UNIVERSITE DE LILLE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

U1008 INSERM "ADVANCED DRUG DELIVERY SYSTEMS"

THESE DE DOCTORAT

Mention : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Chirurgie Orale - Parodontologie - Biologie orale

Présentée par

Kadiatou SY

POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE MEDICATIONS INTRACANALAIRES DANS LES LESIONS ENDO-PARODONTALES

Thèse dirigée par : **Pr Etienne DEVEAUX** et **Pr Kevimy AGOSSA**

Soutenue le 2 décembre 2022

Présidente du jury :	
Mme Kerstin GRITSCH	Professeure, Université Claude Bernard Lyon 1
Rapporteurs :	
Mme Hélène RANGE	Professeure, Université de Rennes
M. Alexis GAUDIN	Professeur, Université de Nantes
Examinateur :	
Mme Christel NEUT	Maitre de Conférences, Université de Lille
Membres invités :	
M. Assem SOUEIDAN	Professeur, Université de Nantes
M. Jean-Christophe MAURIN	Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1

REMERCIEMENTS

A madame la professeure **Hélène RANGE**, je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je vous remercie également pour votre bienveillance et votre soutien qui m'aident à prendre part au rayonnement de notre discipline.

A monsieur le professeur **Alexis GAUDIN**, merci d'avoir accepté de juger ce travail. Je te remercie pour tous les conseils que tu m'as donnés en lien avec ma thématique, qui me permettent d'y voir plus clair et de préparer la suite.

A madame la professeure **Kerstin GRITSCH**, je suis contente de te savoir parmi les membres de mon jury, particulièrement parce que tu as co-dirigé ma thèse d'exercice et aussi parce que tu m'as accueillie à bras ouverts au sein de l'équipe de parodontologie.

A madame le docteur **Christel NEUT**, merci d'avoir accepté de siéger dans mon jury et de m'avoir accueillie dans votre laboratoire pendant la première partie de ce travail. J'ai beaucoup appris au sein de votre équipe. Trouvez ici l'expression de mes considérations les plus respectueuses.

A monsieur le professeur **Assem SOUEIDAN**, je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans mon jury. Je vous remercie pour vos conseils qui m'aident à m'intégrer au sein de la discipline de parodontologie. Je vous prie de croire en mes remerciements les plus respectueux.

A monsieur le professeur **Jean-Christophe MAURIN**, merci d'avoir accepté si spontanément cette invitation à siéger dans mon jury. Tu étais présent à mon dernier CSI, je me réjouis donc de savoir que tu seras présent à l'aboutissement de ce travail.

A monsieur le professeur **Etienne DEVEAUX**, merci de m'avoir accepté au sein de l'équipe de Lille. Je te remercie pour ton aide, ton soutien et ta patience pendant toutes ces années. Je suis heureuse que nous ayons pu mener ce travail à terme.

A monsieur le professeur **Kevimy AGOSSA**, merci de m'avoir accompagnée et soutenue pendant tout ce temps. Tu es un modèle unique de travail et de rigueur. J'ai énormément appris à tes côtés. Merci pour ton investissement, tes idées et tous tes conseils. Je n'ai pas de mots pour exprimer ma gratitude.

Merci à monsieur le professeur Olivier Huck pour tous tes conseils avisés et ta bonne humeur.

Merci à monsieur le professeur Jean-Christophe Farges pour votre aide et vos précieux conseils durant tous mon cursus.

Merci à madame la professeure Brigitte Grosgogeat de m'avoir acceptée au sein de ton équipe et de nous soutenir dans cette dernière ligne droite.

Merci à monsieur et madame Siepmann de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire.
A mes collègues du laboratoire INSERM, Mickaël pour ta disponibilité, ton efficacité et ta capacité à résoudre même à distance mes problèmes de manips', Isabelle pour ta pédagogie, Séverine pour tes explications et ta disponibilité, Fanny ma co-thésarde accueillante et toujours souriante.
Merci à Nicolas pour l'accueil au sein de ton équipe.
Merci à Henry et Bernard de m'avoir initiée à la rhéologie.
Merci à Jérémy pour ton aide pour l'HPLC et Cherry pour tes explications en biologie cellulaire.

