en lumière naturelle

La zone de délimitation du tube Eppendorf® au contact de la dent est très clairement visible (Figure 23).

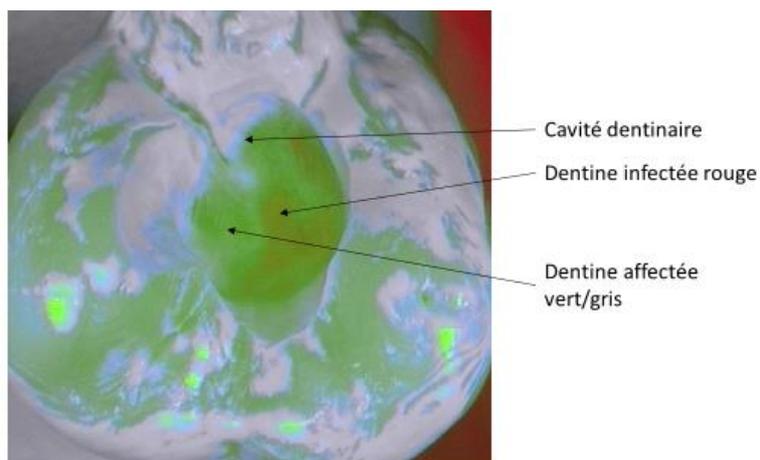


Figure 24. Mise en évidence photographique de la déminéralisation en lumière fluorescente

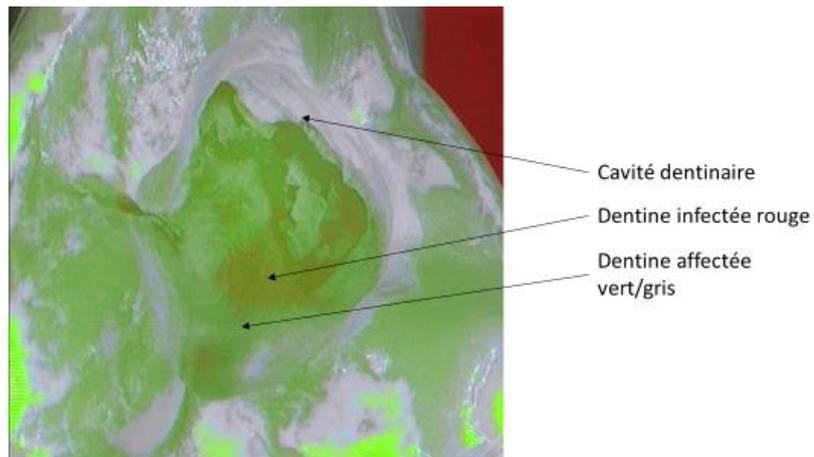


Figure 25. Mise en évidence photographique de la déminéralisation en lumière fluorescente

Il existe des zones de déminéralisations mises en évidence par le système Soprolife® (Figures 24 et 25).

3.4 Croissance du biofilm bactérien sur le modèle et identification des espèces bactériennes

3.4.1 Croissance du biofilm bactérien

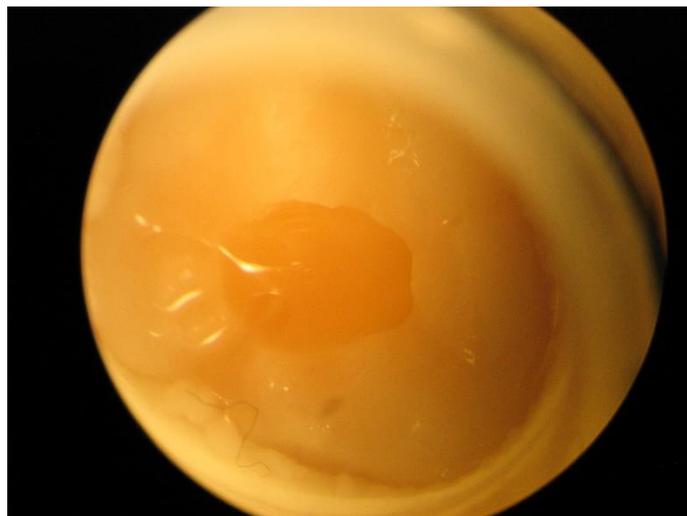


Figure 26. Cavité de la dent témoin

La Figure 26 illustre la cavité réalisée sur la dent témoin n'ayant pas reçu d'inoculation bactérienne. Il n'y a aucune formation de biofilm ni présence de plaque à l'issue des 30 jours d'incubation.

