



**HAL**  
open science

# Biofilm des appareils orthodontiques amovibles : revue de la littérature et mise en place d'un protocole de recherche

Léa Graveline

## ► To cite this version:

Léa Graveline. Biofilm des appareils orthodontiques amovibles : revue de la littérature et mise en place d'un protocole de recherche. Médecine humaine et pathologie. 2022. <dumas-03877843>

**HAL Id: dumas-03877843**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03877843v1>**

Submitted on 29 Nov 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.



HAL Authorization

# BIOFILM DES APPAREILS ORTHODONTIQUES AMOVIBLES : REVUE DE LA LITTÉRATURE ET MISE EN PLACE D'UN PROTOCOLE DE RECHERCHE

Année 2022

Thèse n°42-57-22-20

## THÈSE

Présentée et publiquement soutenue devant  
la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nice  
Le 6 septembre 2022 Par

**Madame Léa GRAVELINE**

Née le 4 avril 1999 à Hyères  
Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE (Diplôme d'État)**

---

Examineurs :

Madame le Professeur  
Madame le Professeur  
Madame le Professeur  
Madame le Docteur  
Madame le Docteur

L. LUPI  
M-F. BERTRAND  
C. CHARAVET  
C. JOSEPH-BEAUDIN  
C. MASUCCI

Président du jury  
Assesseur  
Directeur de thèse  
Assesseur  
Membre invité

## **CORPS ENSEIGNANT**

### 56<sup>ème</sup> section : DÉVELOPPEMENT, CROISSANCE ET PRÉVENTION

#### Sous-section 01 : ODONTOLOGIE PÉDIATRIQUE ET ORTHOPÉDIE DENTO-FACIALE

**Professeur des Universités :**

Mme MULLER-BOLLA Michèle

Mme CHARAVET Carole

**Maître de Conférences des Universités :**

Mme JOSEPH Clara

**Maître de Conférences des Universités Associé :**

Mme OUEISS Arlette

**Assistant Hospitalier Universitaire :**

Mme AIEM TORT-ALVÁREZ Elody (temps plein)

M. CAMIA Julien

Mme MASUCCI Caterina

#### Sous-section 02 : PRÉVENTION, ÉPIDÉMIOLOGIE, ÉCONOMIE DE LA SANTÉ, ODONTOLOGIE LÉGALE

**Professeur des Universités :**

Mme LUPI Laurence

**Maître de Conférences des Universités :**

Mme MERIGO Elisabetta

**Maître de Conférences des Universités Associé :**

Mme BORSA Leslie

**Assistant Hospitalier Universitaire :**

Mme FRENDON Marie

### 57<sup>ème</sup> section : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

#### Sous-section 01 : CHIRURGIE ORALE ; PARODONTOLOGIE ; BIOLOGIE ORALE

**Professeur des Universités :**

Mme DRIDI Sophie Myriam

Mme PRECHEUR-SABLAYROLLES Isabelle

Mme VINCENT-BUGNAS Séverine

**Maître de Conférences des Universités :**

M. BENHAMOU Yordan

M. COCHAIS Patrice (temps partiel)

Mme RAYBAUD Hélène

Mme VOHA Christine

**Assistant Hospitalier Universitaire :**

Mme FISTES Elene-Maria

M. GAUDARD Mathias

Mme NAMAN Eve

### 58<sup>ème</sup> section : RÉHABILITATION ORALE

#### Sous-section 01 : DENTISTERIE RESTAURATRICE, ENDODONTIE, PROTHÈSES, FONCTION-DYSFONCTION, IMAGERIE, BIOMATÉRIAUX

**Professeur des Universités :**

Mme BERTRAND Marie-France

M. BOLLA Marc

Mme BRULAT-BOUCHARD Nathalie

Mme LASSAUZAY Claire

**Professeur des Universités Associé :**

M. DOUGHAN Bassel

**Professeur des Universités Émérite :**

M. ROCCA Jean-Paul

**Maître de Conférences des Universités :**

M. CEINOS Romain

Mme EHRMANN Elodie

M. LAPLANCHE Olivier (temps partiel)

M. LEFORESTIER Eric (temps partiel)

Mme POUYSSEGUR-ROUGIER Valérie (temps partiel)

**Assistant Hospitalier Universitaire :**

Mme ABID Sarah

Mme BECQUART Mathilde

M. BONNET Nicolas

M. CEPPO Franck

M. DUBROMEZ Julien

M. GIRODENGO Alexandre

Mme GROSSI Vanina

M. LAMBERT Gary

Mme DUBOIS Margaux (temps plein)

## **REMERCIEMENTS**

### **A Madame le Professeur Laurence LUPI**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

Je vous remercie grandement d'avoir accepté de faire partie de ce jury. C'était pour moi une évidence de vous proposer de le présider, étant celle qui m'a proposé de participer à ce projet de recherche pour découvrir ce monde passionnant et rigoureux. Je vous remercie pour la gentillesse et la bienveillance dont vous avez fait preuve durant tout mon cursus universitaire. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon profond respect.

### **A Madame le Professeur Marie-France BERTRAND**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de siéger dans ce jury de thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à ce travail, mais surtout d'avoir créé le cursus qui m'a permis de le produire. Je n'aurais probablement pas pu découvrir le monde de la recherche sans votre implication, et pour cela je vous suis grandement reconnaissante. Je vous remercie pour votre accompagnement et votre gentillesse durant tout mon cursus universitaire.

### **A Madame le Professeur Carole CHARAVET**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier*

Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger cette thèse. J'ai énormément appris à vos côtés, au travers des différents travaux que j'ai réalisés sous votre supervision. Merci infiniment pour votre investissement et votre disponibilité au long de ces deux années. Votre dévouement, votre énergie et vos compétences professionnelles resteront un exemple que je m'efforcerai de suivre durant toute ma carrière. Permettez-moi de vous exprimer ici toute ma sympathie et l'expression de mes plus sincères remerciements.

## **A Madame le Docteur Clara JOSEPH**

*Maître de Conférence des Universités – Praticien Hospitalier*

C'est avec grand honneur que je vous retrouve parmi les membres de mon jury. Je suis reconnaissante de vous avoir eue en tant qu'enseignante durant tout mon cursus, et d'avoir pu partager de nombreuses vacances hospitalières avec vous. Vous avez su transmettre la passion pour le soin des petits patients avec brio, et vous côtoyer n'a fait que confirmer ma décision de m'orienter vers l'odontologie pédiatrique (oui, malgré les jeudis tumultueux). Je garderai précieusement les nombreux conseils que vous avez pu me donner durant l'année écoulée pour ma pratique future. Pour tout cela, veuillez recevoir l'assurance de ma gratitude.

## **A Madame le Docteur Caterina MASUCCI**

*Assistant Hospitalo-Universitaire – Praticien Hospitalier*

Je vous remercie d'avoir accepté de siéger à ce jury de thèse. Je n'ai pas beaucoup pu vous côtoyer durant mes années cliniques, mais votre disponibilité et votre gentillesse durant les vacances d'ODF m'ont marquée. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance pour l'attention que vous portez à mon travail.

# TABLE DES MATIERES

<b>I. Introduction .....</b>	<b>10</b>
<b>II. Revue systématique de la littérature .....</b>	<b>12</b>
1. Matériels et méthodes.....	12
a. Question de recherche et critères d'éligibilité .....	12
b. Stratégie de recherche et sources d'information .....	12
c. Sélection des études .....	13
d. Procédure de collection des données.....	13
e. Evaluation du risque de biais.....	14
2. Résultats.....	14
a. Sélection des études .....	14
b. Caractéristiques des études incluses .....	15
c. Risque de biais .....	16
d. Résultats individuels des études .....	17
3. Discussion.....	24
4. Conclusion.....	27
<b>III. Etat des connaissances.....</b>	<b>28</b>
1. Flore microbienne orale et biofilm.....	28
a. Flore orale : définition et composition .....	28
b. Biofilm : définition et formation.....	30
c. Streptococcus mutans .....	33
d. Actinomyces naeslundii .....	35
e. Treponema denticola.....	36
2. Appareils orthodontiques amovibles .....	37
a. Activeurs rigides .....	37
b. Forces extra-orales .....	39
3. PCR et PCR quantitative (qPCR) .....	40
a. Principes de la qPCR .....	41
b. Etapes préliminaires .....	43
<b>IV. Proposition d'un protocole de recherche.....</b>	<b>45</b>
1. Introduction.....	45
2. Matériel et méthodes .....	45
a. Préparation et formation des investigateurs.....	45
b. Etude pilote .....	45
c. Enregistrement de l'étude et autorisations.....	46

d.	Conception de l'étude .....	46
e.	Participants et critères d'éligibilité.....	46
f.	Temps clés .....	47
g.	Prélèvement de l'échantillon .....	47
h.	Procédure d'analyse.....	48
i.	Extraction de l'ADN .....	48
ii.	Quantification des acides nucléiques .....	52
iii.	Analyse par qPCR.....	55
i.	Traitement des données .....	60
3.	Résultats.....	60
<b>V.</b>	<b>Conclusion.....</b>	<b>61</b>
	<b>Annexes .....</b>	<b>62</b>
	<b>Bibliographie .....</b>	<b>70</b>

## LISTE DES FIGURES ET TABLES

### Liste des figures

Fig. 1 : Logigramme du processus de sélection suivant la méthode PRISMA .....	15
Fig. 2 : Risque individuel de biais dans les essais cliniques randomisés inclus.....	16
Fig. 3 : Synthèse des risques de biais par catégorie dans les essais cliniques randomisés inclus.....	17
Fig. 4 : Risque individuel de biais dans les essais cliniques non randomisés inclus.....	17
Fig. 5 : Synthèse des risques de biais par catégorie dans les essais cliniques non randomisés inclus.....	17
Fig. 6 : Illustration des différents complexes microbiens de la plaque dentaire.....	30
Fig. 7 : Etapes de formation et dispersion du biofilm bactérien (Document personnel).....	31
Fig. 8 : Pyramide reprenant le concept des complexes bactériens, la base de la pyramide représentant les colonisateurs précoces des surfaces dentaires (48).....	32
Fig. 9 : Exemples d'interactions nutritionnelles entre les microorganismes oraux .....	32
Fig. 10 : Photographie au microscope de nombreux Streptococcus mutans sur un milieu de culture au bouillon de thioglycolate, après coloration de Gram (52) .....	33
Fig. 11 : Principaux caractères de pathogénicité de SM (55) .....	34
Fig. 12 : Actinomyces sp. en culture sur gel d'agar-agar.....	35
Fig. 13 : Image au microscope électronique de T. denticola et P. gingivalis en culture (x20000) (60).....	36
Fig. 14 : Activateur d'Andresen de classe II (63).....	38
Fig. 15 : Activateur composite, variante du Gebissformer de Bimler, avec un vérin d'expansion transversale (63).....	38
Fig. 16 : Bielles de Herbst sur gouttière (63) .....	39
Fig. 17 : Activateur de classe III (63) .....	39
Fig. 18 : Force extra-orale sur gouttière (63).....	40
Fig. 19 : Schéma du principe des cycles de la PCR (Document personnel).....	41
Fig. 20 : Cinétique de la PCR .....	43
Fig. 21 : Schéma du mouvement de prélèvement sur l'appareil à l'aide de l'écouvillon (Document personnel) .....	48
Fig. 22 : Protocole d'extraction de l'ADN au laboratoire MICORALIS (Document personnel) .....	51
Fig. 23 : Spectre d'absorption caractéristique de l'ADN pur .....	54
Fig. 24 : Spectrophotomètre à micro-volume SimpliNano™ de Biochrom® .....	55
Fig. 25 : Spectre d'excitation et d'émission de la molécule de SYBR Green® .....	57
Fig. 26 : Plaque PCR 96 puits MicroAmp™ EnduraPlate™ .....	59

Fig. 27 : Plan de la plaque réalisé à l'aide du logiciel QuantStudio™ Design and Analysis software 2.6.0.....	59
---	----

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Stratégie de recherche .....	13
Tableau 2 : Domaines des risques de biais possibles selon l'outil de la Cochrane .....	14
Tableau 3 : Données extraites des articles éligibles selon l'approche PICO .....	19
Tableau 4 : Résultats des études incluses.....	21
Tableau 5 : Liste des microorganismes présents dans la plaque dentaire (46).....	29
Tableau 6 : Classification des activateurs de classe II selon Lautrou (62).....	37
Tableau 7 : Détail du déroulement des 3 phases d'un cycle de PCR .....	42
Tableau 8 : Tableau synoptique des visites nécessaires à l'étude clinique .....	47
Tableau 9 : Coefficients d'extinction des bases .....	53
Tableau 10 : Détails de la chimie SYBR Green® lors d'un cycle de PCR (Document personnel) .....	56
Tableau 11 : Liste des amorces utilisées dans le protocole .....	58

### Liste des annexes

<b>Annexe 1</b> : Formulaire d'autorisation de participation à l'étude clinique .....	62
<b>Annexe 2</b> : Note d'information au patient ou ses responsables légaux .....	65
<b>Annexe 3</b> : Budget prévisionnel du matériel nécessaire à l'étude .....	69

## LISTE DES ABBREVIATIONS

<b>ADN</b>	:	Acide DésoxyriboNucléique
<b>AA</b>	:	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
<b>AN</b>	:	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<b>dNTPs</b>	:	DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphate
<b>CCT</b>	:	Controlled Clinical Trial (Essai Clinique Contrôlé)
<b>CFU</b>	:	Colony Forming Units
<b>CHU</b>	:	Centre Hospitalier Universitaire
<b>GAPDH</b>	:	Glycéraldéhyde-tri-phosphate déshydrogénase
<b>GBP</b>	:	Glucan Binding Protein
<b>SM</b>	:	<i>Streptococcus mutans</i>
<b>PAE</b>	:	Pellicule Acquise Exogène
<b>PCR</b>	:	Polymerase Chain Reaction
<b>PMMA</b>	:	PolyMethylMethAcrylate
<b>PRISMA</b>	:	Preferred Reporting System for Systematic Reviews and Meta-Analysis
<b>PROSPERO</b>	:	International Prospective Register of Systematic Review
<b>QAMS</b>	:	Quaternary Ammonium Methacryloxy-Silicate
<b>qPCR</b>	:	PCR quantitative
<b>RCT</b>	:	Randomized Clinical Trial (Essai Clinique Randomisé)
<b>RS</b>	:	Revue systématique de la littérature
<b>TD</b>	:	<i>Treponema denticola</i>

# I. Introduction

L'orthodontie est une discipline qui dans l'immense majorité de ses traitements implique l'utilisation **d'appareils intra- buccaux**, qu'ils soient amovibles ou fixes.

La présence d'un ou de plusieurs matériaux exogènes apporte de nouvelles surfaces **d'adhérence** pour le biofilm oral, et constitue un élément supplémentaire à considérer dans le maintien d'une **bonne hygiène orale**. Celle-ci a toujours été un défi dans le domaine de l'orthodontie, et le lien entre les traitements orthodontiques et la **maladie carieuse** ou **parodontale** a été très largement exploré (1,2).

De plus, la présence d'un appareil orthodontique en bouche amène à un certain nombre de **modifications** de l'écosystème buccal :

- ▶ Une baisse du **pH salivaire** (3) ;
- ▶ Une augmentation des taux de **microorganismes cariogènes** (*Streptococcus mutans* (SM), *Lactobacillus* sp.) et **parodontopathogènes** (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA)) (4,5).

Les **enfants** représentent une grande partie des patients suivant des traitements orthodontiques et orthopédiques, chez qui l'hygiène orale n'est pas toujours parfaite, par manque **d'observance** ou bien de **dextérité**. Par conséquent, les **techniques d'hygiène** chez les patients suivant des traitements orthodontiques par appareil fixe ont été très largement explorées dans la littérature, que ce soit par la méthode de **brossage** (6), l'utilisation **d'application** sur smartphone (7), l'utilisation de **bains de bouche** (8) ou encore l'incorporation **d'agents antimicrobiens** directement dans les brackets, les fils ou les adhésifs orthodontiques (9,10).

Néanmoins, nombre de patients, notamment des enfants, suivent un traitement par **appareillage amovible**, constitué principalement de **résine polyméthylmétacrylate** (PMMA). A la différence des alliages et céramiques constituant les appareillages fixes, la résine PMMA a une surface moins lisse et **plus poreuse**, facilitant l'adhésion du biofilm oral, qu'il soit bactérien (11,12) ou fongique (13).

Certains écrits dans la littérature ont déjà étudié les effets de différents protocoles de nettoyage pour ces appareils qui pourraient contribuer à diminuer le risque de pathologies orales corrélées à la présence excessive de biofilm. En effet, des protocoles se basant sur les comprimés nettoyants pour prothèse, les solutions enzymatiques, l'hypochlorite de sodium ou encore des solutions « faites maison » contenant du vinaigre ou de l'acide citrique (14).

Également, des procédés de nettoyage professionnel à l'aide d'ultrasons ont été décrits dans la littérature (15). Néanmoins, à ce jour, **aucun consensus** n'a été posé sur l'efficacité relative de ces produits et protocoles.

Dans une revue systématique de la littérature précédemment réalisée, il a été conclu que les données actuelles de la science ne permettaient pas d'établir un protocole clair de nettoyage et de désinfection des appareils amovibles en résine PMMA (16).

L'objectif de ce travail sera donc d'établir un **protocole expérimental** pour une étude clinique menée dans le service d'orthodontie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Nice, ayant pour but **l'identification** de la présence de certaines **espèces bactériennes** responsables de maladies carieuses et parodontales, afin de mieux cibler l'utilisation des agents désinfectants pour le nettoyage de ces appareils.

## II. Revue systématique de la littérature

### 1. Matériels et méthodes

Une revue systématique de la littérature (RS) a été réalisée en suivant le plus fidèlement possible la version 2020 du protocole des Preferred Reporting Items for Systematic Reviews (PRISMA) (17), et a été enregistrée dans le International Prospective Register of Systematic Review (PROSPERO) sous l'identifiant CRD42021269297.

#### a. Question de recherche et critères d'éligibilité

La **question de recherche** a été posée ainsi : « Quels sont les protocoles de nettoyage et de désinfection pour les appareils orthodontiques amovibles en résine acrylique ? ». La **méthode PICO** (Population, Intervention, Comparison and Outcome) a ensuite été utilisée pour définir précisément la question de recherche :

- × **P (Population/Problem)** : appareil orthodontique amovible en résine acrylique porté par des patients ;
- × **I (Intervention)** : protocole de nettoyage et de désinfection ;
- × **C (Comparison)** : placebo ou groupe contrôle négatif ;
- × **O (Outcome)** : quantité globale de biofilm, nombre de colonies de *Streptococcus mutans*, nombre de colonies de *Candida albicans*.

Les **critères d'inclusion** de la revue systématique ont été définis ainsi : essais cliniques randomisés ou non, prospectifs ou rétrospectifs, évaluant l'efficacité de méthodes de nettoyage et de désinfection pour les appareils orthodontiques amovibles en résine acrylique en les comparant avec un placebo ou un groupe contrôle négatif, rédigés en anglais. Il n'y a pas eu de limites concernant la date de publication des articles.

Les **critères d'exclusion** comprenaient les études non comparatives (rapports de cas et séries de cas), les questionnaires, les éditoriaux, les opinions, les revues, les études in vitro, les études expérimentales sur modèle animal, les revues systématiques et les méta-analyses.

#### b. Stratégie de recherche et sources d'information

Une **recherche informatisée** a été réalisée pour la dernière fois le **29 mai 2021** sans restriction de temps sur plusieurs bases de données, dont PubMed, Scopus, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) et Embase ; afin d'identifier les études publiées éligibles.

Une **stratégie de recherche** combinant des mots-clés, des termes Medical Subject Headings (MeSH) et des opérateurs booléens a été réalisée et adaptée à chaque base de

données. Les recherches dans la base de données Scopus ont été limitées aux études se rapportant à la dentisterie.

Une **recherche manuelle** a également été réalisée dans la bibliographie de chaque article inclus, afin d'identifier de possibles articles n'ayant pas été trouvés via la recherche électronique.

*Tableau 1 : Stratégie de recherche*

Base de données	Mots-clés
Pubmed	((("removable orthodontic appliance") OR "Orthodontic Appliances, Removable"[MAJR] OR ((preventive OR functional) AND appliance AND orthod*) OR (orthod* resin) OR (orthod* acrylic)) AND (((removal OR reducing OR controlling) AND (biofilm OR bacteria OR "dental plaque"))) OR disinfection OR decontamination OR "Disinfection/methods"[MeSH] OR "Biofilms/drug effects"[MeSH] OR "Equipment Contamination/prevention and control"[Mesh] OR "Anti-Infective Agents, Local"[Mesh] OR "Oral Hygiene"[MeSH] OR antimicrobial OR antibacterial OR clean*)
Scopus	((("removable orthodontic appliance") OR ((preventive OR functional) AND appliance AND orthod*) OR (orthod* resin) OR (orthod* acrylic)) AND (((removal OR reducing OR controlling) AND (biofilm OR bacteria OR dental plaque)) OR decontamination OR disinfection OR antimicrobial OR antibacterial OR clean*) AND (LIMIT-TO (SUBJAREA,"DENT" ) ) AND NOT (fixed OR bracket)
Embase, Cochrane	("removable appliance" AND "orthodontic") AND ("biofilm removal" OR "biofilm adhesion" OR "decontamination" OR "disinfection" OR "dental plaque" OR "antimicrobial" OR "antibacterial" OR "clean*")

### c. Sélection des études

Pour estimer leur éligibilité, l'évaluation des articles sélectionnés s'est déroulée en **deux étapes** après la suppression des duplicatas entre les bases de données, à l'aide d'un logiciel de gestion de bibliographie (Zotero version 5.0.96.2).

En premier lieu, les articles ont été sélectionnés via la **lecture de leur titre**, puis de leur résumé, de manière indépendante par deux examinateurs. Ensuite, le verdict final de leur éligibilité a été prononcé en se basant sur le **texte entier** par les mêmes examinateurs. En cas de désaccords, un troisième examinateur a été sollicité.