A mes collègues de la faculté de Lille qui m'ont accueillie durant mon passage dans le Nord, Ingrid sans qui mes années à Lille n'auraient pas été les mêmes, Marie c'est toujours un plaisir de te retrouver aux formations ou aux congrès, Lieven merci pour tes conseils et ton humour, Thibaut merci pour ces moments de détentes, Alessandra, Céline, Alexandre, Alain, Xavier, Jean François, Marion, Laurence, Pascal et à tous mes autres collègues que j'avais plaisir à voir au quotidien.

A monsieur Arnaud Brioude pour votre accueil au sein de votre laboratoire.
A mes collègues du LMI, en particulier à toi Charlène, mon binôme des manips cellulaires, merci pour ton aide, tes explications, ta disponibilité et d'arriver à lire dans mes pensées.
Merci à Nina et Hazem, toujours prêts à proposer votre aide.
Merci à Marie-Agnès et Doriane ma co-thésarde lyonnaise et future collègue pour de nombreuses années.
Merci à l'équipe MatéiIS d'avoir accepté notre présence pour une partie des manipulations.
Merci à Ilham et Jacques de m'avoir formée à l'ICP.
Merci à Valérie pour ton calme et ta bienveillance.
Merci à Guillemette pour ton soutien et tes belles pensées.

Merci à tous mes collègues de l'équipe de parodontologie (de Lille et de Lyon) ainsi qu'à l'ensemble de mes collègues de la faculté de Lyon que j'ai retrouvé avec grand plaisir et avec qui j'espère avancer encore pendant de nombreuses années.

A ma famille, merci d'avoir toujours été là pour moi

A mes amis, merci de m'avoir accompagné pendant toutes ces années

Listes des abréviations

Ag^+ : ion argent

AgNP : nanoparticules d'argent

C. albicans : *Candida albicans*

Ca^{2+} : ion(s) calcium

$Ca(OH)_2$: hydroxyde de calcium

CBCT : come beam computed tomography

CHX : chlorhexidine

CHT : chitosan

Cu^{2+} : ion(s) cuivre

E. faecalis : *Enterococcus faecalis*

EMD : protéines dérivées de la matrice amélaire

HPLC : chromatographie en phase liquide haute performance

IL : interleukine

LAD : ligament alvéolo-dentaire

LAP : lésion(s) péri-apicale(s)

LEP : lésion(s) endo-parodontale(s)

LIPOE : lésion(s) inflammatoire(s) péri-apicale(s) d'origine endodontique

LPS : lipopolysaccharide

MMP : métalloprotéases matricielles

MIC : médication(s) intracanalaire(s)

NP : nanoparticule(s)

NPM : nanoparticule(s) métallique(s)

NPMP : nanoparticule(s) métallique(s) à base de polymère(s) ou nanoparticule(s) métallique(s) polymériques

OH^- : ion(s) hydroxyle

PCD : polymère de cyclodextrine

PGE2 : prostaglandine E2

P. gingivalis : *Porphyromonas gingivalis*

PRP : plasma riche en plaquettes

PRF : plasma riche en fibrine

TNF-α : facteur de nécrose tumorale α

Zn^{2+} : ion(s) zinc

Table des matières

Remerciements i
Liste des abréviations iv
Table des matières vi

1. INTRODUCTION 1
   1.1. L'organe dentaire et ses structures de soutien 2
      1.1.1. Anatomie et embryogénèse de l'endodonte et du parodonte 2
      1.1.2. Voies de communications physiologiques entre l'endodonte et le parodonte 4

   1.2. Les lésions endo-parodontales 6
      1.2.1. Définition 6
      1.2.2. Prévalence 7

   1.3. Étiologies des lésions endo-parodontales 7
      1.3.1. Facteurs microbiens et mécanismes de destruction tissulaire dans les lésions endo-parodontales 8
      1.3.2. Facteurs contributifs 12

   1.4. Classifications et diagnostic des lésions endo-parodontales 16
      1.4.1. Classifications historiques 16
      1.4.2. Classification de Chicago 18
      1.4.3. Aspects cliniques et radiologiques 18