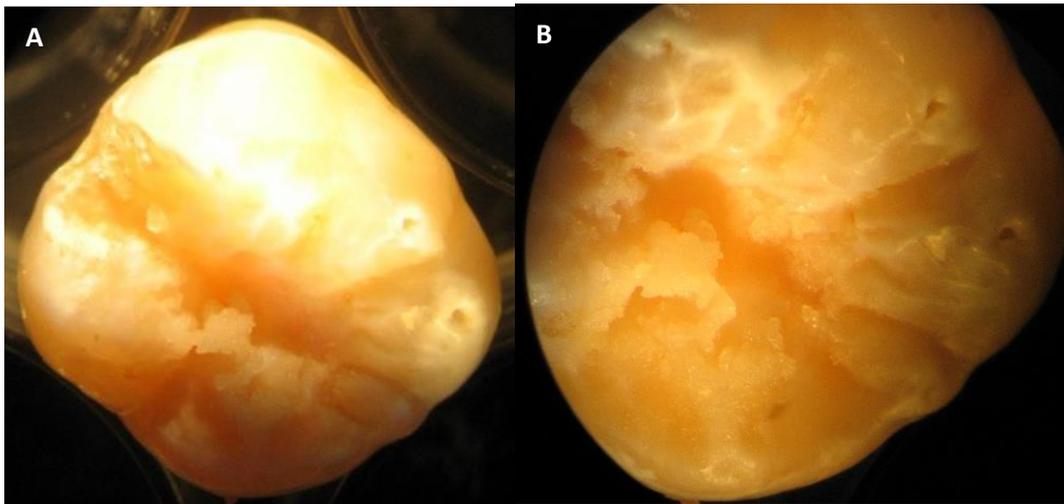


Figure 27. Présence de biofilm bactérien sur la face occlusale A-B = dents testées.

La Figure 27 représente une dent incubée pendant 3 semaines selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.2 Culture de dents entières humaines. La présence d'un biofilm bactérien est clairement visible au microscope optique. Ce biofilm est récupéré pour une étude par étalement sur boîte de pétri et par coloration de Gram afin d'identifier les espèces bactériennes présentes.

3.4.2 Identification des espèces par coloration de Gram

La Figure 28 révèle en grande majorité des bactéries de forme cocci de couleur violette (identifiées Gram + par la coloration de Gram) qui correspondent à notre inoculation de départ comprenant uniquement *Streptococcus mutans*.

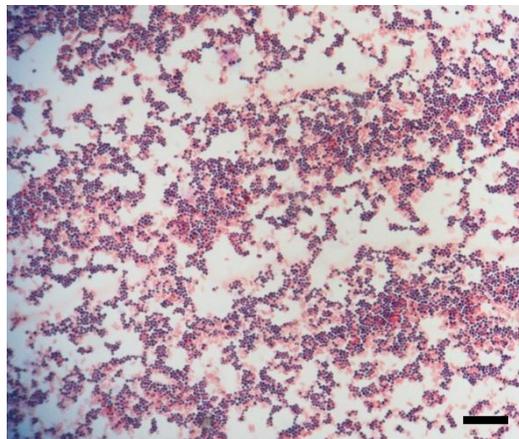


Figure 28. Observation microscopique (coloration de Gram) du biofilm formé à la surface des dents. Barre = 50µm.

Les différentes espèces observées sur l'étalement illustré sur la Figure 29 proviennent soit d'une contamination lors des différentes manipulations soit de l'échantillon salivaire utilisé dans la phase d'adhésion (la filtration ne pouvant assurer la stérilité de l'échantillon). Des coques Gram + (*S. mutans*), des bacilles Gram -, *P. aeruginosa* et quelques levures plus grosses et peu nombreuses : *C. albicans* sont visibles au microscope optique.