### d. Procédure de collection des données

Les données ont été extraites indépendamment par deux examinateurs parmi les études sélectionnées ayant satisfait les critères d'inclusion, selon la méthode PICO. Les **informations suivantes** ont été extraites de chaque article : nom du premier auteur, année

de publication, pays, type d'étude, critères d'inclusion et d'exclusion des patients, description du protocole interventionnel, comparaison et résultats.

Etant données l'hétérogénéité retrouvée dans les méthodes et les résultats, il était **impossible** de réaliser une **méta-analyse**. Ainsi, l'analyse des articles a été qualitative et descriptive.

#### e. Evaluation du risque de biais

L'évaluation du risque de biais a été réalisée indépendamment par deux examinateurs et les désaccords dans les résultats ont été résolus par discussion entre les auteurs, et un troisième examinateur a été consulté si nécessaire.

Le **risque de biais** dans les **essais cliniques randomisés** éligibles a été évalués à l'aide de l'outil collaboratif d'évaluation du risque de biais des essais cliniques randomisés de la Cochrane (18). Les critères d'évaluation comportaient sept catégories, dont chacune disposait d'une échelle de jugement provenant du **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions 6.0** (19).

En outre, le risque de biais dans les **essais cliniques non-randomisés** éligibles a été évalué en utilisant l'outil **ROBINS-I** (Risk of Bias in Non-Randomized Studies of Interventions), composée de sept domaines à l'origine de biais, qui peuvent être jugés comme à risque faible, modéré, sérieux ou critique de biais (20).

Les figures synthétisant le risque de biais ont été réalisées à l'aide de l'outil **robvis** (21).

Tableau 2 : Domaines des risques de biais possibles selon l'outil de la Cochrane

1. Was the random sequence generation adequate ?	Yes / no / unclear
2. Was the treatment allocation concealed ?	Yes / no / unclear
3. Adequate blinding of participants and researchers ?	Yes / no / unclear
4. Blinding of outcome assessment ?	Yes / no / unclear
5. Incomplete outcome data ?	Yes / no / unclear
6. Selective reporting ?	Yes / no / unclear
7. Other bias ?	Yes / no / unclear

## 2. Résultats

### a. Sélection des études

La stratégie de recherche a initialement révélé **2491** articles à travers de quatre bases de données : **140 duplicatas** ont été éliminés, et **2304** sur 2351 articles restants ont été **éliminés** sur la base de leur titre et de leur langue de rédaction. Les **47** articles restants ont été évalués sur leur résumé, en accord avec les critères d'éligibilité définis au préalable. Des

évaluations supplémentaires ont été réalisées sur **25** articles complets, ce qui a amené à **8** articles éligibles à cette revue systématique.

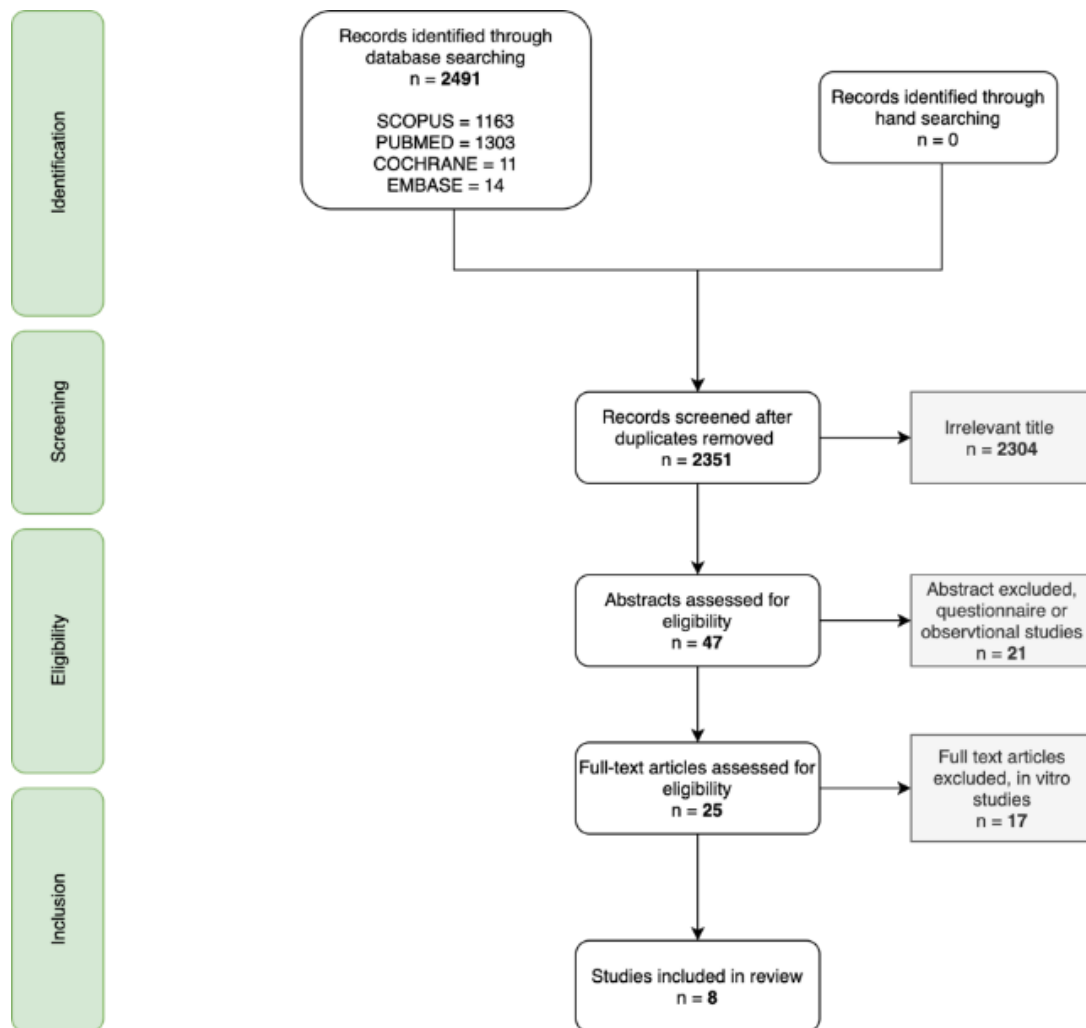


Fig. 1 : Logigramme du processus de sélection suivant la méthode PRISMA

### b. Caractéristiques des études incluses

Les tableaux 2 et 3 décrivent l'intégralité des caractéristiques de chaque étude.

Parmi les huit études analysées, six d'entre elles étaient des essais cliniques randomisés (22–27) et deux étaient des essais cliniques non-randomisés (28,29) publiés entre 2006 et 2020. En ce qui concerne l'origine géographique, trois études ont été conduites au Brésil (24,26,27), deux à Malte (22,23), une en Allemagne (28), une en Chine et aux Etats-Unis d'Amérique (25) et une en Inde (29). Toutes les études prises en compte, un total de **318** patients ont été enrôlés, et **318** appareils orthodontique amovibles ont été analysés.

Trois études ont évalués l'efficacité de solutions liquides (solution commerciale enzymatique Ortoform<sup>®</sup> ; hypochlorite de sodium à 0,5%, chlorure de cetylpyridinium à 0,05% (Cepacol<sup>®</sup>) ou gluconate de chlorhexidine à 0,12% (Periogard<sup>®</sup>)) (24,26,27), trois ont

utilisé des comprimés nettoyants commerciaux (22,23,28), une a étudié l'effet d'extraits naturels de plantes (29) et la dernière a évalué l'incorporation d'un agent antimicrobien au sein de la résine (25).

La quantité globale de biofilm, sans distinction entre les espèces microbiennes, a été évaluée par quatre des études incluses (25,26,28,29). Deux études ont spécifiquement dénombré les colonies de *Streptococcus mutans* (24,27), alors que les deux études restantes (22,23) se sont concentrées sur la quantité de colonies de *Candida* (toutes sous-espèces incluses).

### c. Risque de biais

Parmi les essais cliniques randomisés, l'étude réalisée par Lima et al. (26) a été identifiée comme celle présentant le **plus grand risque de biais**. A contrario, l'étude réalisée par Liu et al. (25) a été identifiée comme ayant le **plus faible risque de biais** parmi les articles inclus.

Globalement, le domaine présentant le plus grand risque de biais parmi les études incluses a été la **dissimulation des allocations de traitement**, suivi par l'aveuglement des participants. Aucune étude n'a été identifiée comme ayant pratiqué un rapport sélectif des résultats.

		Risk of bias						
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Study	Lima et al.	-	⊗	-	+	-	+	+
	Lessa et al.	+	-	-	+	+	+	+
	Peixoto et al.	+	-	-	+	+	+	+
	Liu et al.	+	+	+	+	+	+	+
	Vento-Zahra et al.	+	-	+	+	+	+	-
	Decelis et al.	+	-	+	-	+	+	-

D1: Random sequence generation  
D2: Allocation concealment  
D3: Blinding of participants  
D4: Blinding of outcome  
D5: Incomplete outcome data  
D6: Selective reporting  
D7: Other bias

Judgement  
⊗ High  
- Some concerns  
+ Low

*Fig. 2. : Risque individuel de biais dans les essais cliniques randomisés inclus*

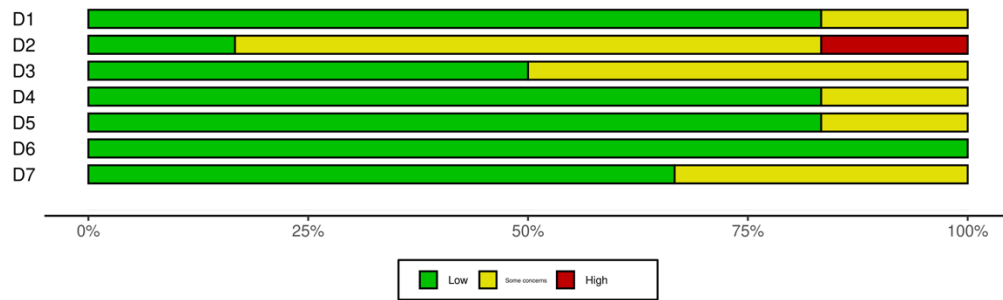


Fig. 3: Synthèse des risques de biais par catégorie dans les essais cliniques randomisés inclus

Parmi les deux essais non randomisés inclus, l'étude menée par Jagannathan et al. (29) a été identifiée comme celle ayant le **plus grand risque de biais**. Le domaine représentant le plus grand risque de biais a été les **résultats manquants**, suivie par le biais de confusion.

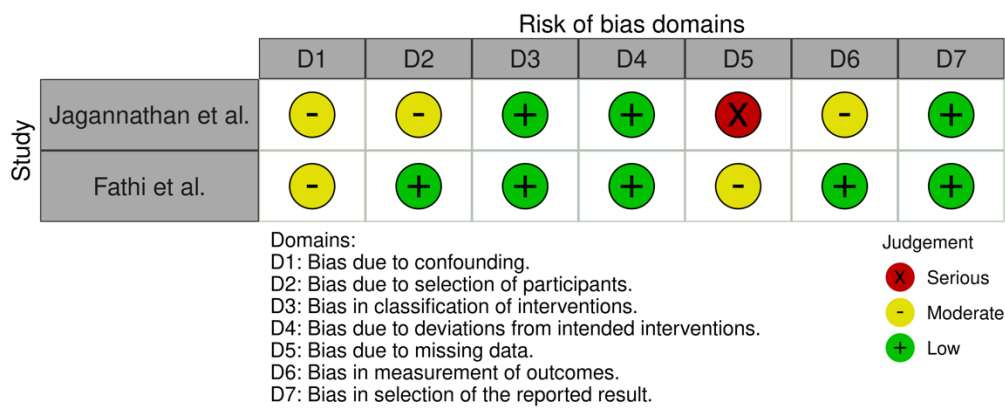


Fig. 4: Risque individuel de biais dans les essais cliniques non randomisés inclus

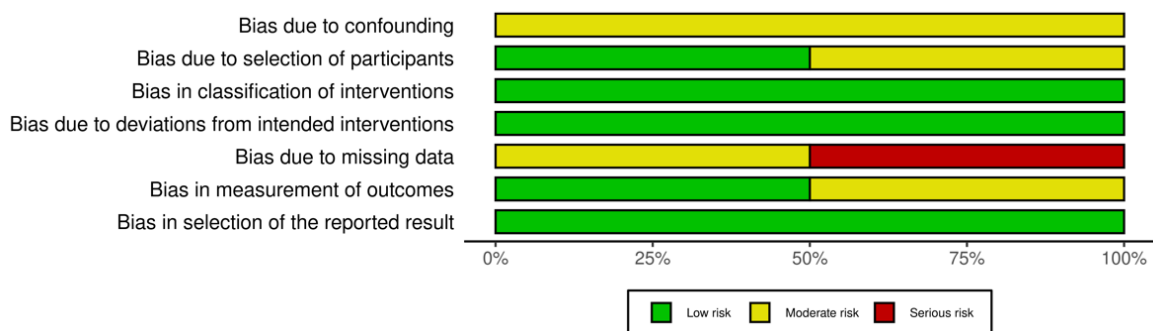


Fig. 5: Synthèse des risques de biais par catégorie dans les essais cliniques non randomisés inclus

#### d. Résultats individuels des études

Toutes les études ont démontré une **différence significative** entre le groupe contrôle et le groupe intervention.

Parmi les **agents antimicrobiens liquides**, l'équipe de Lessa et al. (27) a trouvé que le gluconate de chlorhexidine (Periogard<sup>®</sup>) était significativement plus efficace que le chlorure de cetylpyridinium (Cepacol<sup>®</sup>). Une autre étude par Lima et al. (26) a montré une efficacité significativement plus grande de l'hypochlorite de sodium par rapport à la solution enzymatique Ortoform<sup>®</sup>.

A propos des **comprimés** nettoyant du commerce (NitrAdine<sup>®</sup>, Kukis<sup>®</sup> et fittydent<sup>®</sup>) (22,23,28), toutes les études ont montré une efficacité significativement supérieure au groupe contrôle, qu'il soit un placebo ou de l'eau stérile. NitrAdine<sup>®</sup> a été le seul produit comparé à un comprimé placebo (22,23), et a montré une diminution significative de l'indice de plaque, du nombre de colonies de *Candida albicans* et de l'odeur de l'appareil, mais n'a pas montré de diminution significative du taux salivaire de *Candida spp.*

Une efficacité significative de plusieurs **extraits naturels de plantes** (neem, katha et cannelle) a été prouvée en comparaison d'un contrôle négatif (saline) (29), mais aucun d'entre eux n'a été prouvé aussi efficace que le contrôle positif, la chlorhexidine.

L'incorporation d'un **methacryloxy-silicate d'ammonium quaternaire** dans la résine PMMA orthodontique a montré une augmentation significative de la quantité de microorganismes morts dans le biofilm (25). Néanmoins, aucune diminution significative du biovolume n'a été observée.

*Tableau 3 : Données extraites des articles éligibles selon l'approche PICO*

Auteurs	Journal et année de publication	Type d'étude	Sujets	Critères d'inclusion et d'exclusion	Intervention	Comparaison	Conflit d'intérêt
Lima et al.	Journal of Oral Rehabilitation, 2006	RCT	13 participants	N/A	Hypochlorite de sodium à 0,5% ou solution enzymatique Ortoform®	Eau stérile	Non
Lessa et al.	American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2007	RCT	20 participants	Pas d'utilisation de bain de bouche, pas de maladie systémique, pas d'usage d'antibiotiques durant les 3 derniers mois	Sprays antimicrobiens : Periogard® ou Cepacol®	Eau stérile	Non
Peixoto et al.	American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 2007	RCT	21 participants	Bonne santé générale, bon alignement dentaire et quantité favorable de SM dans la salive. Pas de bain de bouche, de maladie systémique ou d'utilisation d'antibiotique durant les 3 derniers mois	Periogard® une ou deux fois par semaine et brossage manuel de l'appareil	Eau stérile et brossage manuel de l'appareil	Non
Liu et al.	Scientific Reports, 2016	RCT	32 participants	Bonne santé générale, pas de carie active ou parodontite, pas d'utilisation de bain de bouche, pas d'antibiotique durant les 6 derniers mois, pas de réflexe nauséeux ni de fente palatine.	Résine orthodontique PMMA contenant du QAMS.	Résine PMMA orthodontique conventionnelle	Non

Fathi et al.	Journal of Orofacial Orthopedics, 2015	CCT	20 participants	Pas de prothèse amovible ou d'autre appareil orthodontique, pas de dent manquante, de carie active ou de parodontite.	Fittydent®, NitrAdine® ou Kukis®	Eau	Non
Jagannathan et al.	Int Journal of Clinical Pediatric Dentistry, 2020	CCT	50 participants	Enfants en denture mixte utilisant des appareils amovibles orthodontiques maxillaires. Les patients manquant des rendez-vous ou en denture primaire / mixte ont été exclus.	Extrait de neem, de katha et de cannelle	Chlorhexidine (contrôle positif) et saline (contrôle négatif)	Non
Vento-Zahra et al.	Quintessence International, 2011	RCT	70 participants	Thérapeutique par appareil orthodontique amovible en cours depuis plus d'un mois, port constant de l'appareil, âgé de 11 à 14 ans	Comprimé NitrAdine®	Placebo	Oui
Decelis et al.	Quintessence International, 2012	RCT	92 participants	Traitement orthodontique depuis au moins un mois, âgé de 11 à 14 ans. Pas de maladie ou de traitement prédisposant aux candidoses orales, pas de thérapie antifongique.	Comprimé NitrAdine®	Placebo	Oui

N/A = non applicable; RCT = Randomized Clinical Trial; CCT = Controlled Clinical Trial

*Tableau 4 : Résultats des études incluses*

Auteurs	Protocole	Variable principale	Résultats
Lima et al.	<p>3 phases de 4 jours chacune, une pour chaque traitement, avec 3 appareils différents du même type. Immersion 8 fois par jour pendant 5 min dans une solution de sucrose à 20% pour augmenter la formation de biofilm.</p> <p>Immersion quotidienne dans 3 solutions : eau stérile, solution enzymatique Ortoform® (30 min) ou hypochlorite de sodium à 0,5% (10 min)</p>	<p>Etat de surface et accumulation du biofilm (absorbance à 280nm)</p>	<p>Pas de différence significative dans l'état de surface après traitement entre Ortoform®, NaOCl et l'eau (contrôle 0,497µm ; Ortoform® 0,535 µm ; NaOCl 0.496 µm ; p&gt;0,05)</p> <p>Pour l'accumulation du biofilm, le NaOCl (0.473) a été plus efficace que le contrôle (0.547) (p&lt;0,05), mais aucune différence n'a été trouvée entre le contrôle (0,547) et Ortoform® (0,521) (p&gt;0,05)</p>
Lessa et al.	<p>Une rotation de 3 phases avec une semaine d'intervalle entre chaque phase.</p> <p>La plaque de résine est portée constamment pendant 7 jours, sauf pendant les repas ; et brossée une fois par jour par le patient avec du dentifrice. Les plaques sont récupérées après une semaine et pulvérisées de chaque côté avec, de manière randomisée, une solution de chlorure de cetylpyridinium à 0,05% (Cepacol®), du gluconate de chlorhexidine à 0,12% (Periogard®) ou de l'eau stérile. Les plaques sont placées dans des réceptacles individuels stériles contenant un bouillon d'enrichissement sélectif de SM, et sont incubées 3 à 4 jours à 37°C.</p>	<p>Comptage des colonies de SM (examen par microscope électronique à balayage)</p>	<p>Les deux traitements ont été montrés plus efficaces que le contrôle (p&lt;0,001). Periogard® a été prouvé significativement plus efficace que Cepacol® (p&lt;0,001).</p>

Peixoto et al.	<p>Une rotation de 3 phases avec une semaine d'intervalle entre chaque phase. La plaque de résine est portée constamment pendant 7 jours, sauf pendant les repas ; et brossée une fois par jour par le patient avec du dentifrice. Avant le coucher, les patients ont du pulvériser leur appareil, soit : chaque jour avec de l'eau stérile (protocole I), le 7<sup>e</sup> jour seulement avec Periogard® (protocole II) ou le 4<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour avec Periogard® (protocole III). Les plaques sont placées dans des réceptacles individuels stériles contenant un bouillon d'enrichissement sélectif de SM, et sont incubées 3 à 4 jours à 37°C.</p>	Comptage des colonies de SM ( <i>examen par microscope électronique à balayage</i> )	Les deux protocoles étaient significativement plus efficaces que le contrôle (% de plaques contaminées par SM : protocole I 100% ; protocole II 80% ; protocole III 60% ; $p < 0,05$ ) mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les protocoles II et III ( $p > 0,05$ ).
Liu et al.	<p>Les participants ont été randomisés dans 2 groupes : un dont les appareils contenant de la résine enrichie au QAMS du côté droit, et l'autre du côté gauche (l'autre côté étant la résine conventionnelle contrôle). L'appareil a été porté pendant 48h continuellement, puis récupéré pour analyser les disques de résine. Le biovolume a été analysé pour déterminer le pourcentage de microorganismes tués dans la masse.</p>	Pourcentage de mort du biofilm (analyse par microscopie à laser confocal)	La résine enrichie en QAMS a eu un pourcentage de mort significativement plus élevé que les disques contrôle (contrôle : $3,73 \pm 2,11\%$ ; QAMS : $33,94 \pm 22,88\%$ ; $p < 0,001$ ).
Fathi et al.	<p>L'appareil a été porté continuellement pendant 96h, enlevé uniquement pour le brossage. Ils ont été récupérés et randomisés pour un protocole de nettoyage, qui était soit : immersion dans du fittydent® super pour 30 min, dans du Kukis® pendant 10 min, dans du NitrAdine® pendant 15 min ou dans de l'eau pendant 10 min. La quantité de protéine sur la surface de la résine a été calculée avant et après nettoyage.</p>	Quantité de biofilm relatifs ( <i>taux de diminution des protéines</i> )	Fittydent® (86,8%) est significativement plus efficace que Kukis® (79,8%) ( $p = 0,001$ ), mais aucune différence significative n'a été trouvée entre les autres comprimés (fittydent® vs NitrAdine® : 86.8% versus 81.8% ; $p = 0.057$ ; NitrAdine® vs Kukis® : 81.8% versus 79.8% ; $p = 0.411$ ). Les comprimés étaient tous significativement plus efficaces que l'eau (56,6%) ( $p < 0,001$ )

Jagannathan et al.	Des écouvillons salivaires ont été collectés sur la face palatine de l'appareil. Des extraits de neem, de katha et de cannelle ont été préparés. Les échantillons ont été inoculés sur des gélose d'agar, et les agents ont été introduits avec une micropipette.	Zone d'inhibition des extraits de culture salivaire	Tous les extraits étaient significativement plus efficaces que le contrôle négatif, et moins que le contrôle positif ( $p < 0,001$ ). Les extraits de neem et de katha étaient significativement plus efficaces que l'extrait de cannelle ( $p < 0,001$ )
Vento-Zahra et al.	Les patients ont été randomisés dans deux groupes: expérimental (NitrAdine OrthoJunior®) et contrôle (placebo). L'appareil a été traité avec une immersion quotidienne dans la solution contenant le comprimé et brossé uniquement avec de l'eau pendant 6 semaines. Les appareils ont été inspectés visuellement avant et après traitement, et des échantillons salivaires ont été collectés et analysés avant et après traitement.	Niveau salivaire de <i>Candida</i> ; indice de plaque sur l'appareil; odeur de l'appareil	Les comprimés NitrAdine® ont significativement diminué l'indice de plaque ( $p = 0,0253$ ) et l'odeur ( $p = 0,0007$ ) de l'appareil comparé au contrôle. Néanmoins, aucune différence significative n'a été trouvée dans les niveaux salivaires de <i>Candida</i> entre les deux groupes.
Decelis et al.	Les patients ont été randomisés dans deux groupes: expérimental (NitrAdine OrthoJunior®) et contrôle (placebo). L'appareil a été traité avec une immersion quotidienne de 20 min dans la solution contenant le comprimé et brossé uniquement avec de l'eau pendant 6 semaines. Des échantillons ont été prélevés de la face palatine de l'appareil avant et après traitement.	Comptage des colonies de <i>Candida</i>	Une augmentation significative des niveaux de <i>Candida</i> a été détectée pour le groupe contrôle pendant le traitement ( $p = 0,0008$ ). Une diminution non significative des niveaux de <i>Candida</i> pendant le traitement a été trouvée pour le groupe expérimental ( $p = 0,353$ ).