   1.5. Traitement et pronostic des lésions endo-parodontales 21
      1.5.1. Thérapeutiques endodontiques 21
      1.5.2. Thérapeutiques parodontales 22
      1.5.3. Effet des adjuvants dans le traitement des lésions endo-parodontales 24
      1.5.4. Séquences thérapeutiques et délais de cicatrisation 27
      1.5.5. Pronostic des lésions endo-parodontales 27

   1.6. Intérêt des médications intracanalaires (MIC) pour le traitement des lésions endo-parodontales 30
      1.6.1. L'hydroxyde de calcium 30
      1.6.2. Médications intracanalaires à base de chlorhexidine 31
      1.6.3. La combinaison hydroxyde de calcium – chlorhexidine 31
      1.6.4. Médications intracanalaires à base de sels métalliques 32
      1.6.5. Effet des médications intracanalaires sur la cicatrisation péri-apicale et parodontale 32

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE 34

3. MATERIEL ET METHODES 36
   3.1. Développement et caractérisation d'une médication intracanalaire à base d'hydroxyde de calcium combiné à un agent antiseptique 37
      3.1.1. Formulation de la médication 37
         3.1.1.1. Composition des médications 37
         3.1.1.2. Formulation des solutions de principes actifs 37
         3.1.1.3. Préparation des échantillons de médications intracanalaires 39
      3.1.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne 39
         3.1.2.1. Milieux et réactifs 39

3.1.2.2. Sélection et préparation des souches microbiennes 39
3.1.2.3. Susceptibilité antimicrobienne 40
3.1.2.4. Cinétique de bactéricidie (« kill-time ») en culture mono-espèce 41
3.1.2.5. Activité anti-biofilm 41
3.1.3. Évaluation des propriétés mécaniques 43
3.1.3.1. Instruments et techniques de mesure 43
3.1.3.2. Injectabilité 43
3.1.3.3. Cinétique de durcissement 44
3.1.3.4. Variations de masse en milieu aqueux 44
3.1.3.5. Analyse des propriétés rhéologiques 45

3.2. Effets des MIC sur le milieu extra-radiculaire et la réponse biologique de cellules parodontales 45
3.2.1. Diffusion trans-radiculaire de composés actifs 45
3.2.1.1. Médications, milieux et réactifs 45
3.2.1.2. Modèle de diffusion 46
3.2.1.3. Instruments et techniques de mesure 48
3.2.1.4. Variations du pH dans le milieu extra-radiculaire 48
3.2.1.5. Dosage des ions calcium dans le milieu extra-radiculaire 49
3.2.1.6. Dosage de la chlorhexidine dans le milieu extra-radiculaire 49
3.2.2. Réponse de cellules parodontales à la stimulation par des extraits de médication intracanalaire 49
3.2.2.1. Médications, milieux et réactifs 49
3.2.2.2. Formulation des extraits 50
3.2.2.3. Culture cellulaire et protocole de stimulation 50
3.2.2.4. Instruments et techniques de mesure 52
3.2.2.5. Évaluation de la viabilité cellulaire 52
3.2.2.6. Évaluation du potentiel de minéralisation 52
3.2.2.7. Évaluation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires 53

3.3. Analyse statistique des données 54

4. RESULTATS 55
4.1. Influence de la formulation sur l'activité antimicrobienne et les propriétés mécaniques 56
4.1.1. Choix du ratio liquide/poudre 56
4.1.1.1. Effet du ratio liquide/poudre sur la texture de la pâte 56
4.1.1.2. Effet du ratio liquide/poudre sur l'hydratation et le profil de durcissement 56
4.1.2. Effet de l'ajout d'antiseptiques sur l'activité antimicrobienne de la médication intracanalaire 57
4.1.2.1. Susceptibilité antimicrobienne aux antiseptiques étudiés 57
4.1.2.2. Effet antibactérien des médications intracanalaires chargées en antiseptiques 58
4.1.2.3. Dosage des principes actifs libérés 62
4.1.2.4. Effet anti-biofilm des médications intracanalaires chargées en antiseptiques 63
4.1.3. Effet de l'ajout d'antiseptiques sur les propriétés mécaniques de la médication intracanalaire 64
4.1.3.1. Injectabilité 64
4.1.3.2. Profil de durcissement 64
4.1.3.3. Variations de masse et hydratation 65
4.1.3.4. Comportement rhéologique 66