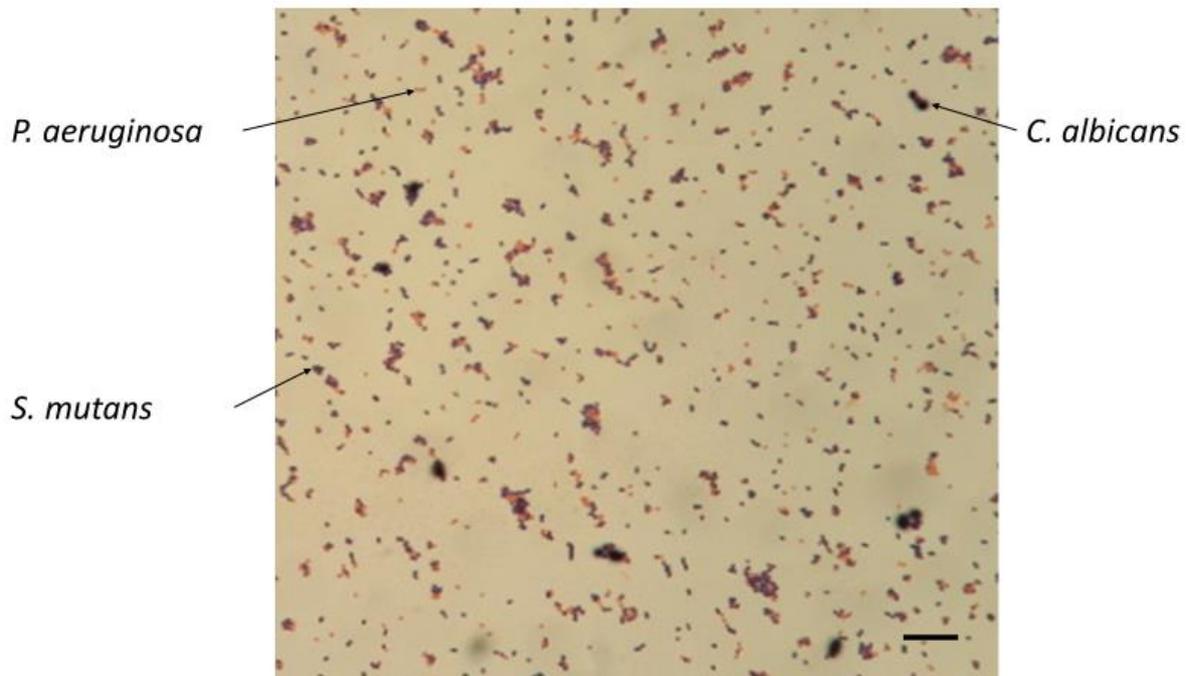
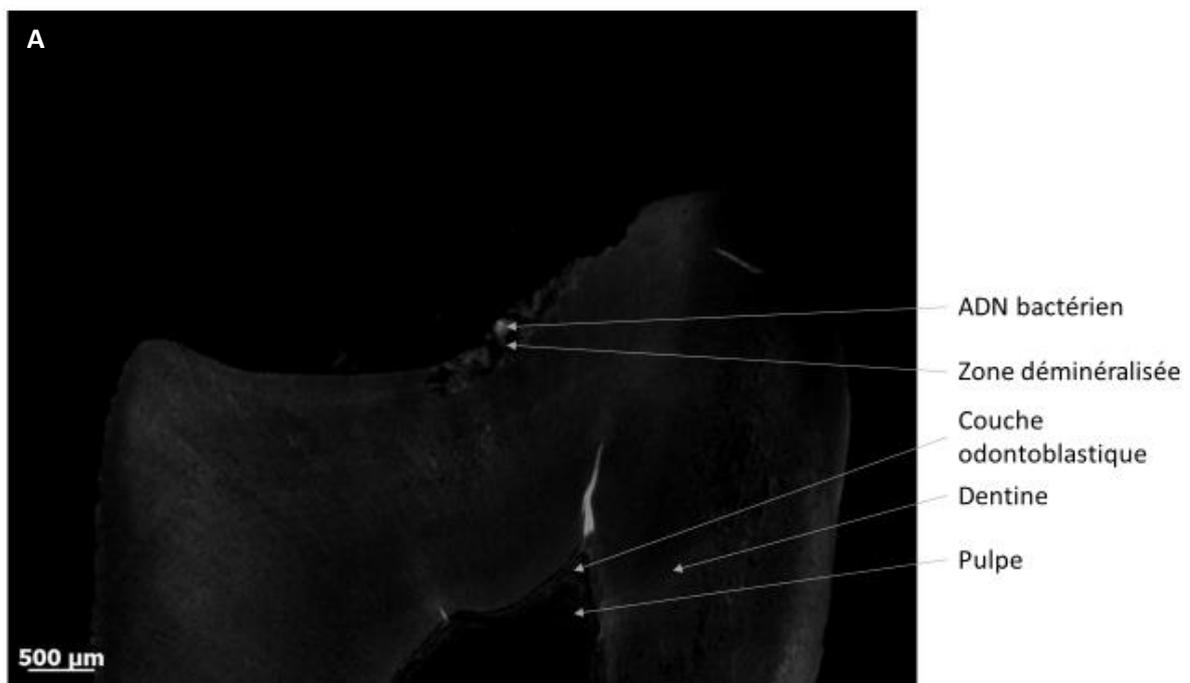


Figure 29. Observation microscopique (coloration de Gram) du biofilm formé à la surface des dents. Barre = 100µm.