### 3. Discussion

A propos des différentes **solutions liquides** étudiées, le gluconate de chlorhexidine (Periogard®) et l'hypochlorite de sodium ont été prouvés comme étant significativement plus efficaces que le chlorure de cetylpyridinium (Cepacol®) et la solution enzymatique Ortoform® respectivement. Néanmoins, ces quatre solutions n'ont **pas été comparées** l'une avec l'autre, rendant impossible le fait de discuter de la supériorité de l'une d'entre elles. La plupart d'entre elles sont déjà **communément utilisées** dans d'autres domaines, où leur efficacité a déjà été démontrée.

Periogard® est un bain de bouche contenant du **gluconate de chlorhexidine** en tant que substance active principale, dont l'effet **antiseptique** a déjà été prouvé, étant par conséquent largement utilisé dans le traitement des maladies parodontales (30).

Cepacol® est un spray contenant du **chlorure de cetylpyridinium**, utilisé dans le traitement des maux de gorge (31). Son efficacité a été démontré pour cette utilisation spécifique, mais il reste **moins efficace** que le gluconate de chlorhexidine pour la désinfection des appareils orthodontiques. Au-delà de l'efficacité du produit, Lessa et al.(27) ont relevé que les solutions en spray seraient **plus pratique** et peut-être économiques que les autres formes galéniques.

**L'hypochlorite de sodium** est un principe actif communément utilisé en dentisterie, particulièrement dans le domaine de l'endodontie pour la désinfection canalaire. Lima et al. ont montré son **efficacité significative** comparément à la solution Ortoform® ou à l'absence de traitement. Néanmoins, l'odeur et le goût laissés par l'hypochlorite de sodium peut amener la question du rinçage de l'appareil après son nettoyage, et sa capacité à **blanchir** la résine acrylique peut représenter un inconvénient.

La solution enzymatique Ortoform®, d'autre part, n'a **pas montré de différence** significative avec le groupe contrôle. L'enzyme protéolytique semblant être une piste intéressante à explorer, il serait peut-être nécessaire d'augmenter la durée de trempage de l'appareil afin d'avoir un effet antimicrobien significatif. Cependant, cela doit être considéré en prenant compte de la durée de port nécessaire pour que l'appareil orthodontique amovible puisse avoir l'effet escompté dans la thérapeutique.

En ce qui concerne les **comprimés nettoyants du commerce**, trois marques différentes ont été évaluées dans cette revue : NitrAdine® Ortho Junior (22,23,28), Fittydent® (28) et Kukis®. NitrAdine® et Kukis® partagent le même principe actif (**l'acide citrique**) et des

excipients similaires leur conférant leurs propriétés effervescentes (carbonate de sodium, perborate de sodium), en se basant sur le site internet des fabricants. Les comprimés Fittydent® semblent avoir une composition proche de des comprimés NitrAdine® et Kukis®. Ils ont tous démontré un **effet significatif** sur la **réduction du biofilm** en comparaison avec l'eau (28) ou un comprimé placebo (22,23). Spécifiquement, les comprimés NitrAdine® semblent avoir un effet plus bactériostatique que bactéricide sur les *Candida*.

De surcroît, selon Fathi et al. (28), tandis qu'aucune démonstration n'a été faite pour établir une association significative entre la durée de l'exposition à l'agent actif et l'efficacité du nettoyage, une piste vers cette hypothèse pourrait être suggérée.

Enfin, considérant que le comprimé placebo était un comprimé effervescent dans les études de Vento-Zahra et al. et Decelis et al. (22,23), l'action de ces comprimés semble être liée à l'action chimique du produit, et non pas à l'action mécanique des microbulles produite par l'effervescence.

Les **extraits naturels** provenant de la cannelle, du neem et du katha ont démontré des capacités intéressantes à **diminuer la quantité de biofilm** sur les appareils orthodontiques amovibles, mais leur efficacité est néanmoins significativement inférieure à celle de la chlorhexidine. Ces plantes médicinales pourraient être considérées comme des **agents désinfectants naturels**, sachant que leur effet positif a déjà été démontré dans des domaines médicaux variés (32). Contrairement à la chlorhexidine, qui peut amener à des décolorations ou des tâches sur la résine acrylique, ces extraits pourraient être utilisés **sans effets indésirables**. Des recherches supplémentaires doivent être menées pour préciser cette possible alternative aux produits chimiques utilisés actuellement.

Concernant les agents chimiques incorporés dans la résine, tels que le **methacryloxy-silicate d'ammonium quaternaire (QAMS)**, Liu et al. (25) ont montré une activité **antimicrobienne** favorable par cet agent contre le biofilm dentaire. Ces résultats correspondent avec les études in vitro menées par Gong et al. (33,34), qui ont démontré des **propriétés mécaniques supérieures** des résines contenant du QAMS, sans cytotoxicité significative. De plus, ils ont évalué l'efficacité au long terme de l'agent, et ont prouvé que le principe actif reste stable dans le temps. D'autres études in vitro ont utilisé d'autres molécules, telles que des revêtements **photo catalyseurs** réagissant aux UV (35), des **nanoparticules** (36–38) ou des extraits de plantes et d'algues (39,40). Tous ont montré des résultats encourageants sur leurs propriétés antimicrobiennes, néanmoins aucune de ces

études ne fournissaient de résultats *in vivo*, ce qui pourrait représenter une piste intéressante à explorer.

Si on confronte les **conseils** que les orthodontistes donnent à leurs patients à propos du soin de leurs appareils amovibles avec ce qui a été montré dans cette revue, il y a des **divergences** qui ne doivent pas être ignorées. En se basant sur des études par questionnaire menées par Eichenauer et al. (14) et Tsolakis et al. (41), presque tous les orthodontistes recommandent un **brossage mécanique** de l'appareil à l'aide d'une brosse à dents. Également, une petite partie d'entre eux recommandent l'usage associé d'un **nettoyant chimique**, en mentionnant des nettoyant à prothèse, des solutions de désinfections du commerce, du vinaigre, ou de l'acide citrique dilué dans de l'eau. Malgré les preuves significatives d'une meilleure efficacité de l'association d'un brossage manuel et d'un agent chimique par rapport au brossage seul, la majorité des praticiens **ne recommandent pas** cette solution.

Enfin, des remarques additionnelles concernant cette revue systématique ne peuvent pas être mises de côté. Premièrement, les protocoles de désinfection ne doivent pas **dégrader la structure** initiale de la résine PMMA. Néanmoins, seule une des études incluses (26) a mentionné l'évolution de **l'état de surface** des appareils. De plus, étant donné que l'état de surface influence **l'adhésion** du biofilm à celle-ci, il serait intéressant de réaliser des recherches sur ce point dans le but de limiter son adhésion.

Malgré le fait que cinq des études incluses impliquent que les patients réalisent eux-mêmes tout ou partie du protocole de nettoyage (22–24,26,27), seuls Decelis et al. ont décrit des critères clairs **d'évaluation de l'observance** du patient dans le port de l'appareil. Aucune de ces études n'a décrit de manière d'évaluer l'observance des patients inclus dans la réalisation des protocoles de nettoyage. Cela représente une **limite** qu'il est important de considérer lors de l'étude de protocole de nettoyage à domicile par le patient.

Aucune étude n'a fait de **comparaison directe** entre le brossage manuel et l'agent chimique seul. Il serait intéressant d'avoir un **référentiel** pour l'efficacité du brossage seul. Dans tous les cas, le brossage manuel semble être une étape essentielle du protocole.

**L'hétérogénéité** entre les différentes études et l'absence de comparaison entre les méthodes n'a pas permis l'établissement d'un protocole clair et précis. En conclusion, peu d'études ont été incluses dans cette revue systématique, et, comme Lessa et al.(27) l'ont relevé : réalisons-nous à quel point la contamination des appareils orthodontiques amovibles en résine est importante ?

#### 4. Conclusion

En se basant sur cette revue systématique de la littérature, différentes méthodes de nettoyage et de désinfection des appareils, qu'elles soient des solutions antimicrobiennes, des comprimés nettoyant commerciaux, des extraits naturels de plantes ou encore des molécules incorporées au sein de la résine, semblent avoir un impact positif sur le contrôle ou la suppression de la formation du biofilm. Néanmoins, les méthodes n'ayant pas toutes été comparées entre elles, il nous a été impossible de savoir laquelle est la plus efficace. D'autres études, notamment des essais cliniques randomisés, sont clairement nécessaires pour explorer plus profondément le sujet.

Après retravail de l'ensemble de cette revue de la littérature, cette dernière a été soumise pour publication dans la revue *Children* (Facteur d'impact : 2.825) où des modifications ont été à nouveau apportées à la suite des différents commentaires des relecteurs de la revue. Ainsi, en octobre 2021, ce travail a pu être publiée sous la référence (16) : Charavet C, Graveline L, Gourdain Z, Lupi L. What Are the Cleaning and Disinfection Methods for Acrylic Orthodontic Removable Appliance? A Systematic Review. *Children*. 2021 Oct 26;8(11):967.

Open Access Systematic Review

### What Are the Cleaning and Disinfection Methods for Acrylic Orthodontic Removable Appliance? A Systematic Review

by  Carole Charavet <sup>1,2,3,\*</sup> ,  Léa Graveline <sup>1,2</sup> ,  Zoé Gourdain <sup>1,2</sup>  and  Laurence Lupi <sup>1,2,3</sup> 

#### Abstract

(1) Background: The use of removable orthodontic appliances, which is common in early ages, requires careful hygiene, as several different microorganisms are found on their surface during the orthodontic treatment. (2) Methods: Comprehensive electronic searches were conducted up to May 2021. Randomized controlled trials (RCTs) or controlled clinical trials (CCTs), prospective or retrospective, evaluating the efficacy of cleaning and disinfection methods for acrylic removable orthodontic appliances, redacted in the English language, were included. Three independent blinding review authors were involved in study selection, data extraction, and bias assessment. (3) Results: A total of 2491 records were screened and eight studies (six RCTs and two CCTs) fulfilled the inclusion criteria. Among the overall cleaning and disinfection methods described in the included studies, four categories could be defined: liquid antimicrobial agents, commercial tablet cleansers, natural plant extracts and incorporation of quaternary ammonium methacryloxy silicate, all of which demonstrated superior efficacy compared to the placebo/negative control. However, the different methods were not compared with each other. (4) Conclusions: Biofilm control on acrylic orthodontic removable appliances can be performed using the different cleaning and disinfection methods considered in the included studies. Further studies are needed to define the most effective technique. Registration: PROSPERO CRD 42021269297. [View Full-Text](#)

**Keywords:** removable orthodontic appliances; biofilm; cleaning methods; disinfection methods

Pour information, une seconde revue de la littérature (42) abordant la même thématique pour les aligneurs orthodontiques a également été élaborée à laquelle j'ai participé.

### III. Etat des connaissances

#### 1. Flore microbienne orale et biofilm

##### a. Flore orale : définition et composition






La cavité orale est constituée d'une **membrane muqueuse** recouverte d'un épithélium stratifié kératinisé (par exemple, au niveau du palais) ou non kératinisé, de la langue avec une surface papillaire et de structures dures que sont les dents, au-dessus ou en-dessous du sulcus gingival. Chacune de ces zones constitue une **niche écologique** séparée, et chaque niche promeut le développement d'un microbiome distinct (43,44).

L'environnement de la cavité buccale est constamment **transformé**, par l'âge, le changement de denture, la présence de dispositifs médicaux, l'alimentation ou encore les maladies systémiques. Notamment chez les enfants, population majoritaire des traitements orthodontiques par dispositif amovible, le changement de **denture** et **l'éruption** des dents définitives viennent provoquer des modifications notables du microbiome buccal et de l'écosystème oral en général (45).

La flore orale microbienne commensale est extrêmement **variée** et consiste en de nombreuses espèces de bactéries, levures, virus, mycoplasmes, et quelques protozoaires. Dans les dernières données acquises de la science, plus de **700 organismes** procaryotes ont été identifiés dans le microbiote oral dont **34%** ne sont pas ou difficilement cultivables. (46) On y trouve plusieurs phyla de microorganismes, y compris : *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlamydiae*, *Chloroflexi*, *Euryarchaeota*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, ou encore *Spirochaetes* (43).

Plus spécifiquement, concernant la plaque dentaire en elle-même et en particulier la plaque sous-gingivale, on retrouve de nombreuses espèces microbiennes **anaérobies strictes** ou **facultatives**. Parmi elles, des espèces **procaryotes** telles que des cocci, des bacilles, des spirochètes ou encore des mycoplasmes ; mais aussi des espèces **eucaryotes** comme *Candida albicans* ou des membres du genre *Trichomonas* (47).

Tableau 5 : Liste des microorganismes présents dans la plaque dentaire (47)

	Gram  positive		Gram  negative		
	anaérobie facultatives	anaérobies strictes	anaérobies facultatives	anaérobies strictes	
<b>Procaryotes</b>					
<b>Cocci</b> 	<b>Streptococcus</b> - <i>S. anginosus</i> (S. milleri) - <i>S. mutans</i> - <i>S. sanguis</i> • Ss - <i>S. oralis</i> - <i>S. mitis</i> - <i>S. intermedius</i>	<b>Peptostreptococcus</b> - <i>P. micros</i> • Pm  <b>Peptococcus</b>	<b>Neisseria</b>  <b>Branhamella</b>	<b>Veillonella</b> - <i>V. parvula</i>	
<b>Bacille</b> 	<b>Actinomyces</b> - <i>A. naeslundii</i> • An - <i>A. viscosus</i> • Av - <i>A. odontolyticus</i> - <i>A. israelii</i>  <b>Propionibacterium</b>  <b>Rothia</b> - <i>R. dentocariosa</i>  <b>Lactobacillus</b> - <i>L. oris</i> - <i>L. acidophilus</i> - <i>L. salivarius</i> - <i>L. buccalis</i>	<b>Eubacterium</b> - <i>E. nodatum</i> • En - <i>E. saburreum</i> - <i>E. timidum</i> - <i>E. brachy</i> - <i>E. alactolyticum</i>  <b>Bifidobacterium</b> - <i>B. dentium</i>	<b>Aggregatibacter</b> - <i>A. actinomycetemcomitans</i> • Aa  <b>Capnocytophaga</b> - <i>C. ochracea</i> - <i>C. gingivalis</i> - <i>C. sputigena</i>  <b>Campylobacter</b> - <i>C. rectus</i> • Cr - <i>C. curvus</i> - <i>C. showae</i>  <b>Eikenella</b> - <i>E. corrodens</i> • Ec  <b>Haemophilus</b> - <i>H. aphrophilus</i> - <i>H. segnis</i>	<b>Porphyromonas</b> - <i>P. gingivalis</i> • Pg - <i>P. endodontalis</i> <b>Prevotella</b> - <i>P. intermedia</i> • Pi - <i>P. nigrescens</i> - <i>P. melaninogenica</i> - <i>P. denticola</i> - <i>P. loescheii</i> - <i>P. oris</i> - <i>P. oralis</i> <b>Bacteroides</b> - <i>T. forsythia</i> • Tf - <i>B. gracilis</i> <b>Fusobacterium</b> - <i>F. nucleatum</i> • Fn - <i>F. periodonticum</i> <b>Selenomonas</b> - <i>S. sputigena</i> - <i>S. noxia</i>	
<b>Spirochetes et mycoplasmes</b> 	<b>Mycoplasma</b> - <i>M. orale</i> - <i>M. salivarium</i> - <i>M. hominis</i>		<b>Spirochetes de la GUN</b> <b>Treponema sp.</b> - <i>T. denticola</i> • Td - <i>T. socranskii</i> - <i>T. pectinovorum</i> - <i>T. vincentii</i>		
<b>Eucaryotes</b>	<b>Candida</b> - <i>C. albicans</i>			<b>Entamoeba</b>	<b>Trichomonas</b>

Parmi ces microorganismes, **six groupes microbiens** intrinsèquement liés ont été reconnus (48) :

- ▶ Le groupe des **Actinomycètes** ;
- ▶ Un complexe **jaune**, consistant de membres du genre *Streptococcus* ;
- ▶ Un complexe **vert**, incluant des espèces du genre *Capnocytophaga*, le sérotype A d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AA), *Eikenella corrodens* et *Campylobacter* ;
- ▶ Un complexe **violet**, constitué de *Veillonella parvula* et *Actinomyces odontolyticus* ;
- ▶ Un complexe **orange**, composé notamment de plusieurs espèces de *Campylobacter*, *Prevotella* ou *Fusobacterium* ;

- ▶ Un complexe **rouge** composé par *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythia* et *Treponema denticola*.

Les complexes jaune, vert et violet recensent les colonisateurs **précoces** de la plaque dentaire, les espèces retrouvées dans le biofilm précoce. Les complexes orange et rouge, eux, sont particulièrement associés à la maladie **parodontale**. Les bactéries du complexe rouge sont retrouvées ensembles au niveau de la **jonction épithéliale** des poches parodontales profondes chez les patients atteints de parodontite (49).