4.2. Effets de médications intracanalaires sur le milieu extra radiculaire et la réponse biologique de cellules parodontales 68
4.2.1. Diffusion trans-radiculaire de composés actifs 68
4.2.1.1. Ions hydroxyles 68
4.2.1.2. Ions calcium 69
4.2.1.3. Chlorhexidine 70
4.2.2. Effets d'extraits de médication intracanalaire sur la réponse de cellules parodontales 70
4.2.2.1. Viabilité cellulaire 70
4.2.2.2. Potentiel de minéralisation 74
4.2.2.3. Sécrétion de médiateurs inflammatoires 76

5. DISCUSSION 78
5.1. Analyse critique des principaux résultats 79
5.1.1. Influence de la formulation sur les propriétés de médications intracanalaires à base d'hydroxyde de calcium 79
5.1.1.1. Effets du ratio liquide/poudre sur la consistance de la pâte 79
5.1.1.2. Activité antimicrobienne 79
5.1.1.3. Propriétés mécaniques et rhéologiques 84
5.1.2. Étude *ex vivo* de la diffusion des composés actifs de la médication intracanalaire à travers la racine dentaire et de la réponse des cellules parodontales *in vivo* 85
5.1.2.1. Diffusion à travers la racine 85
5.1.2.2. Réponse cellulaire des cellules parodontales aux extraits de médication intracanalaire 87

5.2. Perspectives de la médication intracanalaire dans le traitement des lésions endo-parodontales 90

6. CONCLUSION 94

7. BIBLIOGRAPHIE 96

8. ANNEXES 125

Liste des figures i
Liste des tableaux iii
Liste des annexes iv

1. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. L'organe dentaire et ses structures de soutien

1.1.1. Anatomie et embryogénèse de l'endodonte et du parodonte

L'endodonte désigne les cavités internes de la dent, délimitées par des parois dentinaires rigides et leur contenu, la pulpe dentaire (figure 1). La pulpe est un tissu conjonctif lâche spécialisé, composé de 75% d'eau et de 25% de matière organique. On distingue habituellement la pulpe camérale, située dans la chambre pulpaire en coronaire, de la pulpe radiculaire, contenue dans les canaux radiculaires (Galler et al. 2021). La structure histologique de la pulpe n'est pas homogène. Trois couches sont classiquement décrites : (i) une zone périphérique hautement spécialisée occupée par les odontoblastes, (ii) une région acellulaire, sous-odontoblastique, (iii) une zone centrale, riche en cellules (fibroblastes, cellules mésenchymateuses indifférenciées, cellules dendritiques) (Wan et al. 2015). La vascularisation de la pulpe est dite terminale, issue uniquement d'artérioles (Takahashi et al. 1982) et l'innervation est assurée par des fibres sensitives et du système nerveux autonome. Le complexe vasculo-nerveux pulpaire pénètre dans la cavité pulpaire par le foramen apical. Il joue un rôle essentiel dans la vitalité pulpaire et la sensibilité de la dent, élément clé du diagnostic en pratique courante. Il participe également à la surveillance et à la réponse immunitaire en cas d'agressions bactériennes ou de traumatisme (Galler et al. 2021).

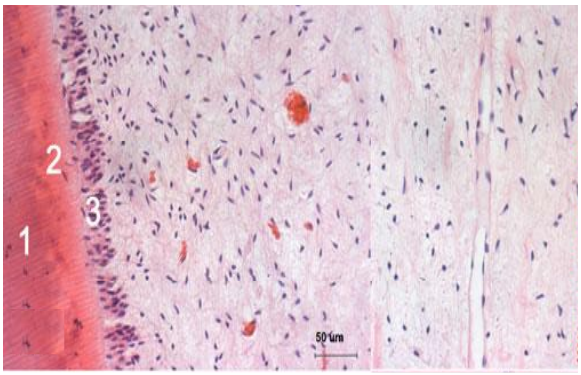


Figure 1. Photographie histologique d'un tissu pulpaire sain. Une dentine (1), une pré-dentine (2) et une précouche odontoblastique pseudo-stratifiée normale (3) sont visibles (à gauche) - coloration à l'hématoxyline et à l'éosine ; grossissement original (×400) (Wan et al. 2015).