3.5 Mise en évidence des bactéries à l'intérieur de la dentine infectée

La présence de bactéries à la surface et à l'intérieur de la coupe de dent est représentée par la fluorescence blanchâtre sur les photos.



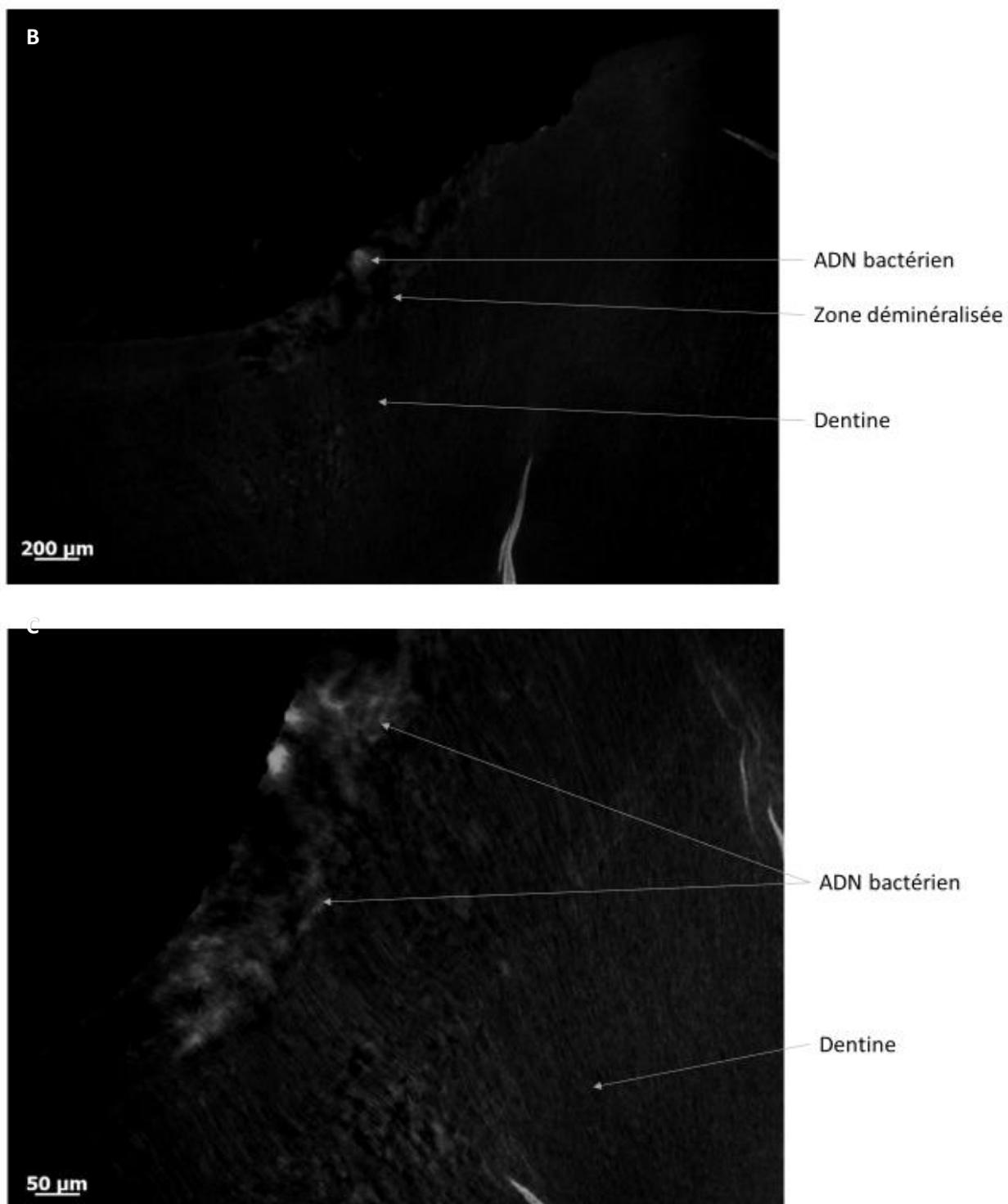


Figure 30. Marquage DAPI des coupes de dents. A-C = observations à différents grossissements.