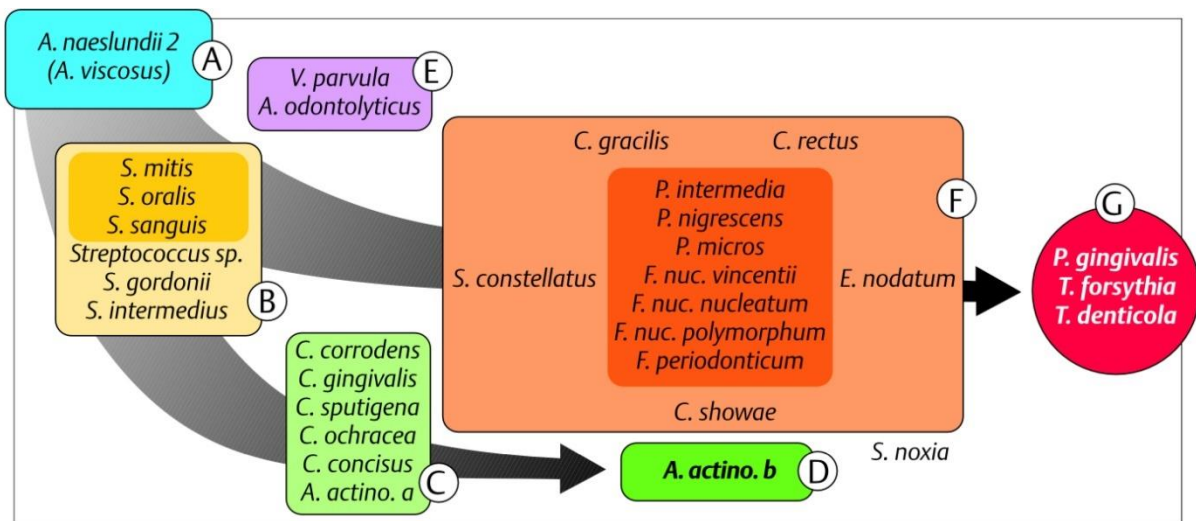


Fig. 6 : Illustration des différents complexes microbiens de la plaque dentaire

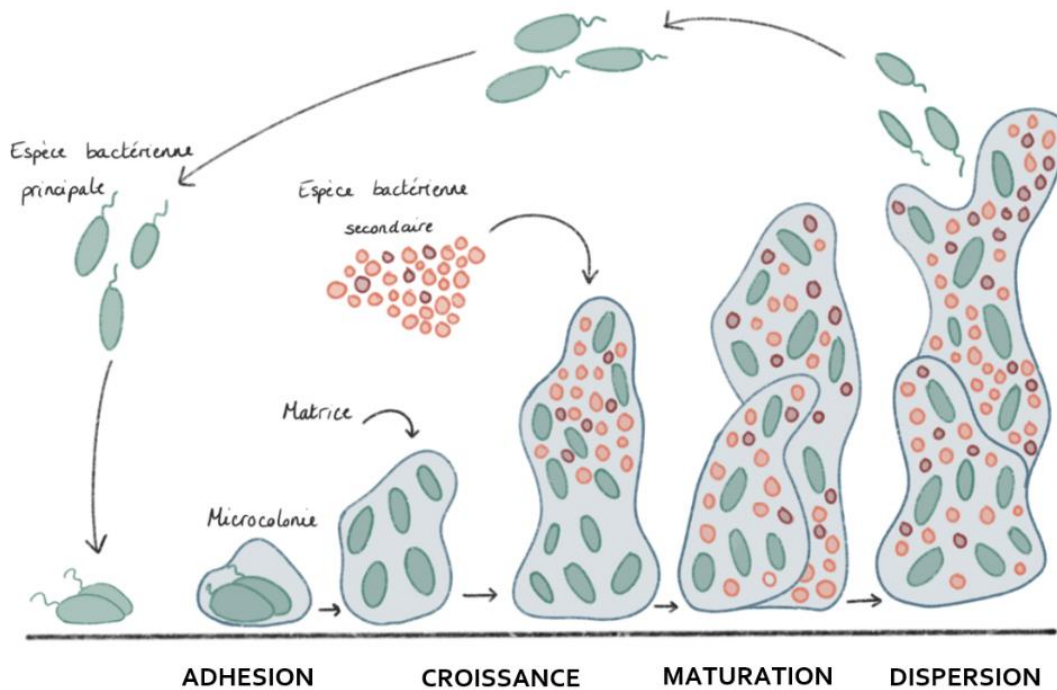
### b. Biofilm : définition et formation

Le concept de biofilm désigne une communauté **multicellulaire** plus ou moins complexe, possiblement **symbiotique**, de micro-organismes adhérant **entre eux** et à une **surface**. Il implique la sécrétion par ces micro-organismes d'une **matrice** adhésive et protectrice, composée essentiellement de **biopolymères**. Il se forme généralement en milieu aqueux. (50)

La formation du biofilm est un processus **dynamique**, pouvant être résumé en **5 étapes** :

- 1) Fixation réversible initiale des bactéries sur les substrats, via la pellicule acquise exogène (PAE), sur les surfaces dures ;
- 2) Fixation irréversible : sécrétion de la matrice extra-cellulaire ;
- 3) Développement du biofilm : multiplication de bactéries déjà fixées et / ou fixation d'autres bactéries ; formation des colonies ;

- 4) Maturation du biofilm : production de polymères extracellulaires, de molécules de signalisation... ;
- 5) Dispersion des bactéries : d'un site à un autre via la salive.



*Fig. 7 : Etapes de formation et dispersion du biofilm bactérien (Document personnel)*

La formation du biofilm est un processus **normal** sur les surfaces dentaires, mais c'est le **déséquilibre** de celui-ci avec des apports exogènes anormaux (ex : alimentation excessivement sucrée, acidification du milieu salivaire à la suite d'apports alimentaires trop nombreux dans la journée...) qui provoque des pathologies telles que la carie ou la parodontite.

Pour que le biofilm provoque une infection (*notamment parodontale*), les bactéries doivent :

- ▶ **Adhérer** à un support ;
- ▶ Créer un environnement favorable à leur **croissance** ;
- ▶ Se **nourrir**, que ce soit par l'apport nutritionnel de l'alimentation de l'hôte, ou par une autre espèce bactérienne ;
- ▶ Se **défendre**, contre le système immunitaire de l'hôte et contre les autres microorganismes.

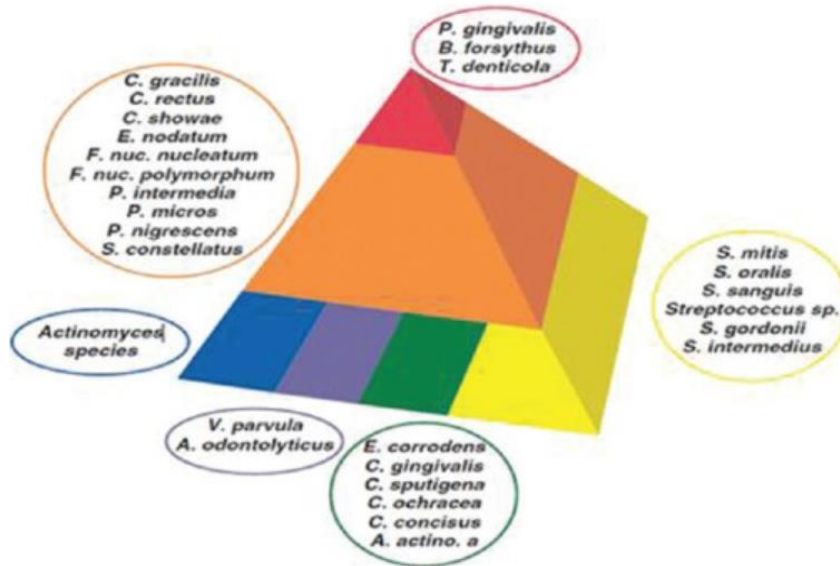


Fig. 8 : Pyramide reprenant le concept des complexes bactériens, la base de la pyramide représentant les colonisateurs précoces des surfaces dentaires (49)

Au sein du biofilm oral se formant sur les dents, et par extension, sur les appareils orthodontiques, nombre d'espèces microbiennes sont des pathogènes opportunistes, profitant de conditions de dysbioses pour provoquer des lésions ou infections.

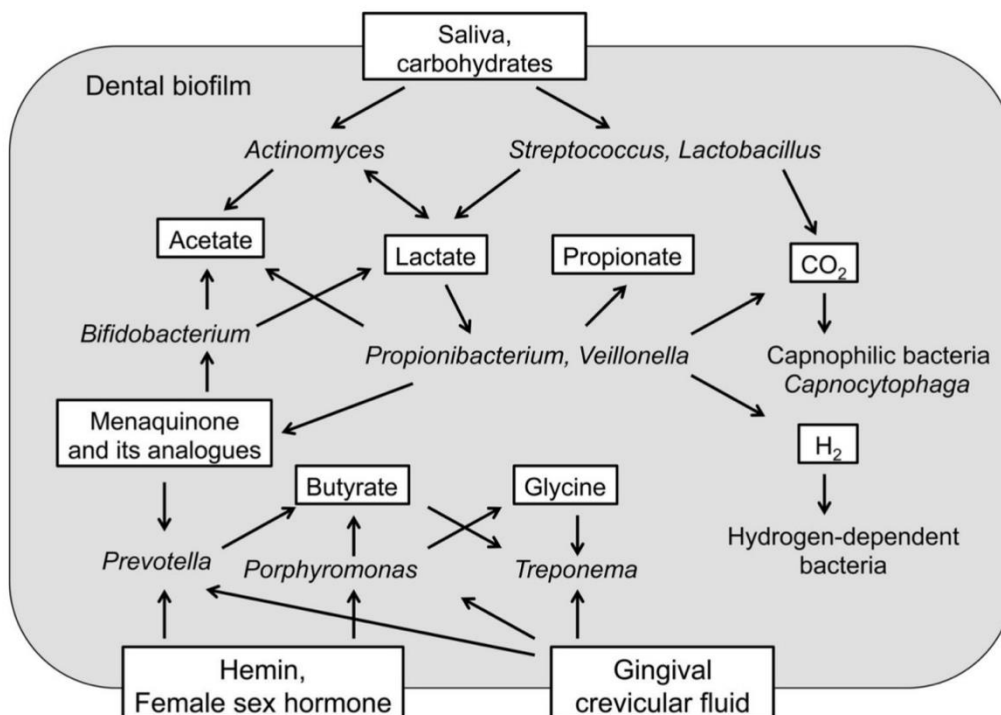


Fig. 9 : Exemples d'interactions nutritionnelles entre les microorganismes oraux

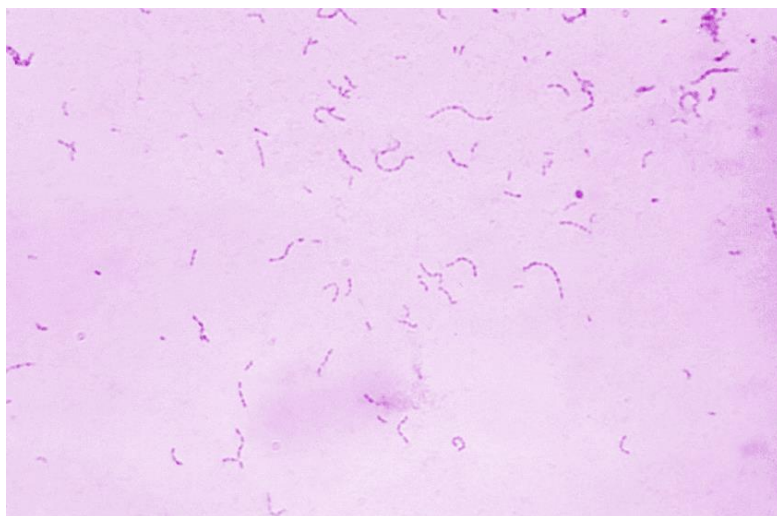
Dans une revue narrative de *P. D. Marsh et al.* (51), les **interactions** entre bactéries ou entre microorganismes de différents royaumes ont été décrites comme **variées**, impliquant des associations synergiques au niveau physique et nutritionnel, des communications intercellulaires ou encore dans certains cas des transferts génétiques.

On peut voir dans le schéma proposé par les auteurs la production de lactate par les bactéries du genre *Streptococcus* ou *Lactobacillus*, incriminée comme étant un des acteurs importants de la maladie carieuse, alimentée par les sucres dans la salive.

Nous avons choisi d'analyser la présence de trois d'entre elles, spécifiquement impliquées dans la maladie carieuse ou les parodontites.

### c. *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* est une bactérie cocci **anaérobie facultative** de type Gram positif appartenant à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Streptococcaceae*. Il est nommé « mutans » de par sa capacité à perdre sa forme de coque, et apparaît souvent comme un court bâtonnet ou un cocco-bacille (52).



*Fig. 10 : Photographie au microscope de nombreux Streptococcus mutans sur un milieu de culture au bouillon de thioglycolate, après coloration de Gram (53)*

Elle est présente en majorité dans les **creux** et les **sillons dentaires**, et représente environ 39% de la totalité des streptocoques de la cavité buccale (54). SM fait partie des colonisateurs précoces des surfaces dentaires, aux côtés de bactéries du genre *Neisseria spp.*

Dès 1924, elle est identifiée comme étant la bactérie responsable de la **carie dentaire** (55), mais fait partie des bactéries commensales de la flore orale, et ne représente pas en elle-même un pathogène. Elle est identifiée comme étant responsable des caries coronaires, contrairement à *Streptococcus sobrinus* qui serait plutôt responsable des caries des surfaces lisses.

Son action cariogène a pour origine principale la production **d'acide lactique** par fermentation en consommant des sucres (apportés par l'alimentation de l'hôte). L'acidification du milieu amène à une **déminéralisation** de l'émail, le rendant beaucoup plus vulnérable aux attaques extérieures. SM possède également de grandes capacités d'adhésion, et peut rester assez longtemps au contact des tissus dentaires pour provoquer une déminéralisation grâce à la production de polysaccharides extracellulaires.

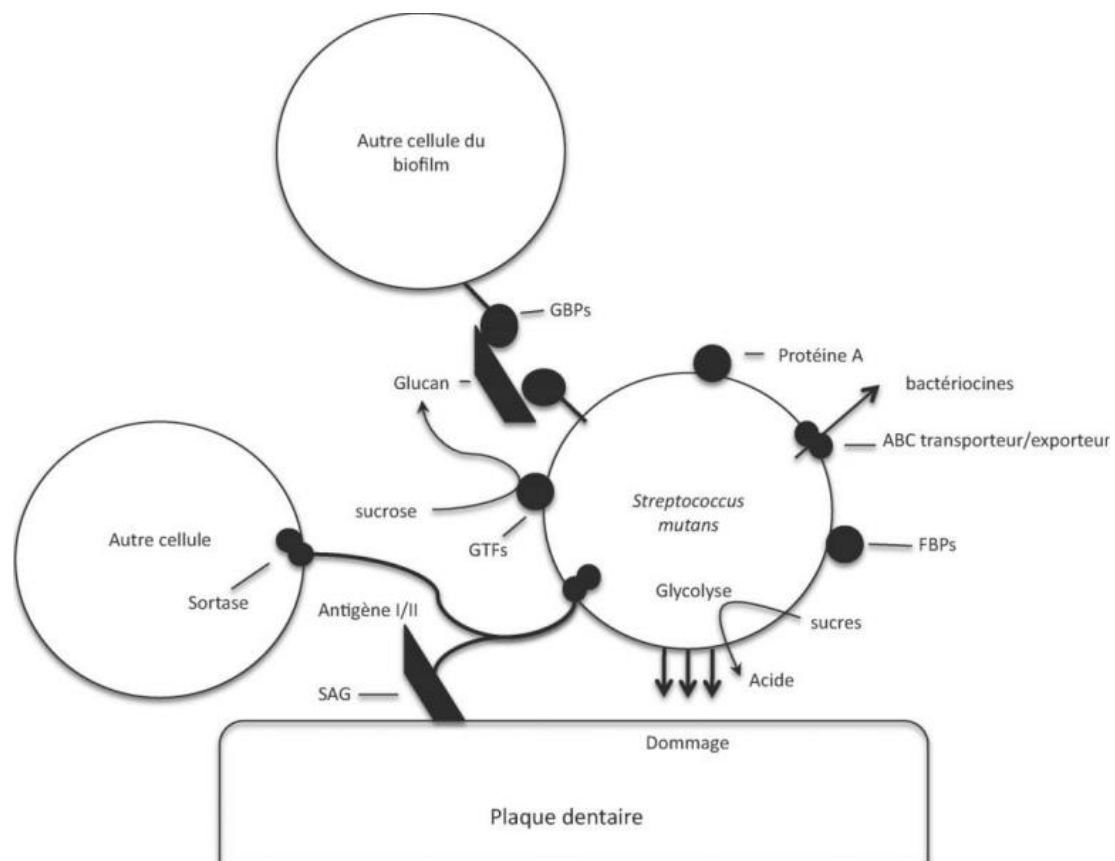


Fig. 11 : Principaux caractères de pathogénicité de SM (56)

Le schéma précédent illustre en détail les capacités de pathogénicité de SM : on y retrouve la **métabolisation** des sucres en acides ainsi que les molécules permettant les **mécanismes d'adhésion** aux autres cellules du biofilm via son antigène ou par les Glucan Binding Protein (GBP).

Additionnellement, il a été montré une **augmentation** de la quantité de SM dans la salive des patients porteurs **d'appareils orthodontiques amovibles**, amenant à une plus forte probabilité de retrouver cet organisme dans le biofilm de l'appareil (4).

d. *Actinomyces naeslundii*

*Actinomyces naeslundii* (AN) est une bactérie de forme **bacillaire** Gram positive, de la famille des *Actinomycète*. Les actinomycètes sont connus pour être des bactéries formant des **filaments**, pouvant être confondues avec des champignons. C'est à l'instar de SM une bactérie **commensale** de la flore orale qui, selon les habitudes d'hygiène et d'alimentation, peut être impliquée dans la maladie carieuse et la maladie parodontale. Il est connu pour coloniser les surfaces dentaires et buccales en se liant à d'autres bactéries telles que *Streptococcus sanguinis*, et se retrouve dans la plaque supra-gingivale ainsi qu'à la surface de la dentine déminéralisées de caries radiculaires. Par rapport à SM, il présente une vitesse de croissance plus lente au sein du biofilm, et se retrouve dans les **couches internes** (57).



Fig. 12 : *Actinomyces sp.* en culture sur gel d'agar-agar

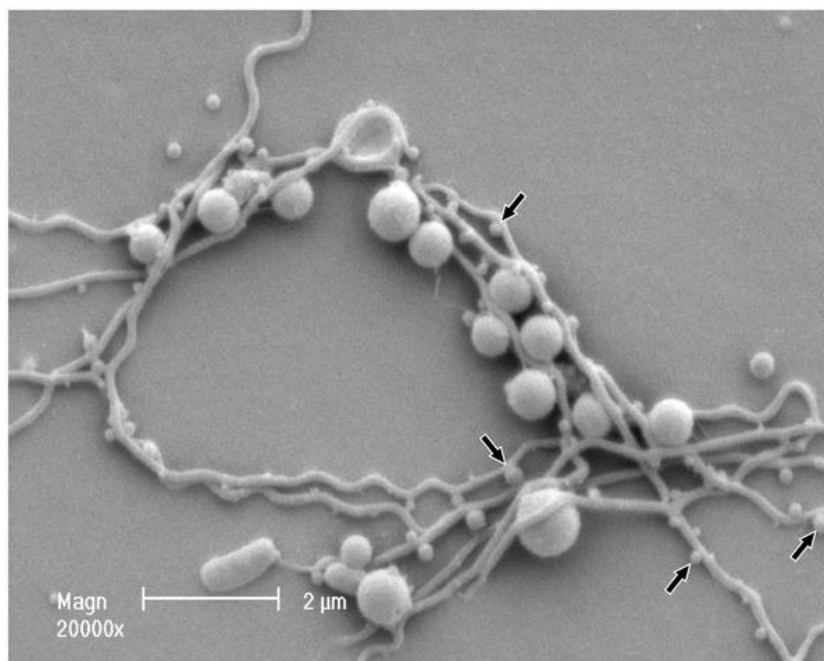
Dans la littérature, on retrouve des **interactions** entre AN et SM au sein d'un même biofilm amenant à une plus grande **résistance à la chlorhexidine** (58). Cette résistance peut amener à considérer, si les deux espèces sont présentes dans le biofilm des appareils, d'autres agents désinfectants, tels que le chlorure de cetylpyridinium ou l'acide citrique.

Bien que peu fréquemment, *Actinomyces naeslundii* peut être la cause, s'il passe dans le sang, d'endocardites infectieuses. (59)

e. Treponema denticola

*Treponema denticola* (TD) est une bactérie **spirochète anaérobie** Gram négative, associée à l'incidence et la sévérité des maladies parodontales. Elle fait partie du **complexe rouge** aux côtés de *Porphyromonas gingivalis* et *Tannerella forsythia*.

*Treponema denticola* est associée en particulier à la **parodontite précoce**, la gingivite nécrotique ou encore la péricoronarite aigue. L'accumulation de cette bactérie et d'autres ainsi que de leurs produits dans les poches parodontales amène à une plus forte susceptibilité des cellules épithéliales à la lyse et aux dégâts (60).



*Fig. 13* : Image au microscope électronique de *T. denticola* et *P. gingivalis* en culture (x20000) (61)

Dans une étude de *Simonson et al.*, la présence de *T. denticola* a été analysée chez trois groupes de patients, dont l'un présentait une parodontite sévère. Un ratio de 2 :1 dans la quantité de *T. denticola* a été trouvé chez le groupe atteint sévèrement, en comparaison avec le groupe sain et le groupe atteint de parodontite modérée (62).

L'association de TD avec l'incidence des parodontites sévères permet d'indiquer sa recherche sur les appareils orthodontiques afin de, si elle est présente, la cibler dans l'établissement de protocoles de désinfection.

De plus, il a été montré une **augmentation** de la présence de TD dans la salive de patients porteurs **d'appareils orthodontiques fixes** (63). Il est possible donc de supposer une présence importante de TD dans le biofilm des appareils amovibles.

## 2. Appareils orthodontiques amovibles

Les appareils orthodontiques amovibles sont principalement des appareils **orthopédiques**, ayant pour but la correction d'un décalage squelettique, et nécessitant un port minimum de **12 à 14** heures par jour, principalement pendant la nuit, pendant **10 à 12 mois**. La majorité de l'appareil est constituée de **résine**, agrémentée d'autres éléments **métalliques** tels que des vérins ou bien des arcs. (64)

Considérant ces faits, il apparaît évident que le nettoyage de ces appareils est primordial. La durée quotidienne de port de l'appareil est suffisante au développement d'un biofilm à sa surface, sachant que le biofilm sur les surfaces dentaires se forme au bout de seulement **2 heures** après le dernier brossage. (65)

On distingue plusieurs catégories d'appareils amovibles, utilisés dans des thérapeutiques précises. Les activateurs souples, faits de polyvinyle silicone, ne seront pas abordés du fait de la différence de biomatériaux.

### a. Activateurs rigides

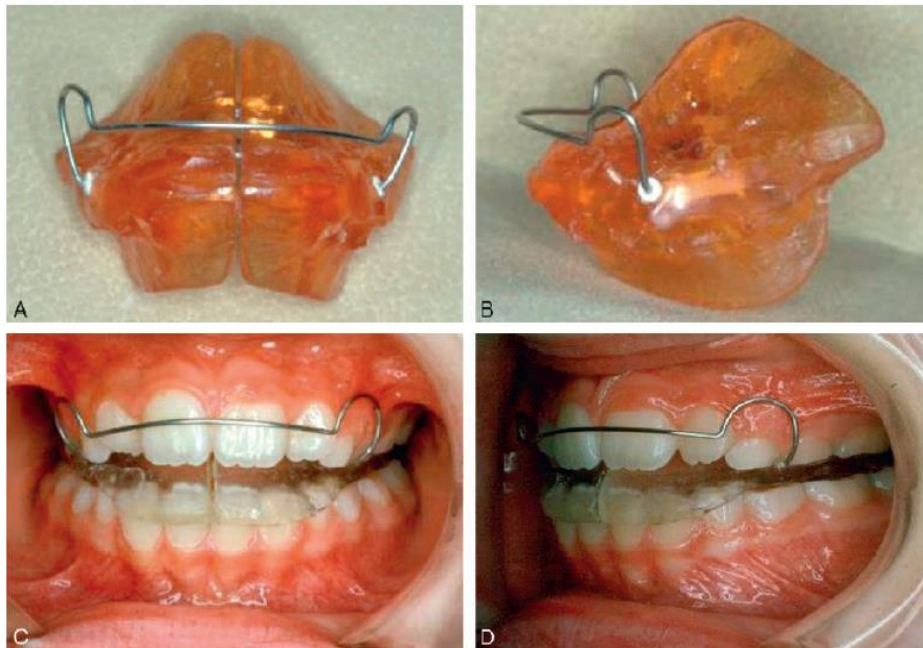
Les activateurs sont des appareils qui permettent **d'induire** une **position** de la mandibule différente de celle d'occlusion ou de repos.

En ce qui concerne les **activateurs de classe II**, une classification a été proposée par Lautrou, en se basant sur les caractéristiques du dispositif. (66)

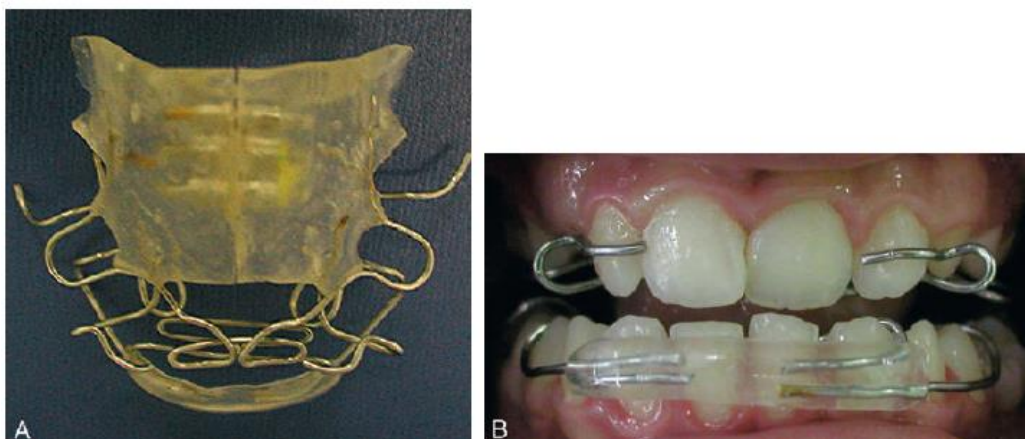
Tableau 6 : Classification des activateurs de classe II selon Lautrou (62)

<b>Activateurs monobloc rigide</b>	Une résine vient s'interposer entre les maxillaires, pour dicter à la mandibule la position « d'activation ». La résine est au contact des dents et de certaines muqueuses ( <i>palais, langue notamment</i> ). On peut y associer un vérin, pour contrôler le sens transversal, ou bien une force extra-orale.
<b>Activateurs élastiques ou composites</b>	Ils sollicitent la musculature pour propulser la mandibule de manière réflexe. Ils sont constitués de plusieurs pièces de résine solidarisées et agrémentées de fils métalliques orthodontiques.

<p><b>Activateurs propulseurs à butée</b></p>	<p>Ils propulsent la mandibule grâce à un guidage mécanique d'éléments solidaires du maxillaire et de la mandibule. Cela permet de la contraindre à avancer lors du mouvement de fermeture. Dans cette catégorie, sont amovibles les bielles de Herbst sur gouttières non scellées, et la bielle de Martine Tavernier.</p>
---	--



*Fig. 14 : Activateur d'Andresen de classe II (64)*

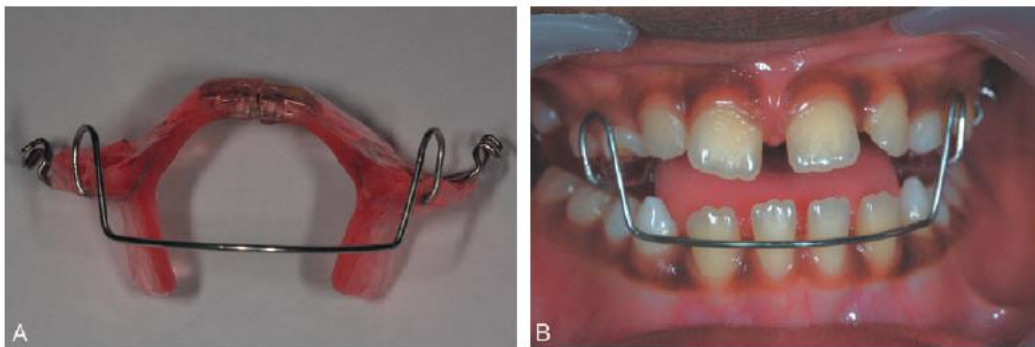


*Fig. 15 : Activateur composite, variante du Gebissformer de Bimler, avec un vérin d'expansion transversale (64)*



*Fig. 16 : Bielles de Herbst sur gouttière (64)*

Il existe plusieurs types d'activateurs de classe III. Ils vont, en général, mettre la mandibule en position de rétropulsion forcée. Ils ne sont utilisés qu'en cas de prognathie ou de proglissement mandibulaire, et sont inutiles en cas de classe III squelettique d'origine maxillaire.



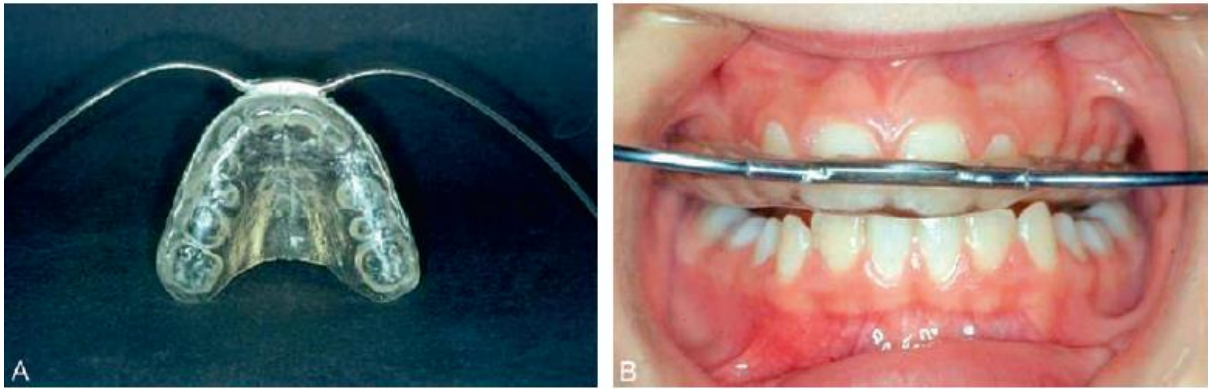
*Fig. 17 : Activateur de classe III (64)*

*b. Forces extra-orales*

Force extra-orale sur gouttière

Ces appareils appliquent des **forces lourdes**, allant de 400 à 1500g, et se portent 12 heures dans la journée. Ils permettent un freinage de la croissance sagittale du maxillaire.

Les forces extra-orales sont utilisées dans les cas de classe II squelettique à prédominance maxillaire.



*Fig. 18 : Force extra-orale sur gouttière (64)*

### Masque de Delaire

Le masque est composé de **trois éléments** :

- ▶ Un élément intrabuccal, scellé, pouvant être un double arc ou une gouttière ;
- ▶ Le masque, extrabuccal ;
- ▶ Des élastiques.

La partie intra-buccale de l'appareil étant scellée, on ne peut considérer les patients suivant un traitement par ce type d'appareil dans l'étude clinique.

### **3. PCR et PCR quantitative (qPCR)**

La réaction en chaîne par polymérase, ou PCR (Polymerase Chain Reaction) est un procédé découvert en **1983** par Karry Mullis (67). Elle consiste en **l'amplification** d'une séquence ADN spécifique entre une groupement complexe d'autres séquences, à l'aide d'enzymes et de primers. Elle permet la **détection** de la présence de séquences ADN, même présentes en infime quantité dans l'échantillon, et est très largement utilisée dans le monde scientifique à des fins **diagnostiques** ou d'études **génomiques** (68)

La PCR **quantitative**, contrairement à la PCR « simple », permet une **quantification** de la présence de la séquence ADN recherchée, et non une simple détection.

Dans le domaine de l'orthodontie, la PCR a **très peu été utilisée** pour l'analyse du biofilm sur les **appareils amovibles**, le comptage des CFU (Colony Forming Unit) étant la technique d'analyse du biofilm retrouvée en majorité dans la littérature concernant ces appareils. Les techniques de biologie moléculaire telles que la PCR ont été plus souvent utilisées pour des appareillages fixes (bagues, brackets, tubes molaires, contentions multibrins...). (69)

### a. Principes de la qPCR

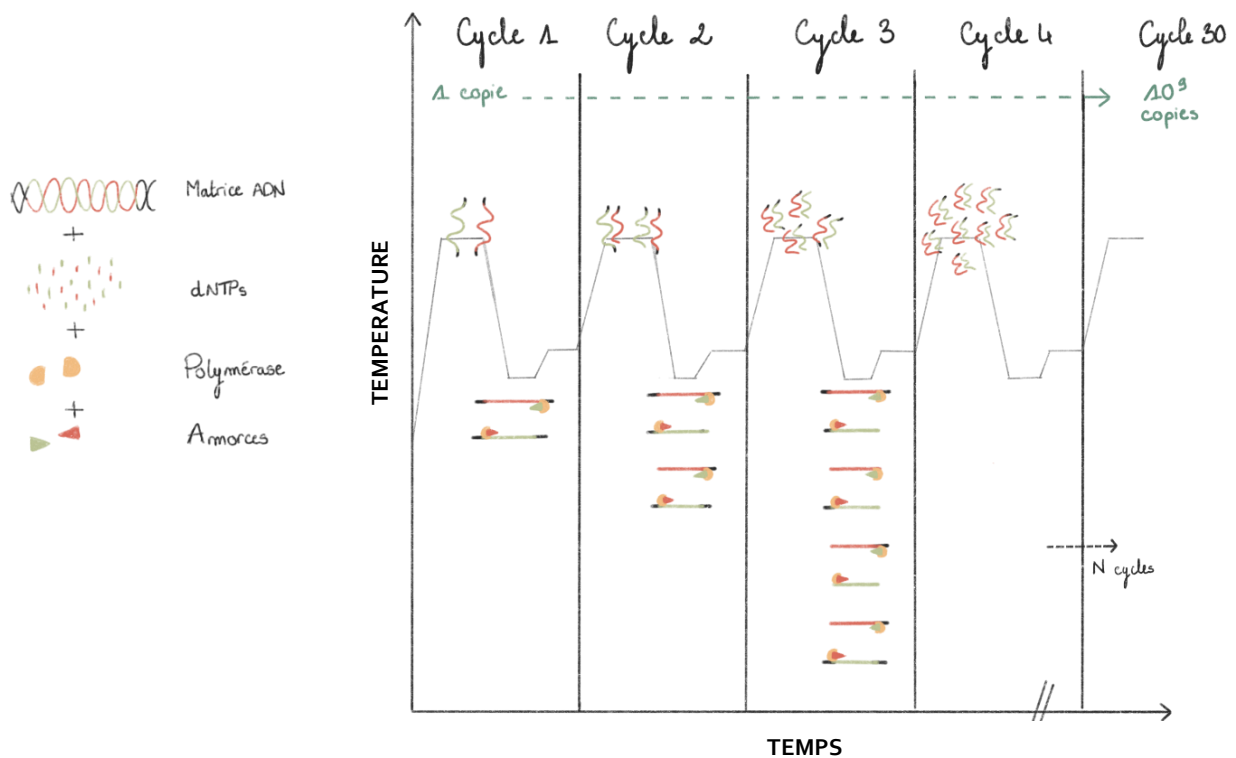


Fig. 19 : Schéma du principe des cycles de la PCR (Document personnel)

La PCR, comme son nom l'indique, est une réaction en **chaîne**, par cycles, comprenant chacun **3 paliers** de température, respectivement 95°C, 50 à 60°C et 72°C. Chaque palier est caractérisé par une réaction chimique distincte, et les réactions se répètent pendant 20 à 40 cycles.

La réaction nécessite plusieurs acteurs, qui sont :

- × L'**ADN**, préalablement extrait de l'échantillon choisi (*tissu, cellules, sang, salive, os...*) et purifié.
- × Les **deux amorces** (*une pour chaque brin*), choisies spécifiquement par rapport à la séquence ADN que l'on cherche à amplifier. Elles sont faites pour s'hybrider à une suite particulière de bases, et comportent environ 20 désoxyribonucléotides. Elles sont en très grande concentration par rapport à l'ADN.
- × Les **désoxyribonucléotides-tri-phosphates** (dNTPs), molécules de base de l'ADN, utilisées par la polymérase pour former les nouveaux brins d'ADN. Elles sont au nombre de 4 : l'adénine (dATP), la thymine (dTTP), la guanine (dGTP) et la cytosine (dCTP).

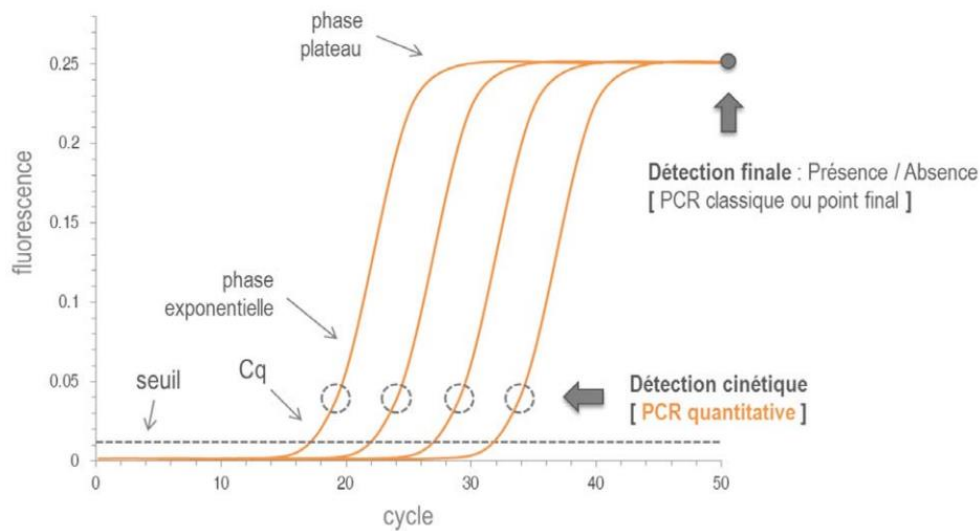
- × L'enzyme, la **TaqPolymérase**, qui peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir d'un autre brin et d'une amorce.
- × Le **milieu réactionnel**, contenant une solution tampon et des ions magnésium ( $MgCl_2$ ), permettant de définir un pH et une concentration saline optimaux pour le déroulement des réactions enzymatiques.

Chaque cycle est une suite de 3 réactions, se répétant jusqu'à la fin de la procédure : la **dénaturation** des brins, suivie de l'**hybridation** des amorces et enfin l'**élongation** du nouveau brin. (70)

Tableau 7 : Détail du déroulement des 3 phases d'un cycle de PCR

<b>Dénaturation</b>	95°C	L'ADN perd sa structure en double hélice, les liaisons hydrogène deviennent instable à cette température. L'ADN double brin se retrouve après cette phase sous forme d'ADN simple brin.
<b>Hybridation</b>	50 à 60°C	La température de cette phase est déterminée par les dNTPs qui composent les amorces. Celles-ci viennent se fixer à leur séquence complémentaire sur l'ADN simple brin.
<b>Elongation</b>	72°C	La Taq polymérase ( <i>issue d'une bactérie extrémophile, Thermus aquaticus</i> ) synthétise le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs présent dans le milieu réactionnel.

Théoriquement, à l'issue de chaque cycle, la quantité d'ADN présent dans l'échantillon est **doublée** ; et augmente **exponentiellement** du début à la fin de la procédure. La procédure complète de la PCR est également décrite en trois phases distinctes : la phase d'initiation, la phase exponentielle et la phase plateau.



*Fig. 20 : Cinétique de la PCR*

La PCR « classique » ne détectera que l'absence ou la présence de la séquence ADN ciblée, en se basant sur le dépassement d'un certain seuil de fluorescence.

La qPCR se base également sur une détection **cinétique** du dépassement de ce seuil, et permet de savoir après combien de cycles d'amplification le seuil a été atteint. Cette technique permet, avec l'utilisation d'une courbe étalon, de mesurer la quantité d'ADN présent, d'où l'appellation de PCR *quantitative*.

#### *b. Étapes préliminaires*

Outre le cas exposé dans ce travail (*écouvillonnage du biofilm sur une surface dure*), nombre d'échantillons sont éligibles à une analyse par PCR, notamment du sang total, du plasma, du sérum, de la salive, ou encore des tissus biopsiés.

Selon le type d'échantillon et les microorganismes concernés, la préparation pourra varier, mais elle suivra toujours 3 étapes :

- × **Lyse** : cette étape permet la libération de l'ADN du microorganisme auquel il appartient. Cela peut nécessiter une simple ébullition de l'échantillon, ou des techniques plus complexes pour certains microorganismes. La technique la plus classique est une lyse à la protéinase K en présence d'un détergent.
- × **Extraction de l'ADN** : l'ADN ayant été rendu accessible via l'étape de lyse, il est désormais nécessaire de le séparer du reste du mélange protéique. C'est en général une technique au phénol-chloroforme qui est utilisée, ou bien des colonnes dans lequel le mélange est filtré, et qui contiennent des agents adsorbants de l'ADN (*silice, résines anioniques...*).

- × **Précipitation de l'ADN**: pour le cas de la technique phénol-chloroforme, l'ADN est précipité avec de l'alcool et des sels.

## IV. Proposition d'un protocole de recherche

### 1. Introduction

Les conclusions de la revue systématique de la littérature à propos des protocoles de nettoyage des appareils orthodontiques amovibles, notamment **l'absence de consensus** et de directives claires, nous ont amené à considérer la nécessité de réaliser des études cliniques de haut niveau de preuve à ce sujet.

Il nous a semblé essentiel de revenir aux **racines** de la question avant de chercher à éliminer le biofilm sur ces appareils : quels sont les microorganismes que l'on retrouve au sein de ce biofilm ? Pour ce faire, nous avons choisi de nous centrer sur **trois bactéries**, détaillées précédemment, particulièrement pathogènes dans le cadre de la maladie carieuse et parodontale, mais aussi dans des affections systémiques graves telles que l'endocardite infectieuse d'origine bucco-dentaire.

De toute évidence, certaines bactéries sélectionnées étant des espèces commensales de la flore orale, notre objectif n'est pas de montrer leur absence ou leur présence mais surtout leur quantité, ce qui a orienté notre choix vers une analyse par PCR quantitative.

### 2. Matériel et méthodes

#### a. Préparation et formation des investigateurs

Ce protocole se base sur une journée d'initiation au laboratoire MICORALIS, Université Côte d'Azur (Dr. A. DOGLIO) réalisée dans le cadre de mon Master 1 Sciences de la Vie.

De plus, plusieurs réunions ont eu lieu afin de détailler/préciser le protocole et d'établir un budget (disponible en annexe 3) entre notre équipe (Pr. Carole CHARAVET, Dr. Sophie Lopez, Léa Graveline) et le laboratoire : Dr Alain DOGLIO (directeur), Dr Marlène CHEVALIER (directrice adjointe) et Morgane ORTIS (doctorante).

#### b. Etude pilote

Une étude pilote sera préalablement réalisée avant la conduite de l'étude principale afin de tester l'ensemble du protocole sur un nombre d'échantillons réduits.

Il conviendra de vérifier plusieurs facteurs, notamment :

- ▶ La spécificité des amorces utilisées pour les séquences de nucléotides ciblées ;
- ▶ L'efficacité de la procédure d'extraction de l'ADN.

c. Enregistrement de l'étude et autorisations

L'étude clinique a été enregistrée auprès de la DRCI le 16 février 2022 sous la référence EI-003 en tant qu'étude interne au CHU de Nice. L'étude est considérée comme une recherche du domaine de la santé n'impliquant pas la personne humaine, étant donné que le prélèvement est réalisé hors de la cavité buccale, dans le cadre d'un traitement orthodontique déjà suivi par le patient, et ne perturbe en aucun cas le suivi bucco-dentaire et orthodontique.

d. Conception de l'étude

Cette étude est une étude transversale non interventionnelle, avec un seul centre investigateur. Le responsable de l'étude est le Pr CHARAVET, les investigateurs principaux sont le Pr. CHARAVET, le Dr. Sophie LOPEZ et Léa GRAVELINE. Elle se déroulera dans l'unité clinique d'orthopédie dento-faciale du Pôle Odontologie du CHU de Nice (Pr. CHARAVET) ainsi qu'au laboratoire MICORALIS, Faculté de Chirurgie Dentaire, Université Côte d'Azur (Dr. A. DOGLIO).

e. Participants et critères d'éligibilité

Les patients inclus dans l'étude sont des patients en traitement dans l'unité clinique d'orthopédie dento-faciale (Pr CHARAVET). 15 patients porteurs d'appareils amovibles orthopédiques et 15 patients porteurs d'aligneurs orthodontiques seront inclus, avec un protocole d'analyses laboratoire similaire. Dans le cadre de cette thèse, notons que seule la partie « appareil amovible orthopédique » a été détaillée.

Les critères d'inclusion sont :

- × Âge : 8 à 12 ans ;
- × Patient(e)s porteurs d'un appareil orthopédique amovible comportant une base en résine PMMA ;

Les critères d'exclusion sont :

- × Patient porteur d'une maladie systémique ;
- × Prise d'un traitement antibiotique dans les 3 mois précédant le traitement orthodontique ;
- × Utilisation de bain de bouche antiseptique ;
- × Absence de lésions carieuses actives ou de maladie parodontale ;
- × Régime alimentaire spécifique.