L'apparition de taches blanches traduit la présence d'ADN bactérien sur la coupe de dent (Figure 30). Les bactéries ont colonisé les couches superficielles de dentine au niveau de la zone de déminéralisation.

4 Discussion

Cette étude a permis de montrer qu'une déminéralisation biologique d'origine bactérienne est possible à la surface d'une dent vivante humaine. Le délai de formation d'une zone de déminéralisation est réduit par rapport au processus carieux naturel. Les révélations immunohistochimiques réalisées au DAPI révèlent la présence d'ADN bactérien dans la dentine déminéralisée. Cet ADN ne peut être d'origine dentaire car la dentine superficielle est un tissu très minéralisé ne contenant que quelques prolongements odontoblastiques dépourvus de noyau. La diminution rapide du pH à l'interface de la cavité dentinaire lors de l'incubation bactérienne et la présence de bactéries dans les couches superficielles de dentine après 1 mois d'incubation suggère que la physiopathologie de la carie est imitée dans ce modèle expérimental.

Il existe de multiples modèles expérimentaux de la carie : *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*... Les avantages et limites de ces différents modèles sont détaillés dans la partie traitant les modèles d'études expérimentaux de la lésion carieuse. Parmi les modèles d'étude de carie simplifiée, aucun ne propose une approche sur dent cariée. Le modèle proposé dans cette étude permet d'apporter une caractéristique essentielle de l'étude de la physiopathologie carieuse : le biofilm bactérien.

Il est nécessaire de développer davantage ce modèle d'étude sur plusieurs aspects. Notamment développer un système d'observation radiologique de la déminéralisation et améliorer l'observation avec le système Soprolife®. Pour obtenir de meilleurs clichés, il faudrait prendre les photos en mode diagnostique dans une boîte complètement opaque afin d'éviter les artéfacts et les lumières parasites et au préalable avoir nettoyé les dents à étudier par aéro-polissage avec du bicarbonate pour éviter d'altérer la couche ramollie de dentine à l'intérieur de la cavité.

Le biofilm bactérien formé à la surface de la cavité dentinaire est formé d'une inoculation mono espèce (*Streptococcus mutans*), il est admis que la formation naturelle d'un biofilm est le résultat d'une cohabitation complexe entre diverses espèces bactériennes dont *S. mutans* est un colonisateur préférentiel des caries superficielles et *L. acidophilus* un colonisateur des caries profondes. Il serait intéressant dans un premier temps de tester notre modèle en modifiant la souche bactérienne pour ensuite créer un modèle de culture mettant en collaboration les trois espèces majoritaires de la formation précoce de la carie (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces naeslundii*). Ces différentes pistes permettraient d'améliorer la simulation de la physiopathologie carieuse *ex vivo*.

5 Conclusion

Ce travail s'inscrit dans un projet de recherche consacré à l'étude du complexe pulpo-dentinaire. Il contribue à l'amélioration d'un modèle original de culture de dents entières humaines *ex vivo* présenté dans les travaux d'Odile Téclès et Patrick Laurent (67,68). Ce modèle de culture permet d'évaluer la réponse de la pulpe face à des biomatériaux de coiffage pulpaire direct, afin de mieux comprendre les mécanismes qui concourent à la formation de la dentine réparatrice. Cette étude se base sur un modèle de dent saine pour exposer ses conclusions.

Notre travail contribue à développer un modèle de culture permettant d'inclure les bactéries responsables du processus carieux. Ce modèle, se rapprochant des conditions de formation de la carie *in vivo*, nous permet d'apporter des précisions sur les tests effectués jusqu'à présent sur des modèles de dents stériles et de mieux comprendre la cinétique de formation de la carie et le rôle des bactéries dans le processus de dégradation de la matrice collagénique dentinaire.

L'étude de l'effet des biomatériaux dentaires sur la physiopathologie pulpaire contribue à une meilleure compréhension et une meilleure optimisation des thérapeutiques visant à maintenir la vitalité de la pulpe, enjeu majeur de la dentisterie future.