*f. Temps clés*

Un formulaire de **consentement** éclairé a été rédigé pour les patients ou leur responsable légal, et est disponible en **annexe 1**.

Les patients ou leur responsable légal sont informés que l'étude se déroulera en deux visites, l'une consistant en la vérification de l'éligibilité du patient, un questionnaire médical, et la signature du consentement éclairé après information. La seconde visite consistera en une visite de contrôle de suivi de traitement orthodontique classique, **à 3 mois** de port de l'appareil, associée à un prélèvement par écouvillonnage sur l'appareil du patient, avant tout procédé de nettoyage de l'appareil

*Tableau 8 : Tableau synoptique des visites nécessaires à l'étude clinique*

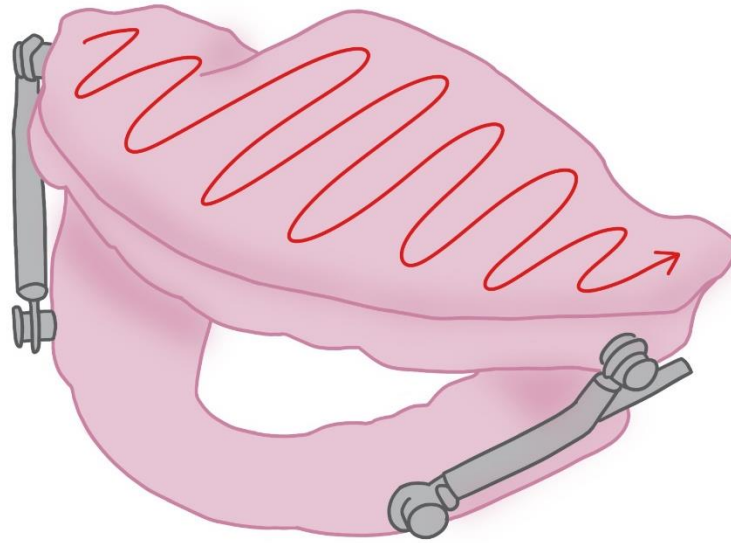
	V <sub>0</sub>	V <sub>1</sub>
Examen médical	X	
Vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion	X	
Signature du consentement éclairé	X	
Prélèvements		X
Questionnaire		X

*g. Prélèvement de l'échantillon*

Le prélèvement se fera par écouvillonnage de l'appareil orthodontique hors de la cavité buccale et avant tout procédé de nettoyage de l'appareil. Il sera réalisé lors de la seconde visite qui sera programmée pour avoir lieu après **3 mois** de port de l'appareil.

L'écouvillon sera frotté sur l'**intradors** et l'**extrados** de l'appareil, en suivant un mouvement décrit dans la figure ci-dessous pour prélever la majorité de la surface de l'appareil,

uniquement sur les parties en résine PMMA si l'appareil est composite. Il conviendra d'insister sur les zones difficiles à nettoyer telles que les puits cuspidiens.



*Fig. 21 : Schéma du mouvement de prélèvement sur l'appareil à l'aide de l'écouvillon (Document personnel)*

Les prélèvements seront conservés au laboratoire MICORALIS, à une température de  $-20^{\circ}\text{C}$ , au sein du bâtiment de la faculté d'odontologie de Nice.

#### *h. Procédure d'analyse*

##### *i. Extraction de l'ADN*

L'extraction de l'ADN sera réalisée sous hotte au laboratoire MICORALIS à l'aide des kits QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN).

Ce protocole permet la purification de la totalité de l'ADN (génomique, mitochondrial et viral) d'écouvillons buccaux à l'aide d'une micro-centrifugeuse.

Les étapes pré-requises avant de commencer le protocole sont :

- × Préparation d'un bain d'eau à  $56^{\circ}\text{C}$  pour l'étape 4
- × Equilibration du buffer AE à température ambiante ( $15-25^{\circ}\text{C}$ )
- × Si un précipité s'est formé dans le buffer AL, dissolution par incubation à  $56^{\circ}\text{C}$

Les étapes suivantes vont permettre la lyse des cellules (à l'aide de la protéinase K) puis la fixation de l'ADN à l'aide de tampons, d'éthanol et d'une micro-colonne avec matrice de silice permettant de fixer l'ADN.

- 1.** Placer l'écouvillon dans un tube de micro-centrifugeuse de 2mL (l'extrémité de l'écouvillon aura préalablement été coupée aux ciseaux).
- 2.** Ajouter 1mL de PBS à l'échantillon.
- 3.** Soniquer pendant 10 minutes
- 4.** Vortexer pendant 1 minute
- 5.** Retirer l'écouvillon avec une pince stérile et le jeter
- 6.** Ajouter 20 µL de protéinase K et 200µL de buffer AL à l'échantillon.
- 7.** Mélanger par vortex pendant 15 secondes. Incuber à 56°C pendant 10 minutes. Centrifuger brièvement pour retirer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- 8.** Ajouter 200 µL d'éthanol (96-100%) à l'échantillon.
- 9.** Mélanger encore par vortex pendant 15 secondes. Centrifuger brièvement pour retirer les gouttes de l'intérieur du couvercle.
- 10.** Appliquer avec précaution 700µL de la mixture de l'étape 9 à la colonne QIAmp Mini spin placée dans un tube de collecte de 2mL sans mouiller le rebord.
- 11.** Fermer le couvercle et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute.
- 12.** Placer la colonne QIAmp Mini spin dans un tube de collecte de 2mL propre, et se débarrasser du tube contenant le filtrat.
- 13.** Répéter l'étape 10 en ajoutant 700µL de la mixture de l'étape 6 dans la colonne QIAmp Mini spin.
- 14.** Fermer le couvercle et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute.
- 15.** Placer la colonne QIAmp Mini spin dans un tube de collecte de 2mL propre, et se débarrasser du tube contenant le filtrat.

Les étapes suivantes permettent de réaliser l'élution de l'ADN afin d'obtenir le matériel génétique le plus pur possible.

16. Ouvrir délicatement la colonne QIAmp Mini spin et ajouter 500µL de buffer AW1 sans mouiller le rebord.
17. Fermer le couvercle et centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute.
18. Placer la colonne QIAmp Mini spin dans un tube de collecte de 2mL propre, et se débarrasser du tube contenant le filtrat.
19. Ouvrir délicatement la colonne QIAmp Mini spin et ajouter 500µL de buffer AW2 sans mouiller le rebord.
20. Fermer le couvercle et centrifuger à vitesse maximale (20000 x g ; 14000rpm) pendant 3 min.
21. Placer la colonne QIAmp Mini spin dans un tube de collecte de 2mL propre, et se débarrasser du tube contenant le filtrat. Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute.
22. Placer la colonne QIAmp Mini spin dans un tube neuf de micro-centrifugeuse de 1,5 mL, et se débarrasser du tube contenant le filtrat.
23. Ouvrir délicatement la colonne QIAmp Mini spin et ajouter 50 µL de buffer AE.
24. Incuber à température ambiante pendant 5 minute, puis centrifuger à 6000 x g (8000 rpm) pendant 1 minute.

Une élution avec 100µL de tampon augmente la concentration finale d'ADN dans l'éluant, mais peut légèrement réduire le rendement global d'ADN. L'élution avec un volume inférieur à 50µL n'est pas recommandée, faisant dramatiquement diminuer le rendement global d'ADN.

Il est possible d'éluer une seconde fois avec les mêmes 50µL d'éluant contenant l'ADN, mais ce n'est pas recommandé dans les cas de prélèvements destinés à une analyse par PCR.

Un écouvillon buccal produit typiquement 0,5 à 3,5 µg d'ADN dans 150µL de tampon (3-23 ng/µL) avec un ratio  $A_{260}/A_{280}$  allant de 1,7 à 1,9 (mesuré dans l'eau).

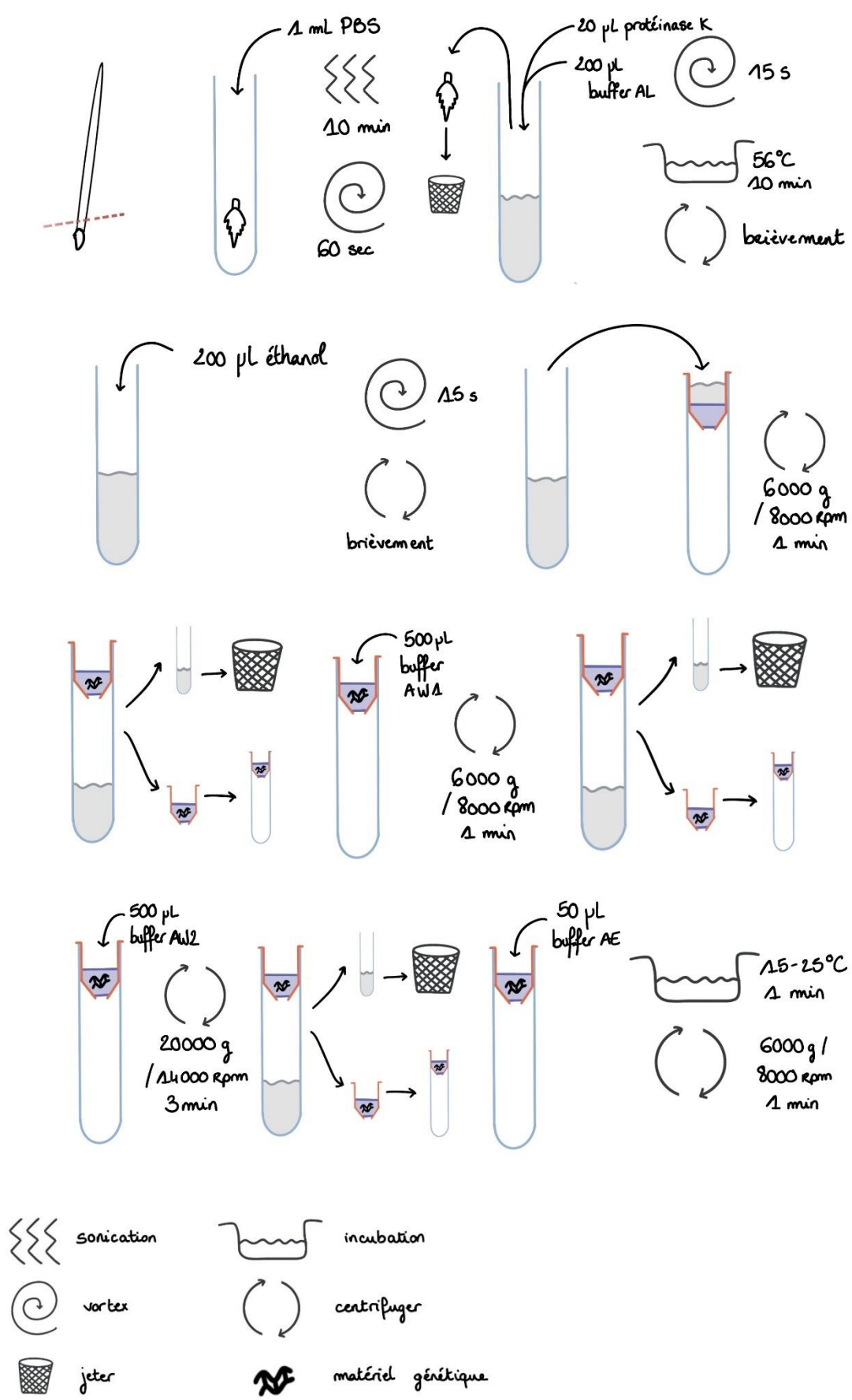


Fig. 22 : Protocole d'extraction de l'ADN au laboratoire MICORALIS (Document personnel)

## ii. Quantification des acides nucléiques

La **quantification** des acides nucléiques permet de déterminer la **pureté** de l'ADN après son extraction, et d'éliminer des échantillons possiblement contaminés. Ici, les acides nucléiques seront quantifiés avec une méthode par **spectrophotométrie**, avec un spectrophotomètre à micro-volume.

La spectrophotométrie d'absorption dans l'UV est une méthode très courante en laboratoire. Elle est extrêmement simple à pratiquer car aucune manipulation supplémentaire de l'échantillon d'ADN extrait n'est nécessaire. Elle n'est **pas spécifique** car elle mesure tous les acides nucléiques présents sans distinction, et présente une **grande sensibilité** aux contaminations. (71)

La spectrophotométrie se base sur la mesure de **l'absorbance** (A), qui est aussi appelée Densité Optique, et qui est la mesure quantitative d'absorption d'une radiation UV-visible à une longueur d'onde donnée par un composé ou un échantillon. Elle est déterminée par l'équation suivante :

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

$I_0$  = intensité de la lumière incidente

$I$  = intensité transmise après le passage à travers la cuve contenant la solution ou l'échantillon

Lambert, Beer et Bouguer ont, après étude des relations existant entre  $I$  et  $I_0$ , déterminé que l'intensité d'une lumière monochromatique décroît de façon exponentielle, arrivant à l'équation suivante :

$$I = I_0 e^{-klc}$$

$l$  = largeur de la cuve en cm (ou longueur du trajet optique)

$c$  = concentration des substances absorbantes

$k$  = constante caractéristique de la substance étudiée

En introduisant  $\epsilon$ , le coefficient d'extinction molaire, exprimé en  $L.mol.cm^{-1}$ , on obtient la loi de Beer-Lambert, exprimée ainsi :

$$A = \epsilon.l.c$$

Les bases **purines** (adénine et guanine) et **pyrimidiques** (thymine et cytosine) composant l'ADN présentent un pic d'absorbance à **260nm**. En mesurant l'absorbance d'une solution d'acide nucléique pure à 260nm, on obtient sa concentration en se basant sur l'équation de Beer-Lambert. En pratique, on utilise une équation modifiée comme suit :

$$cm = (A.e)/l$$

cm = concentration massique d'acide nucléique en ng/ $\mu$ L  
 A = absorbance à 260 nm  
 e = coefficient d'extinction massique ou constant en ng.cm/ $\mu$ L  
 l = trajet optique en cm

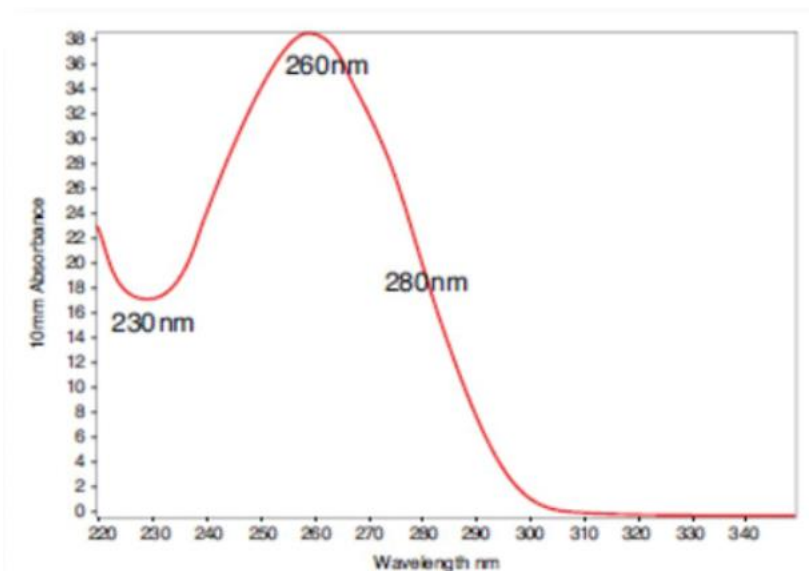
Le coefficient d'extinction e va dépendre de la séquence d'ADN, et est **spécifique** à chaque ADN ou ARN.

*Tableau 9 : Coefficients d'extinction des bases*

Nucléotide	$\lambda_{max}$ (nm) à pH 7,0	$\epsilon_{260nm}$ ( $M^{-1}.cm^{-1}$ )
5' dAMP	259	15 200
5' dCMP	271	7 050
5' dGMP	252	12 010
5' dTMP	267	8 400
5' dUMP	262	10 000

Il n'est malgré tout pas nécessaire de calculer le coefficient d'extinction spécifique à chaque séquence d'ADN/ARN, la communauté scientifique ayant adopté un consensus sur des coefficients d'extinction estimatifs :

- × ADN double brin  $\approx$  50 ng.cm/ $\mu$ L
- × ADN simple brin  $\approx$  33 ng.cm/ $\mu$ L
- × ARN  $\approx$  40 ng.cm/ $\mu$ L



*Fig. 23 : Spectre d'absorption caractéristique de l'ADN pur*

La pureté de l'échantillon va ensuite être déterminée à l'aide de différents paramètres. Le **ratio  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$**  a été mis en avant par Warburg et Christian en 1942 (72), pour détecter la contamination d'acides nucléiques dans une solution de protéine. Maintenant, il est plus couramment utilisé pour l'inverse : détecter une **contamination protéique** dans une solution d'acides nucléiques. On considère de manière générale que la pureté de la solution est acceptable lorsque ce ratio est compris entre **1,8** et **2,0** pour l'ADN. Il est important de noter que le ratio varie significativement en fonction du pH et de la force ionique de la solution (73).

Un autre paramètre est le **ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$** , généralement plus élevé que le ratio précédent. Il permet de détecter la présence de contaminants tels que le **phénol**, l'isothiocyanate de guanine, les carbohydrates, l'urée, ou encore les polysaccharides. Il est la plupart du temps compris entre 2,0 et 2,2.

En résumé, un ratio  $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$  inférieur à **1,7** indiquera une contamination protéique, et un ratio  $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$  inférieur à **2,0** indiquera une contamination possiblement phénolique ou d'un autre contaminant absorbant à 230nm.

La quantification est faite au laboratoire MICORALIS à l'aide du spectrophotomètre à micro-volume SimpliNano™ du fabricant Biochrom®.



*Fig. 24. : Spectrophotomètre à micro-volume SimpliNano™ de Biochrom®*

Le protocole est le suivant (74) :

1. Sélectionner le mode DNA dans les paramètres
2. Si le facteur de dilution est connu : entrer le facteur de dilution OU s'il n'est pas connu : se rendre sur l'écran Dilution Factor, entrer le volume de l'échantillon puis le volume du diluant, et appuyer sur OK pour calculer le facteur de dilution.
3. Activer ou désactiver les corrections à 320nm (activées par défaut)
4. Sélectionner les unités de mesure :  $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{ng}/\mu\text{L}$  ou  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .
5. Entrer le facteur de dilution. La valeur par défaut est à 50, et peut aller de 0.01 à 9999.
6. Appuyer sur OK pour se rendre sur l'écran des résultats et commencer les mesures
7. Pipeter l'échantillon de référence dans le réceptacle à échantillon.
8. Appuyer sur le bouton 0A/100%T. Cette référence sera utilisée pour tous les échantillons suivant jusqu'à ce qu'elle soit changée.
9. Nettoyer le réceptacle à échantillon.
10. Pipeter l'échantillon dans le réceptacle et lancer la mesure.
11. Imprimer le résultat et conserver le ticket.



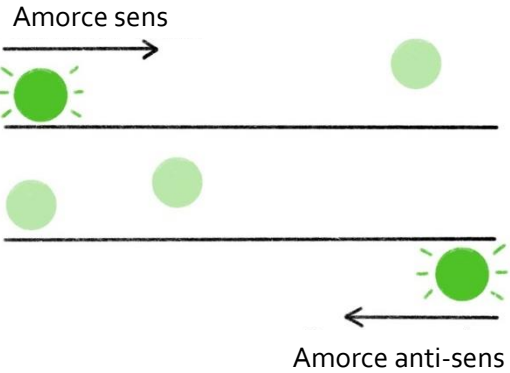
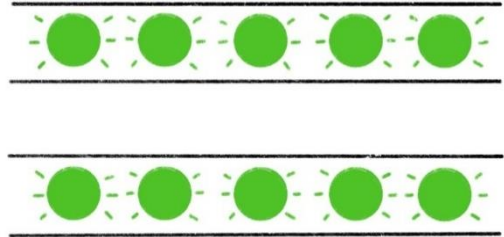
### *iii. Analyse par qPCR*

Les étapes qui suivent doivent être réalisées sous une **hotte à irradiation UV** pour éviter toute contamination des micro-puits des plaques de PCR.

Comme expliqué précédemment, la PCR quantitative détecte la quantité de séquence ADN amplifiée grâce à la fluorescence émise par celle-ci. Plusieurs méthodes pour établir cette fluorescence existent, mais nous utiliserons ici un **agent intercalant**.

Les agents intercalants se fixent directement à l'**ADN double brin**. Il en existe plusieurs, tels que le bromure d'éthidium (75), le YO-PRO-1 (76) ou bien le SYBR® Green 1 (77). Ces agents ne sont que peu ou pas fluorescent lorsqu'ils sont libres, mais lors de leur liaison avec l'ADN bicaténaire, ils augmentent en fluorescence. Dans ce protocole, nous utiliserons le **SYBR® Green**, qui est à l'heure actuelle l'agent fluorescent le plus utilisé en laboratoire pour la PCR.

*Tableau 10 : Détails de la chimie SYBR Green® lors d'un cycle de PCR (Document personnel)*

<p><b>Début du cycle :</b> le SYBR Green® est lié à l'ADN bicaténaire et émet une fluorescence</p>	
<p><b>Dénaturation :</b> l'ADN est dénaturé en ADN simple brin, le SYBR Green® émet une fluorescence très limitée</p>	
<p><b>Polymérisation :</b> lorsque l'ADN commence à être polymérisé via les amorces, les molécules de SYBR Green® se lie au nouvel ADN double brin et émettent une fluorescence</p>	
<p><b>Fin du cycle :</b> la polymérisation est achevée et les molécules de SYBR Green® émettent une fluorescence optimale</p>	

C'est une technologie simple, économique et **sensible** (car plusieurs colorants peuvent se lier à une seule molécule amplifiée), mais qui **manque de spécificité**. En effet, les molécules de SYBR Green® se fixent sur tout type d'ADN bicaténaire, y compris les dimères d'amorces et les produits de PCR non spécifiques.