6 Bibliographie

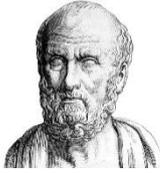
1. Maurice D. La dent, normale et pathologique Piette & Goldberg. /data/revues/0003438X/01190001/30/ [Internet]. 16 févr 2008 [cité 3 mars 2020]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/78011>
2. Basandi PS, Madammal RM, Adi RP, Donoghue M, Nayak S, Manickam S. Predentin thickness analysis in developing and developed permanent teeth. *J Nat Sci Biol Med.* 2015;6(2):310-3.
3. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 1998;9(2):179-200.
4. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* juin 2001;183(12):3770-83.
5. Marsh PD. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* juill 1994;8(2):263-71.
6. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From “Who Are They?” to “What Are They Doing?” *J Dent Res.* 1 déc 2015;94(12):1628-37.
7. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* mars 2017;44 Suppl 18:S12-22.
8. Badet C, Thebaud NB. Ecology of Lactobacilli in the Oral Cavity: A Review of Literature. *Open Microbiol J.* 19 mai 2008;2(1):38-48.
9. Nicolas GG, Lavoie MC. Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Can J Microbiol.* janv 2011;57(1):1-20.
10. Smith EG, Spatafora GA. Gene regulation in *S. mutans*: complex control in a complex environment. *J Dent Res.* févr 2012;91(2):133-41.
11. Takahashi N, Nyvad B. Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res.* 2008;42(6):409-18.
12. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.* juin 1980;44(2):331-84.
13. Rudney JD, Chen R, Lenton P, Li J, Li Y, Jones RS, et al. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J Appl Microbiol.* déc 2012;113(6):1540-53.
14. Kotsanos N, Darling AI, Levers BG, Tyler JE. Simulation of natural enamel caries in vitro with methylcellulose acid gels: effect of addition of calcium and phosphate ions. *J Biol Buccale.* sept 1989;17(3):159-65.
15. Featherstone J. Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J.* sept 2008;53(3):286-91.
16. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EAM. Dental caries: the disease and its clinical, management. 3rd edition. Chichester (UK) Ames (Iowa): Wiley Blackwell; 2015. Dental Caries: The Disease and its Clinical Management, Third Edition. *Br Dent J.* oct 2016;221(8):443-443.

17. Fejerskov O. Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* févr 1997;25(1):5-12.
18. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 1 oct 2001;65(10):1028-37.
19. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol.* avr 2008;46(4):1407-17.
20. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* déc 1986;50(4):353-80.
21. Parisotto TM, Steiner-Oliveira C, Duque C, Peres RCR, Rodrigues LKA, Nobre-dos-Santos M. Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol.* mai 2010;55(5):365-73.
22. Kato S, Fusayama T. Recalcification of Artificially Decalcified Dentin In Vivo: *J Dent Res* [Internet]. 9 nov 2016 [cité 3 mars 2020]; Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/00220345700490051001>
23. ten Cate JM. Remineralization of caries lesions extending into dentin. *J Dent Res.* mai 2001;80(5):1407-11.
24. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci.* juin 2003;111(3):243-52.
25. Magloire H, Bouvier M, Joffre A. Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc Suom Hammaslaakariseuran Toim.* 1992;88 Suppl 1:257-74.
26. Tay FR, Pashley DH. Resin bonding to cervical sclerotic dentin: a review. *J Dent.* mars 2004;32(3):173-96.
27. Farges J-C, Joffre A, Magloire H. La réponse des cellules odontoblastiques et pulpaire à la lésion carieuse. *Comptes Rendus Séances Société Biol Ses Fil.* 1 janv 1993;5:582-95.
28. Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1-10.
29. Ferracane JL. Models of Caries Formation around Dental Composite Restorations. *J Dent Res.* avr 2017;96(4):364-71.
30. Arends J, ten Bosch JJ. Demineralization and Remineralization Evaluation Techniques. *J Dent Res.* avr 1992;71(3_suppl):924-8.
31. Chien Y-C, Burwell AK, Saeki K, Fernandez-Martinez A, Pugach MK, Nonomura G, et al. Distinct decalcification process of dentin by different cariogenic organic acids: Kinetics, ultrastructure and mechanical properties. *Arch Oral Biol.* mars 2016;63:93-105.
32. Maske TT, van de Sande FH, Arthur RA, Huysmans MCDNJM, Cenci MS. In vitro biofilm models to study dental caries: a systematic review. *Biofouling.* 14 sept 2017;33(8):661-75.