Le SYBR Green® présente l'avantage, par rapport au bromure d'éthidium, de **ne pas être mutagène** pour l'homme. Il est donc plus sûr pour les expérimentations, et ne produit pas de déchets difficiles (78). Il n'en reste pas moins un possible carcinogène, du fait de sa capacité à se fixer à l'ADN bicaténaire, et doit être manipulé avec précaution.

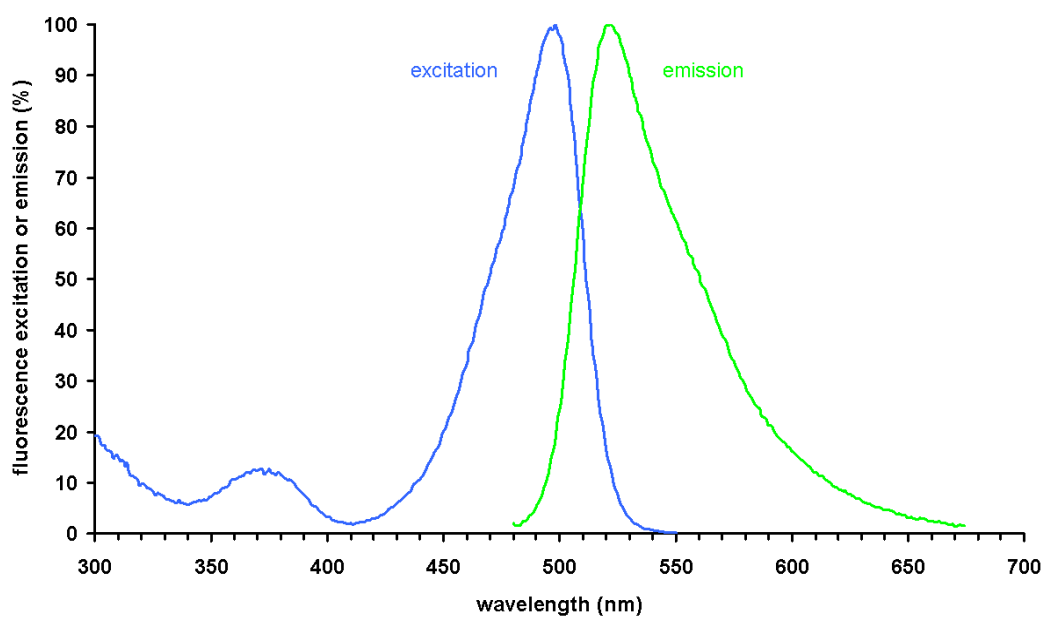


Fig. 25.: Spectre d'excitation et d'émission de la molécule de SYBR Green®

Le SYBR Green® présente un pic d'absorption de la lumière bleue à **497 nm**, et un pic d'émission de la lumière verte à **520 nm**.

Afin de détecter et de quantifier les trois bactéries sélectionnées (*Streptococcus mutans*, *Treponema denticola* et *Actinomyces naeslundii*), des **gènes spécifiques** à chaque bactérie ont été choisis pour cible.

Pour SM, le **gène sodA** a été choisi. Celui-ci code pour une enzyme, la **superoxyde dismutase**, composée de 206 acides aminés, et présente dans le cytoplasme de la bactérie afin d'éliminer les anions radicaux superoxyde (79).

Pour AN, le **gène *smpB***, codant pour une protéine de 160 acides aminés se liant à l'ARN et permettant le sauvetage de ribosomes dans le cytosol des bactéries, a été sélectionné (80).

Enfin, pour TD, nous avons choisi le **gène *troA***, codant pour une protéine de 308 acides aminés faisant partie d'un système de transport alimenté par l'ATP impliqué dans le transport transmembranaire de zinc (81).

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées dans le protocole

Espèce bactérienne	Séquence cible		Longueur (paire de bases)	Gène cible
<i>Streptococcus mutans</i>	Forward	GATGCTGAAACGATGACCCTT	21	<i>sodA</i>
	Reverse	CGTGATTAAGATGACCGCCACC	22	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	Forward	GCGCCCATATTCCTGAGTACCT	22	<i>smpB</i>
	Reverse	CCACCGATGAAGTACAGCTCCAG	23	
<i>Treponema denticola</i>	Forward	GCATGGTTGCCGACATAGC	19	<i>troA</i>
	Reverse	CCCGCACCCATAAGAGCTT	19	

Nous avons réalisé un plan de plaque 96 puits à l'aide du logiciel QuantStudio™ v1.5.2. Chaque mesure sera réalisée en triplicata, et deux contrôles seront réalisés en triplicata pour vérifier toute possible contamination et normaliser les résultats entre les échantillons.

Le premier contrôle sera un **contrôle négatif H<sub>2</sub>O**, et le second contrôle sera fait en ciblant un **gène endogène** codant pour la glyceraldéhyde-tri-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (82). La **GAPDH** est une enzyme clé de la glycolyse, catalysant la première étape de cette route métabolique en convertissant le D-glyceraldéhyde triphosphate en triphospho-glycéroylphosphate (83). Elle est présente dans toutes les cellules, et sa quantification permet une normalisation des valeurs retrouvées par analyse PCR dans les différents échantillons.

Suivant ces informations, chaque prélèvement effectué sur un appareil aura besoin de 15 puits sur la plaque pour être analysé. Un plan de plaque a donc été réalisé afin d'optimiser au maximum l'utilisation de la place sur les plaques à micropuits.



Fig. 26 : Plaque PCR 96 puits MicroAmp™ EnduraPlate™

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B	S	S	S	S	S	S	N	N	N	S	S	S
C	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D	S	S	S	N	N	N	S	S	S	S	S	S
E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
F	N	N	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N	N	N
H												

Fig. 27 : Plan de la plaque réalisé à l'aide du logiciel QuantStudio™ Design and Analysis software 2.6.0

Sur la plaque ci-dessus, chaque couleur représente un échantillon différent, et les puits bleus marqués d'un N sont les puits de contrôle négatifs contenant de l'eau pure sans nucléase. Les 12 puits restants pourront être utilisés pour d'autres mesures correspondant à d'autres études afin de ne pas gâcher l'espace.

Les différentes cibles sont réparties comme suit :

- × Les puits **A1** à **B9** seront remplis d'un mélange contenant du SYBR Green® et l'amorce correspondant au gène de la **GADPH** ;

- × Les puits **B10 à D6** seront remplis d'un mélange contenant du SYBR Green® et les amorces pour le gène **troA**, marqueur de *Treponema denticola* ;
- × Les puits **D7 à F3** seront remplis d'un mélange contenant du SYBR Green® et les amorces pour le gène **smpB**, marqueur d'*Actinomyces naeslundii* ;
- × Les puits **F4 à G12** seront remplis d'un mélange contenant du SYBR Green® et les amorces pour le gène **sodA**, marqueur de *Streptococcus mutans*.

#### *i. Traitement des données*

En accord avec la réglementation par la loi informatique et libertés n°2004-801 du 6/08/2004, les patients seront anonymisés à l'aide d'une clé alphanumérique, comprenant les initiales du patient et un numéro d'identification.

Les **données** concernant les patients inclus seront conservées dans un document Microsoft Excel® protégé par un mot de passe, auquel seuls les investigateurs et les praticiens concernés pourront accéder.

Une analyse statistique sera effectuée.

### **3. Résultats**

L'objectif après l'obtention des résultats sera d'obtenir des **données standardisées** sur la quantité du gène cible présent dans chaque prélèvement. Deux possibilités s'offrent à nous :

- ▶ La standardisation des valeurs en se basant sur les données obtenues à l'aide du spectrophotomètre, en rapportant la quantité d'ADN totale à la quantité de séquence cible.
- ▶ L'établissement de **gammes d'étalonnage** pour les trois gènes ciblés, en réalisant des dilutions de l'ADN à des concentrations différentes pour s'en servir de référence.

La deuxième solution est plus précise mais nécessite du travail et du matériel supplémentaire, les gammes étalon étant à réaliser sur des plaques à micro-puits puis analysées par PCR quantitative.

## V. Conclusion

Ce travail de thèse est composé d'une revue systématique de la littérature puis d'une proposition de protocole expérimental. Il a fait partie conjointement d'un cursus de master 1 Sciences de la Vie, composé d'une partie théorique de recherche bibliographique et d'une partie de recherche expérimentale, comprenant notamment une journée d'initiation au laboratoire MICORALIS, Faculté de chirurgie dentaire, Université Côte d'Azur (Dr. A. Doglio).

Synthétiquement, cette revue systématique de la littérature a permis de conclure qu'il n'y avait pas de consensus au sujet des protocoles de désinfection des appareils orthodontiques amovibles. Elle a donné lieu à une publication dans la revue *Children* en octobre 2021 (16). Et, dans la même thématique mais sur les protocoles de désinfection et de nettoyage aligneurs orthodontiques, j'ai également pu participer à une deuxième publication (42)

La réalisation des deux revues systématiques a conduit à un questionnement sur la nécessité de réaliser de nouvelles études cliniques à ce sujet. En effet, les informations dans la littérature ne nous permettent pas d'établir de conclusion et sont de faible niveau de preuve, il nous a donc semblé important d'investiguer ce sujet de manière plus approfondie.

Le protocole de recherche clinique (enregistré à la DRCI sous la référence EI-003) établi dans cette thèse est basé sur une journée d'initiation, les staffs en équipe et les recherches dans la littérature. Il est constitué d'une étude pilote et d'une étude principale. Pour finir, cette étude clinique permettra ainsi d'identifier des organismes potentiellement pathogènes sur les appareils orthodontiques, et par conséquent de cibler plus précisément les bactéries problématiques dans les protocoles de désinfection, en utilisant par exemple des agents auxquels elles seraient particulièrement sensibles.

A l'issue de ce protocole et de l'étude qui en découlera, il serait intéressant de réaliser un essai clinique randomisé qui évaluerait différents protocoles de désinfection, en se basant sur les informations de la littérature et sur les résultats obtenus.

## Annexes

Annexe 1 : Formulaire d'autorisation de participation à l'étude clinique

« **Etude prospective du microbiote des appareils orthodontiques type amovible ou aligneurs** »

Promoteur de l'étude : CHU de Nice - Département de la Recherche Clinique - 4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice Cedex1 - Tel : 04 92 03 43 94 - Fax : 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur : **Pr Carole CHARAVET**

**AUTORISATION DE PARTICIPATION destinée aux adultes et titulaires de l'autorité parentale (responsables légaux)**

Les données de cette étude, incluant celles portant sur votre cas ou celui de votre enfant sont couvertes par le secret professionnel.

Je soussigné(e)-----

demeurant à (adresse complète) -----  
-----

Père       Mère       Titulaire de l'exercice de l'autorité parentale  
Et

Je soussigné(e)-----

demeurant à (adresse complète) -----  
-----

Père       Mère       Titulaire de l'exercice de l'autorité parentale

De l'enfant : -----

OU

Je soussigné(e)-----  
-----

demeurant à (adresse complète)-----  
-----

âgé(e) de-----

-----

Déclare avoir compris le but et les modalités de cette étude m'ayant été proposée ou proposée à mon enfant, qui m'ont été pleinement expliquées par le Pr/Dr.....

J'accepte de participer ou que mon enfant participe à l'étude « \_ » dont le promoteur est le CHU de Nice et l'investigateur coordonnateur est le Pr Carole CHARAVET. Il m'a bien été précisé que je pouvais refuser ou que mon enfant refuse de participer à cette étude et que dans le cas d'une participation à celle-ci, je pouvais revenir sur ma décision à tout moment. On m'a également expliqué que j'ai la possibilité de contacter l'un des investigateurs de l'étude, le Pr Carole CHARAVET, au Tel : **(n° de téléphone)** pour poser des questions à tout moment avant et en cours d'étude.

Cette étude ne modifie pas mon suivi médical ou celui de mon enfant, ni le traitement éventuel.

J'ai été informé(e) :

- que, pour cette étude, le promoteur a souscrit une assurance en responsabilité Civile auprès de la SHAM, sous le numéro de contrat 145.017.
- que, conformément à l'article L.1121-11 du Code de la Santé Publique un examen médical préalable ainsi que l'affiliation à un régime de Sécurité Sociale sont obligatoires.
- que certaines données nominatives me concernant ou concernant mon enfant feront l'objet d'un traitement informatisé dans le respect du secret médical.
- que les données de cette étude, incluant celles portant sur moi-même ou mon enfant, sont couvertes par le secret professionnel.
- de mon droit de m'opposer au traitement automatisé des données nominatives me concernant ou concernant mon enfant.
- que toutes les données resteront confidentielles.
- que, conformément à la loi du 09 août 2004, à la fin de l'étude je peux demander à l'investigateur une synthèse des résultats globaux de la recherche. Il m'a été garanti que toute information nouvelle survenant en cours d'essai me sera transmise.
- de mon droit d'accès et de rectification à ces données directement ou indirectement par l'intermédiaire d'un médecin de mon choix désigné à cet effet ; Je n'autorise leur consultation que par les personnes qui collaborent à la recherche, aux personnes chargées par le promoteur de contrôler la qualité de l'étude ainsi que par un représentant des autorités de santé.
- que cette étude a été déclarée à la Commission Nationale Informatique et Liberté.

**J'atteste que mon enfant ne s'oppose pas à participer à cette étude clinique.**

<input type="checkbox"/> Mère	<input type="checkbox"/> Père	<input type="checkbox"/> Tuteur légal
Nom:.....		
Prénom :.....		
Signature .....		Date : ..... / ..... /

<input type="checkbox"/> Mère	<input type="checkbox"/> Père	<input type="checkbox"/> Tuteur légal
Nom:.....		
Prénom :.....		
Signature .....		Date : ..... / ..... /

OU

**J'atteste ne pas m'opposer à participer à cette étude clinique.**

Nom:.....	
Prénom :.....	
Signature	Date : ... / ..... / ...

<b>LE MEDECIN INVESTIGATEUR</b> Nom du médecin (en majuscules) :.....	
<i>En signant ce formulaire, je confirme que j'ai expliqué l'étude avec exactitude au(x) signataire(s) susmentionnés</i>	
Signature	Date : ..... / ..... / ...

Fait en deux exemplaires dont un remis au sujet

« **Etude prospective du microbiote des appareils orthodontiques type amovible ou aligneurs** »

Promoteur de l'étude : CHU de Nice - Département de la Recherche Clinique - 4, avenue Reine Victoria - BP 1179 - 06003 Nice Cedex1 - Tel: 04 92 03 40 11 - Fax: 04 92 03 40 75

Investigateur coordonnateur: **Pr. CHARAVET Carole – Service ODF – CHU de Nice - Adresse**  
Tel: **(n° de téléphone)** - Fax: **(n° de télécopie)**

**NOTICE D'INFORMATION destinée aux adultes et titulaires de l'autorité parentale (responsables légaux)**

Madame, Monsieur,

Vous ou votre enfant êtes porteur d'un appareil orthodontique type amovible ou aligneurs, nécessaire à la correction de la malocclusion.

A ce titre, vous ou votre enfant êtes invités à participer à un projet de recherche biomédicale intitulé « Etude prospective du microbiote des appareils orthodontiques type amovible ou aligneurs ».

Avant d'accepter de participer à l'étude, il est important que vous preniez le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Le présent document vous renseigne sur les modalités de ce projet de recherche. S'il y a des mots que vous ne comprenez pas, n'hésitez pas à poser des questions.

Afin d'éclairer votre décision concernant la recherche pour laquelle nous souhaitons votre participation volontaire ou celle de votre enfant, vous devez avoir reçu et bien compris les informations suivantes:

**OBJECTIFS DE L'ETUDE :**

Le but de l'étude à laquelle nous proposons à vous ou à votre enfant de participer est de déterminer la composition de la flore microbienne située à la surface des appareils orthodontiques type amovible ou aligneurs au cours du temps.

**DEROULEMENT DE L'ETUDE :**

→ **Quels seront le déroulement et la méthodologie de cette étude ?**

Cette étude se déroulera seulement au CHU de Nice.

Après signature de l'autorisation de participation, le médecin procédera à un examen médical ainsi qu'à la vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion.

Les résultats de cet examen clinique préalable vous seront communiqués directement ou par l'intermédiaire du médecin de votre choix.

La prise en charge consistera en un échantillon prélevé à la surface de l'appareil porté par le patient, à plusieurs intervalles dans le temps.

La visite aura lieu dans le service d'Orthopédie-dento-faciale au CHU de Nice, le médecin réalisera un prélèvement à la surface de l'appareil orthodontique amovible porté par le patient.

### Tableau synoptique

	V0 - Inclusion	V1
Examen médical	X	
Vérification des critères d'inclusion et de non inclusion	X	
Signature du consentement éclairé	X	
Prélèvements		X
Questionnaire		X

→ **Quelles seront les précautions particulières que vous ou votre enfant aurez à prendre, les impératifs à respecter ?**

Ramener l'appareil orthodontique à chaque rendez-vous de visite, afin que le prélèvement puisse avoir lieu.

Avoir une hygiène bucco-dentaire correcte, et une habitude d'entretien de l'appareil.

→ **Quel est le nombre de sujets participant à l'étude ?**

30 sujets traités par un appareil orthodontique type amovible ou aligneurs seront inclus dans cette étude.

→ **Quelle sera la durée de cette étude ?**

La durée prévisionnelle de l'étude est de 1 an. Avec une durée d'inclusion de 7 mois. Votre participation ou celle de votre enfant à l'étude durera 1 an.

### **RAPPORT BENEFICE/RISQUE DE L'ETUDE :**

→ **Quels sont les bénéfices attendus ?**

- *Bénéfices individuel :*

Prendre conscience de l'intérêt d'avoir de bonnes habitudes d'hygiène et d'entretien de l'appareil. Prendre en compte les caractéristiques du microbiote et ainsi son influence sur la santé parodontale dans le choix d'un appareil orthodontique.

- *Bénéfices collectif :*

Comparer l'évolution du microbiote dans le temps entre les appareils orthodontiques amovible et aligneurs, et ainsi leur risque par rapport à la santé parodontale.

→ **Quels sont les risques prévisibles?**

Aucun.

→ **Quelles sont les contraintes?**

- Venir à plusieurs rendez-vous, respecter les dates fixées
- Avoir une bonne hygiène orale

### **ALTERNATIVES MEDICALES ET ARRET PREMATURE :**

→ **Quelles sont les éventuelles alternatives médicales ?**

Si vous ne désirez pas que vous ou votre enfant participiez à cette étude, ou si vous ou votre enfant sortez de l'étude avant sa fin, il lui/vous sera possible de bénéficier dans le service d'Orthopédie-dento-faciale du CHU de Nice du traitement habituel de la malocclusion.

→ **Quelles seront les modalités de prise en charge pour vous ou votre enfant à la fin de cette recherche, en cas d'arrêt prématuré de la recherche ou en cas d'exclusion ?**

La participation à l'étude pourra être prématurément arrêtée avant la visite finale en cas de survenue d'un événement indésirable grave, par décision du promoteur, de l'autorité compétente (ANSM) ou du médecin investigateur qui peut aussi décider de faire sortir votre enfant de l'étude. Dans l'une ou l'autre de ces hypothèses, vous ou votre enfant serez médicalement pris en charge.

A la fin de l'étude, il reprendra le cours habituel de sa prise en charge.

### **MODALITES ADMINISTRATIVES:**

→ **Assurance**

Conformément aux dispositions des articles L.1121-10 et R.1121-10 du CSP, le CHU de Nice assume des conséquences dommageables de la recherche pour la personne qui s'y prête et ses ayants droit. A cet effet, le CHU de Nice a souscrit auprès de la Société Hospitalière d'Assurance Maladie un contrat d'assurance (sous le n°145.017) garantissant sa responsabilité civile ainsi que celle de tout intervenant à la recherche.

### **RESULTATS DE L'ETUDE:**

→ **Serez vous informé des résultats globaux et donc des connaissances acquises grâce à cette recherche ?**

A l'issue de cette recherche, les résultats globaux de l'étude après leur analyse, vous seront communiqués par courrier si vous le souhaitez. Vos résultats personnels ou ceux de votre enfant vous seront transmis immédiatement.

Vous devrez faire savoir votre souhait et celui de votre enfant (si celui-ci participe à l'étude) à votre médecin.

### **CONSERVATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES :**

→ **Les échantillons biologiques collectés au cours de la recherche seront-ils conservés ?**

Dans le cadre de cette étude, les échantillons biologiques seront conservés dans le laboratoire du MICORALIS à -20 °C, sous la responsabilité du Dr Alain DOGLIO. Après l'étude, ces échantillons seront détruits.

### **PARTICIPATION :**

→ **Vous ou votre enfant pourrez-vous participer simultanément à une autre recherche ?**

Oui.

→ **A la fin de cette étude vous ou votre enfant pourrez-vous immédiatement participer à une autre recherche ?**

Oui.

→ **Vous décidez de participer à l'étude ou que votre enfant y participe, que devez-vous faire concrètement ?**

Si vous acceptez de participer à cette étude ou que votre enfant y participe, vous devez obligatoirement lire, dater et signer l'autorisation de participation accompagnant cette notice d'information.

Vous avez le droit de refuser de participer à l'étude ou que votre enfant y participe, ou de retirer votre consentement à tout moment, sans que votre décision influence en quoi que ce soit la qualité des soins que vous ou votre enfant recevez, et sans encourir aucune responsabilité, ni aucun préjudice de ce fait ; vous devrez alors en informer le Pr. CHARAVET Carole (les coordonnées sont disponibles à la fin de la présente).

### **PRISE EN CHARGE DES FRAIS DE DEPLACEMENTS :**

Votre participation ou celle de votre enfant à cette recherche biomédicale n'engendrera pour vous aucun frais supplémentaire par rapport à ceux que vous auriez dans le suivi habituel de sa maladie. Tous frais liés à cette recherche sont pris en charge par le CHU de Nice. Toutefois, pour pouvoir participer à cette recherche, vous ou votre enfant devez être affilié(e) ou bénéficier d'un régime de sécurité sociale.

La participation à cette étude ne donne lieu par ailleurs à aucune indemnisation financière.

### **CONFIDENTIALITE DES DONNEES :**

Dans le cadre de la recherche médicale à laquelle le Pr. CHARAVET Carole propose que votre enfant ou vous-même participiez, un traitement de vos données personnelles ou celles de votre enfant va être mis en œuvre pour permettre d'analyser les résultats de la recherche au regard de l'objectif de cette dernière.

A cette fin, les données médicales vous concernant ou concernant votre enfant et les données relatives à vos/ses habitudes et votre/sa qualité de vie, seront transmises au promoteur de la recherche ou aux personnes agissant pour son compte, en France. Ces données seront identifiées par un numéro de code et la première lettre de son nom ainsi que la première lettre de son prénom.

Ces données pourront également, dans des conditions assurant leur confidentialité, être transmises aux autorités de santé françaises ou étrangères, à d'autres entités du CHU de NICE. Toutes les informations vous concernant qui seront recueillies à l'occasion de cette étude seront strictement confidentielles et protégées par le secret professionnel ainsi que par la loi informatique et libertés n°2004-801 du 6/08/2004 et le décret d'application numéro 2005-1309 paru le 20/10/2005.

Vous aurez le droit de vous opposer au traitement automatisé des données vous concernant ou concernant votre enfant.

Les données de l'étude pourront être publiées dans des journaux médicaux et scientifiques sans que son identité soit révélée. Le promoteur est responsable du traitement des données de l'étude.

Le traitement de ces données/cette recherche/étude est conforme à la loi Informatique et Libertés n° 78-17 du 6 janvier 1978 modifiée et ainsi qu'au règlement (UE) 2016/679 du Parlement européen et du Conseil du 27 avril 2016 applicable à compter du 25 mai 2018 (règlement général sur la protection des données).

Pour en savoir plus sur les traitements mis en œuvre par le CHU de Nice et les modalités d'exercice de vos droits, vous pouvez consulter le site internet du CHU de Nice **Error! Hyperlink reference not valid.** Vous pouvez aussi vous adresser au Délégué à la Protection des Données (DPO) du CHU de NICE **Error! Hyperlink reference not valid.** qui pourra répondre à toutes vos questions concernant la protection des données personnelles.

[1] <https://www.chu-nice.fr/politique-de-confidentialite>

[1] Mail à [dpo@chu-nice.fr](mailto:dpo@chu-nice.fr) ou Courrier à A l'attention du Délégué à la Protection des données (DPO), Hôpital de Cimiez, 4 ave de la Reine Victoria – CS 91179 – 06003 Nice Cedex 1.

**Annexe 3 : Budget prévisionnel du matériel nécessaire à l'étude**

<b>Matériel</b>	<b>Quantité</b>	<b>Prix unitaire</b>	<b>Prix total</b>
Kit d'extraction bactéries QIAamp DNA Mini Kit®	3	255 euros	765 euros
Master Mix PCR Power SYBR™ Green	2	482 euros	964 euros
Nucléase free water	1	70 euros	70 euros
Ecouvillons + tubes + milieu de transport	-	150 euros	150 euros
Pointes de pipettes ART™ à faible rétention avec barrière	-	138 euros	138 euros
Film adhésif optique MicroAmp™	-	113 euros	113 euros
Plaques de réaction transparentes à 96 puits MicroAmp™ EnduraPlate™ Optical avec code barre	-	218 euros	218 euros
			<b>2418 euros</b>

## Bibliographie

1. Alfuriji S, Alhazmi N, Alhamlan N, Al-Ehaideb A, Alruwaithi M, Alkatheeri N, et al. The Effect of Orthodontic Therapy on Periodontal Health: A Review of the Literature. *Int J Dent*. 2014 May 29;2014:e585048.
2. Okada EMP, Ribeiro LNS, Stuani MBS, Borsatto MC, Fidalgo TK da S, Paula-Silva FWG de, et al. Effects of chlorhexidine varnish on caries during orthodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res [Internet]*. 2016 Nov 28 [cited 2022 Jun 6];30. Available from: <http://www.scielo.br/jj/bor/a/HcFt3YL7n9X9QJyvJ6LTWsQ/?lang=en>
3. Arab S, Nouhzadeh Malekshah S, Abouei Mehrizi E, Ebrahimi Khanghah A, Naseh R, Imani MM. Effect of Fixed Orthodontic Treatment on Salivary Flow, pH and Microbial Count. *J Dent Tehran Iran*. 2016 Jan;13(1):18–22.
4. Topaloglu-Ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of orthodontic appliances on oral microbiota-6 month follow-up. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;35(4):433–6.
5. Jordan C, LeBlanc DJ. Influences of orthodontic appliances on oral populations of mutans streptococci. *Oral Microbiol Immunol*. 2002 Apr;17(2):65–71.
6. Nammi K, Starke EM, Ou SS, Ward M, Jenkins W, Milleman JL, et al. The Effects of Use of a Powered and a Manual Home Oral Hygiene Regimen on Plaque and Gum Health in an Orthodontic Population. *J Clin Dent*. 2019 Mar;30(Spec No A):A1-8.
7. Deleuse M, Meiffren C, Bruwier A, Maes N, Le Gall M, Charavet C. Smartphone application-assisted oral hygiene of orthodontic patients: a multicentre randomized controlled trial in adolescents. *Eur J Orthod*. 2020 Dec 1;42(6):605–11.
8. Jurišić S, Verzak Ž, Jurišić G, Jurić H. Assessment of efficacy of two chlorhexidine mouthrinses on oral hygiene and gingival health in adolescents wearing two types of orthodontic brackets. *Int J Dent Hyg*. 2018;16(2):e52–7.
9. Al-Musallam TA, Evans CA, Drummond JL, Matasa C, Wu CD. Antimicrobial properties of an orthodontic adhesive combined with cetylpyridinium chloride. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2006 Feb 1;129(2):245–51.
10. Cao B, Wang Y, Li N, Liu B, Zhang Y. Preparation of an orthodontic bracket coated with an nitrogen-doped TiO<sub>2-x</sub>N<sub>y</sub> thin film and examination of its antimicrobial performance. *Dent Mater J*. 2013;32(2):311–6.
11. Charman KM, Fernandez P, Loewy Z, Middleton AM. Attachment of *Streptococcus oralis* on acrylic substrates of varying roughness. *Lett Appl Microbiol*. 2009 Apr;48(4):472–7.
12. Morgan T d., Wilson M. The effects of surface roughness and type of denture acrylic on biofilm formation by *Streptococcus oralis* in a constant depth film fermentor. *J Appl Microbiol*. 2001;91(1):47–53.
13. Radford DR, Sweet SP, Challacombe SJ, Walter JD. Adherence of *Candida albicans* to denture-base materials with different surface finishes. *J Dent*. 1998 Sep 1;26(7):577–83.

14. Eichenauer J, Serbesis C, Ruf S. Cleaning removable orthodontic appliances — a survey. *J Orofac Orthop Fortschritte Kieferorthopädie*. 2011 Oct 13;72(5):389.
15. Muscat Y, Farrugia C, Camilleri L, Arias-Moliz MT, Valdramidis V, Camilleri J. Investigation of Acrylic Resin Disinfection Using Chemicals and Ultrasound. *J Prosthodont*. 2018;27(5):461–8.
16. Charavet C, Graveline L, Gourdain Z, Lupi L. What Are the Cleaning and Disinfection Methods for Acrylic Orthodontic Removable Appliance? A Systematic Review. *Children*. 2021 Oct 26;8(11):967.
17. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021 Mar 29;372:n71.
18. Higgins JPT, Altman DG, Gøtzsche PC, Jüni P, Moher D, Oxman AD, et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ*. 2011 Oct 18;343:d5928.
19. Higgins JPT, Thomas J, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* version 6.3 (updated February 2022). Available from [www.training.cochrane.org/handbook](http://www.training.cochrane.org/handbook). 2022.
20. Sterne JA, Hernán MA, Reeves BC, Savović J, Berkman ND, Viswanathan M, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ*. 2016 Oct 12;355:i4919.
21. McGuinness LA, Higgins JPT. Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Res Synth Methods*. 2021 Jan;12(1):55–61.
22. Vento-Zahra E, De Wever B, Decelis S, Mallia K, Camilleri S. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial to test the efficacy of nitradine tablets in maxillary removable orthodontic appliance patients. *Quintessence Int Berl Ger* 1985. 2011 Jan;42(1):37–43.
23. Decelis S, Camilleri S, Zahra EV, Scerri E, De Wever B. The effect of NitrAdine on the Candida levels of maxillary removable appliances. *Quintessence Int Berl Ger* 1985. 2012 Mar;43(3):239–45.
24. Peixoto ITA, Enoki C, Ito IY, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. Evaluation of home disinfection protocols for acrylic baseplates of removable orthodontic appliances: A randomized clinical investigation. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod*. 2011 Jul;140(1):51–7.
25. Liu S ying, Tonggu L, Niu L na, Gong S qiang, Fan B, Wang L, et al. Antimicrobial activity of a quaternary ammonium methacryloxy silicate-containing acrylic resin: a randomised clinical trial. *Sci Rep*. 2016 Feb 23;6:21882.
26. Lima EMCX, Moura JS, Del Bel Cury AA, Garcia RCMR, Cury JA. Effect of enzymatic and NaOCl treatments on acrylic roughness and on biofilm accumulation. *J Oral Rehabil*. 2006 May;33(5):356–62.

27. Lessa FCR, Enoki C, Ito IY, Faria G, Matsumoto MAN, Nelson-Filho P. In-vivo evaluation of the bacterial contamination and disinfection of acrylic baseplates of removable orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod*. 2007 Jun;131(6):705.e11-17.
28. Fathi H, Fathi H, Martiny H, Jost-Brinkmann PG. Efficacy of cleaning tablets for removable orthodontic appliances: an in vivo pilot study. *J Orofac Orthop Fortschritte Kieferorthopadie OrganOfficial J Dtsch Ges Kieferorthopadie*. 2015 Mar;76(2):143–51.
29. Jagannathan J, Nagar P, Kaniappan AS, Raveendran A, Shekhar S. Comparison of Antimicrobial Efficacy of Natural Extracts as a Disinfectant for Removable Orthodontic Appliances: An Ex Vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2020 Dec;13(6):640–3.
30. Maruniak J, Clark WB, Walker CB, Magnusson I, Marks RG, Taylor M, et al. The effect of 3 mouthrinses on plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol*. 1992 Jan;19(1):19–23.
31. Catic T, Mehic M, Binakaj Z, Sahman B, Cordalija V, Kerla A, et al. Efficacy and Safety of Oral Spray Containing Lysozyme and Cetylpyridinium: Subjective Determination of Patients with Tonsillopharyngitis. *Mater Socio-Medica*. 2016 Dec;28(6):459–63.
32. Sundaram D, Narayanan RK, Vadakkepurayil K. A Comparative Evaluation on Antimicrobial Effect of Honey, Neem Leaf Extract and Sodium Hypochlorite as Intracanal Irrigant: An Ex-Vivo Study. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2016 Aug;10(8):ZC88–91.
33. Gong S qiang, Epasinghe J, Rueggeberg FA, Niu L na, Mettenberg D, Yiu CKY, et al. An ORMOSIL-Containing Orthodontic Acrylic Resin with Concomitant Improvements in Antimicrobial and Fracture Toughness Properties. *PLOS ONE*. 2012 août;7(8):e42355.
34. Gong S qiang, Epasinghe DJ, Zhou B, Niu L na, Kimmerling KA, Rueggeberg FA, et al. Effect of water-aging on the antimicrobial activities of an ORMOSIL-containing orthodontic acrylic resin. *Acta Biomater*. 2013 Jun 1;9(6):6964–73.
35. Kuroiwa A, Nomura Y, Ochiai T, Sudo T, Nomoto R, Hayakawa T, et al. Antibacterial, Hydrophilic Effect and Mechanical Properties of Orthodontic Resin Coated with UV-Responsive Photocatalyst. *Materials*. 2018 Jun;11(6):889.
36. Lee JH, Jo JK, Kim DA, Patel KD, Kim HW, Lee HH. Nano-graphene oxide incorporated into PMMA resin to prevent microbial adhesion. *Dent Mater*. 2018 Apr 1;34(4):e63–72.
37. Lee JH, El-Fiqi A, Jo JK, Kim DA, Kim SC, Jun SK, et al. Development of long-term antimicrobial poly(methyl methacrylate) by incorporating mesoporous silica nanocarriers. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. 2016 Dec;32(12):1564–74.
38. Sodagar A, Khalil S, Kassae MZ, Shahroudi AS, Pourakbari B, Bahador A. Antimicrobial properties of poly (methyl methacrylate) acrylic resins incorporated with silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on cariogenic bacteria. *J Orthod Sci*. 2016 Mar;5(1):7–13.
39. Mangal U, Kim JY, Seo JY, Kwon JS, Choi SH. Novel Poly(Methyl Methacrylate) Containing Nanodiamond to Improve the Mechanical Properties and Fungal Resistance. *Materials*. 2019 Jan;12(20):3438.

40. Ajami S, Habibagahi R, Khashei R, Soroorian M. Evaluation of flexural strength and antibacterial effect of orthodontic acrylic resins containing *Galla chinensis* extract. *Dent Press J Orthod*. 2021 Jan 20;25:43–8.
41. Tsolakis AI, Kakali L, Prevezanos P, Bitsanis I, Polyzois G. Use of Different Cleaning Methods for Removable Orthodontic Appliances: A Questionnaire Study. *Oral Health Prev Dent*. 2019;17(4):299–302.
42. Charavet C, Gourdain Z, Graveline L, Lupi L. Cleaning and Disinfection Protocols for Clear Orthodontic Aligners: A Systematic Review. *Healthcare*. 2022 Feb 10;10(2):340.
43. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010 Oct;192(19):5002–17.
44. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, Dewhirst FE. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000*. 2006;42:80–7.
45. Twetman S, García-Godoy F, Goepferd SJ. Infant oral health. *Dent Clin North Am*. 2000 Jul;44(3):487–505.
46. Marsh P, Martin M. *Marsh and Martin's oral microbiology*. 6th edition. Edinburgh ; New York: Elsevier; 2016. 261 p.
47. Wolf HF, Rateitschak KH, Rateitschak EM. *Parodontologie*. Paris: Masson; 2005.
48. Carranza FA, Newman MG, Glickman I, editors. *Clinical periodontology*. 8. ed. Philadelphia: Saunders; 1996. 782 p.
49. Mohanty R, Asopa SJ, Joseph MD, Singh B, Rajguru JP, Saidath K, et al. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *J Fam Med Prim Care*. 2019 Nov 15;8(11):3480–6.
50. Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M. *Microbiologie en odonto-stomatologie*. Paris: Maloine; 2006.
51. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol*. 2017;44(S18):S12–22.
52. Nicolas GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire*. *Can J Microbiol*. 2011 Jan;57(1):1–20.
53. Details - Public Health Image Library(PHIL) [Internet]. [cited 2022 May 7]. Available from: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=1045>
54. Ikeda T, Sandham HJ. Prevalence of *Streptococcus mutans* on various tooth surfaces in Negro children. *Arch Oral Biol*. 1971 Oct;16(10):1237–40.
55. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499–515.
56. Mitchell TJ. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol*. 2003 Dec;1(3):219–30.

57. Dige I, Raarup MK, Nyengaard JR, Kilian M, Nyvad B. Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation. *Microbiol Read Engl.* 2009 Jul;155(Pt 7):2116–26.
58. de Oliveira RVD, Bonafé FSS, Spolidorio DMP, Koga-Ito CY, Farias AL de, Kirker KR, et al. Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii Interaction in Dual-Species Biofilm. *Microorganisms.* 2020 Jan 31;8(2):E194.
59. Cortes CD, Urban C, Turett G. Actinomyces naeslundii: An Uncommon Cause of Endocarditis. *Case Rep Infect Dis.* 2015;2015:602462.
60. Sela MN. Role of Treponema denticola in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 2001;12(5):399–413.
61. Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola Exhibit Metabolic Symbioses. *PLOS Pathog.* 2014 Mar 6;10(3):e1003955.
62. Simonson LG, Goodman CH, Bial JJ, Morton HE. Quantitative relationship of Treponema denticola to severity of periodontal disease. *Infect Immun.* 1988 Apr;56(4):726–8.
63. Lucchese A, Bondemark L, Marcolina M, Manuelli M. Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. *J Oral Microbiol.* 2018 Jul 3;10(1):1476645.
64. Boileau MJ. Orthodontie de l'enfant et du jeune adulte. Tome 1 Principes et moyens thérapeutiques. [Internet]. London: Elsevier Health Sciences France; 2011 [cited 2022 May 14]. Available from: <http://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=1722860>
65. Weiger R, Netuschil L, von Ohle C, Schlagenhaut U, Brex M. Microbial generation time during the early phases of supragingival dental plaque formation. *Oral Microbiol Immunol.* 1995 Apr;10(2):93–7.
66. Lautrou A. Le mode d'action des activateurs dans le traitement des malocclusions de la Classe II : proposition d'une classification des activateurs. *Rev Orthopédie Dento-Faciale.* 1994 Mar 1;28(1):85–113.
67. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990 Apr;262(4):56–61, 64–5.
68. Garibyan L, Avashia N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *J Invest Dermatol.* 2013 Mar;133(3):e6.
69. Le Grand C, Brézulier D. Evaluation des méthodes d'analyse du biofilm sur différents dispositifs orthodontiques, une revue systématique de la littérature. France; 2017.
70. Vassias I. Principe de l'amplification en chaîne par polymérase. *EMC - Biol Médicale.* 2012 Mar;7(1):1–5.
71. Tagu D, Jaubert-Possamai S, Méreau A. Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3e éd. revue et augmentée. Versailles: Éditions Quae; 2018. (Savoir-faire).

72. Warburg, O. and W. Christian. Isolation and crystallization of enolase. *Biochem. Z.* 310:384-421. 1942.
73. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques.* 1997 Mar;22(3):474-6, 478-81.
74. Biochrom US. SimpliNano™ Product User Manual [Internet]. 2015. [https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support\\_page/support-simplinano/Simplinano-UM.pdf](https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/support-simplinano/Simplinano-UM.pdf).
75. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol Nat Publ Co.* 1992 Apr;10(4):413-7.
76. Ishiguro T, Saitoh J, Yawata H, Yamagishi H, Iwasaki S, Mitoma Y. Homogeneous Quantitative Assay of Hepatitis C Virus RNA by Polymerase Chain Reaction in the Presence of a Fluorescent Intercalater. *Anal Biochem.* 1995 Aug 1;229(2):207-13.
77. Tb M, Jj W, Ct W. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* [Internet]. 1998 Jun [cited 2022 Jun 6];24(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9631186/>
78. Singer VL, Lawlor TE, Yue S. Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat Res.* 1999 Feb 2;439(1):37-47.
79. Cattoir V, Lemenand O, Avril JL, Gaillot O. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. *Int J Med Microbiol IJMM.* 2006 Dec;296(8):531-40.
80. Karzai AW, Susskind MM, Sauer RT. SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). *EMBO J.* 1999 Jul 1;18(13):3793-9.
81. Saraithong P, Goetting-Minesky MP, Durbin PM, Olson SW, Gherardini FC, Fenno JC. Roles of TroA and TroR in Metalloregulated Growth and Gene Expression in *Treponema denticola*. *J Bacteriol.* 2020 Mar 11;202(7):e00770-19.
82. Chapman JR, Waldenström J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One.* 2015;10(11):e0141853.
83. Ercolani L, Florence B, Denaro M, Alexander M. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J Biol Chem.* 1988 Oct 25;263(30):15335-41.

## *Serment d'Hippocrate*

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

*Je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême, d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la probité dans l'exercice de La Médecine Dentaire.*

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

*Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui se 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.*

*Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès sa conception.*

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

*Respectueux et reconnaissant envers les Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.*

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

*Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.*



## Approbation – Improbation

Les opinions émises par les dissertations présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ou improbation de la Faculté de Chirurgie dentaire (1).

Lu et approuvé,

Vu,  
Nice, le

Le Président du jury,

Le Doyen de la Faculté de  
Chirurgie Dentaire de l'UNS

Professeur

Professeur Laurence LUPI

(1) Les exemplaires destinés à la bibliothèque doivent être obligatoirement signés par le Doyen et par le Président du Jury.

**ANALYSE DU BIOFILM MICROBIEN DES  
APPAREILS ORTHODONTIQUES AMOVIBLES :  
PROTOCOLE DE RECHERCHE  
EXPERIMENTALE**

**Thèse** : Chirurgie Dentaire, Nice, **2022**, n°42-57-22-20

**Directeur de thèse** : **Pr CHARAVET.**

**Mots-clés** : biofilm, appareil orthodontique amovible, PCR, *Streptococcus mutans*, *Treponema denticola*, *Actinomyces naeslundii*

**Résumé** :

L'hygiène lors des traitements orthodontiques est un problème d'actualité, et a grandement été étudié pour les appareils fixes type multi-attaches. Les appareils orthodontiques amovibles, portés principalement par des enfants, nécessitent également des procédures d'hygiène correctes afin d'éviter le développement de biofilm contenant des bactéries cariogènes ou parodontopathogènes.

Une revue de la littérature permet de conclure à l'absence de consensus sur l'efficacité d'une méthode de nettoyage par rapport à une autre, et au problème du faible niveau de preuve des études incluses. La nécessité de réaliser des essais cliniques randomisés sur le sujet a été mise en avant.

Un protocole expérimental afin d'étudier la présence de trois bactéries à la surface des appareils, *Streptococcus mutans*, *Treponema denticola* et *Actinomyces naeslundii*, est proposé dans ce travail de thèse. L'issue de cette étude clinique permettra de mieux cibler les agents antimicrobiens utilisés pour la désinfection, en choisissant les plus efficaces sur les bactéries présentes.