33. Totiam P, González-Cabezas C, Fontana MR, Zero DT. A new in vitro model to study the relationship of gap size and secondary caries. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=A+new+in+vitro+model+to+study+the+relationships+of+gap+size+and+secondary+caries>.
34. Dobson J, Wilson M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low-power laser. *Arch Oral Biol.* nov 1992;37(11):883-7.
35. Filoche SK, Soma KJ, Sissons CH. Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiol Immunol.* avr 2007;22(2):73-9.
36. Ledder RG, Madhwani T, Sreenivasan PK, De Vizio W, McBain AJ. An in vitro evaluation of hydrolytic enzymes as dental plaque control agents. *J Med Microbiol.* avr 2009;58(Pt 4):482-91.
37. Bradshaw DJ, Marsh PD. Analysis of pH-Driven Disruption of Oral Microbial Communities in vitro. *Caries Res.* 1998;32(6):456-62.
38. Seemann R, Klück I, Kage A. An in vitro microbial-based model for studying caries-preventive agents. *Acta Odontol Scand.* janv 2006;64(1):27-30.
39. Peters AC, Wimpenny JW. A constant-depth laboratory model film fermentor. *Biotechnol Bioeng.* 20 juill 1988;32(3):263-70.
40. Sissons CH. Artificial Dental Plaque Biofilm Model Systems. *Adv Dent Res.* avr 1997;11(1):110-26.
41. Mei ML, Chu CH, Lo ECM, Samaranayake LP. Preventing root caries development under oral biofilm challenge in an artificial mouth. - PubMed - NCBI [Internet]. [cité 28 oct 2019]. Disponible sur:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Preventing+root+caries+development+under+oral+biofilm+challenge+in+an+artificial+mouth>
42. Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated Bifidobacterium BB12 on cariogenicity of Streptococcus mutans in vitro. *Arch Oral Biol.* 1 déc 2014;59(12):1384-90.
43. Amaechi BT, Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Cury JA. Protocols to Study Dental Caries In Vitro: Microbial Caries Models. In: Papagerakis P, éditeur. *Odontogenesis* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2019 [cité 12 nov 2019]. p. 357-68. Disponible sur:
http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-9012-2_32
44. Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* juin 2010;24(2):135-41.
45. Fernández CE, Tenuta LMA, Cury JA. Validation of a Cariogenic Biofilm Model to Evaluate the Effect of Fluoride on Enamel and Root Dentine Demineralization. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146478.
46. Ribeiro CCC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CDS do, Alves CMC, Leitão TJ, Vidotti LR, et al. The effect of iron on Streptococcus mutans biofilm and on enamel demineralization. *Braz Oral Res.* août 2012;26(4):300-5.

47. Peralta SL, de Carvalho PHA, Ccahuana-Vásquez RA, de Pereira CMP, Cury JA, Piva E, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibiofilm activity on *Streptococcus mutans* of an experimental self-etching adhesive system containing natural *Butia capitata* oil. *Int J Adhes Adhes.* 1 oct 2017;78:95-101.
48. Giacaman R, Muñoz M, Ccahuana-Vasquez RA, Muñoz-Sandoval C, Cury J. Effect of Fluoridated Milk on Enamel and Root Dentin Demineralization Evaluated by a Biofilm Caries Model. *Caries Res.* 30 juin 2012;46:460-6.
49. Muñoz-Sandoval C, Muñoz-Cifuentes MJ, Giacaman RA, Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. Effect of bovine milk on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic properties and enamel and dentin demineralization. *Pediatr Dent.* déc 2012;34(7):e197-201.
50. Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LMA, Cury JA. A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling.* 2014;30(5):579-88.
51. Botelho JN, Villegas-Salinas M, Troncoso-Gajardo P, Giacaman RA, Cury JA. Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm - caries model. *Braz Oral Res.* 20 mai 2016;30(1).
52. Fernández CE, Fontana M, Samarian D, Cury JA, Rickard AH, González-Cabezas C. Effect of Fluoride-Containing Toothpastes on Enamel Demineralization and *Streptococcus mutans* Biofilm Architecture. *Caries Res.* 2016;50(2):151-8.
53. Amaechi BT, Ramalingam K. Evaluation of fluorescence imaging with reflectance enhancement technology for early caries detection. *Am J Dent.* avr 2014;27(2):111-6.
54. Amaechi BT, Key MC, Balu S, Okoye LO, Gakunga PT. Evaluation of the caries-preventive effect of toothpaste containing surface prereacted glass-ionomer filler. *J Investig Clin Dent.* nov 2017;8(4).
55. Liu S, Wu T, Zhou X, Zhang B, Huo S, Yang Y, et al. Nicotine is a risk factor for dental caries: An in vivo study. *J Dent Sci.* mars 2018;13(1):30-6.
56. Yucesoy DT, Fong H, Gresswell C, Saadat S, Chung WO, Dogan S, et al. Early Caries in an In Vivo Model: Structural and Nanomechanical Characterization. *J Dent Res.* déc 2018;97(13):1452-9.
57. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill 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.* 1 mai 2007;56(5):681-7.
58. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DLS, Soares DGS, Basso FG, Ribeiro APD. Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dent Mater.* juill 2014;30(7):769-84.
59. Bayne SC. Dental restorations for oral rehabilitation – testing of laboratory properties versus clinical performance for clinical decision making*. *J Oral Rehabil.* 2007;34(12):921-32.
60. Wataha JC. Principles of biocompatibility for dental practitioners. *J Prosthet Dent.* 1 août 2001;86(2):203-9.

61. GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Lond Engl.* 16 sept 2017;390(10100):1211-59.
62. Kutsch VK. Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J Prosthet Dent.* avr 2014;111(4):280-5.
63. Bjørndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res.* 1997;31(6):411-7.
64. Banava S. Stepwise Excavation: A Conservative Community-Based Dental Treatment of Deep Caries to Inhibit Pulpal Exposure. *Iran J Public Health.* 30 sept 2011;40(3):140.
65. Tang G, Yip H-K, Cutress TW, Samaranayake LP. Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: a review. *J Dent.* mars 2003;31(3):161-71.
66. Salli KM, Ouwehand AC. The use of in vitro model systems to study dental biofilms associated with caries: a short review. *J Oral Microbiol.* janv 2015;7(1):26149.
67. Téclès O, Laurent P, Aubut V, About I. Human tooth culture: a study model for reparative dentinogenesis and direct pulp capping materials biocompatibility. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* avr 2008;85(1):180-7.
68. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine(TM) induces TGF- β 1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J.* mai 2012;45(5):439-48.



SERMENT MEDICAL

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'HIPPOCRATE.

Je promets et je jure, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine Dentaire.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

J'informerai mes patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des connaissances pour forcer les consciences.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois déshonoré et méprisé de mes confrères si j'y manque.

SCHOTT Jonathan – Création d'un modèle de simulation de carie *ex vivo* sur dent humaine

Th. : Chir. dent. : Marseille : Aix –Marseille Université : 2020

Rubrique de classement : Sciences biologiques

Résumé :

L'étude de la maladie carieuse nécessite l'utilisation de modèles de simulation de la carie sur dents saines ou sur l'utilisation de modèles de culture bactériennes *in vitro*. L'objectif de ce travail de thèse est de développer un nouveau modèle sur dent humaine permettant la culture des bactéries responsables du processus carieux. La première partie présente la physiopathologie de la lésion carieuse, les modèles expérimentaux existants et leurs limites. La deuxième partie décrit les matériels et méthodes utilisés pour notre expérimentation. Les résultats et la discussion sont présentés dans la troisième et la quatrième partie. Dans la dernière partie, nous évoquerons les perspectives d'évolution du modèle, toujours dans le but d'améliorer la prise en charge clinique d'une lésion carieuse et le développement de nouveaux matériaux de restauration.

Mots clés : Carie dentaire – Technique de culture d'organes – Biofilm – Bactéries

SCHOTT Jonathan – Creation of an *ex vivo* caries simulation model on human teeth

Abstract:

The study of carious disease requires the use of caries simulation models on healthy teeth or the use of *in vitro* bacterial culture models. The aim of this thesis work is to develop a new model on human teeth allowing the culture of the bacteria responsible for the carious process. The first part presents the physiopathology of the carious lesion, the existing experimental models and their limits. The second part describes the materials and methods used for our experimentation. The results and discussion are presented in the third and fourth parts. In the last part, we will discuss the prospects for further development of the model, again with the aim of improving the clinical management of a carious lesion and the development of new restorative materials.

MeSH: Dental caries – Organ culture technique – Biofilm – Bacteria

Adresse de l'auteur :

39 rue Brandis
13005 Marseille