Le parodonte est la structure de soutien de la dent (figure 2) composée de deux tissus minéralisés, le cément radiculaire et l'os alvéolaire et de deux tissus non minéralisés, la gencive et le desmodonte (communément appelé ligament alvéolo-dentaire [LAD]). Le parodonte profond est classiquement distingué du parodonte superficiel. Le premier, constitué par le cément, le LAD et l'os alvéolaire assure l'ancrage de la dent et l'amortissement des contraintes masticatoires (Cho et Garant 2000). Le second, formé par la gencive et l'attache épithélio-conjonctive protège l'ensemble des structures sous-jacentes des agressions microbiennes et traumatiques (Cho et Garant 2000).

1. INTRODUCTION

Le parodonte possède une innervation sensitive, assurée par des récepteurs thermiques et des mécanorécepteurs et une innervation autonome (Aars et al. 1993 ; Nanci et Bosshardt 2006 ; Trulsson 2005). La vascularisation très développée du parodonte est constituée par un réseau d'anastomoses de vaisseaux issus des ramifications des artères faciales, maxillaires et sublinguales. Ils se divisent en capillaires desmodontaux d'où sont issus les capillaires veineux qui convergent pour former des veinules post-capillaires (Matsuo et Takahashi 2002).

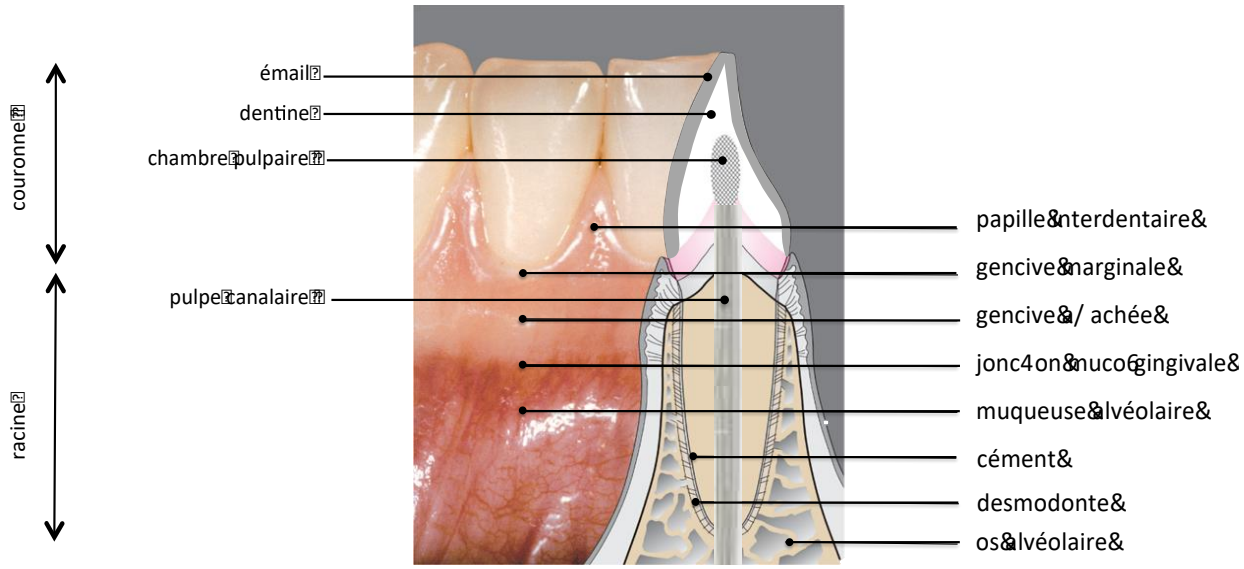


Figure 2. Anatomie et structure de la dent et du parodonte (d'après Wolf et al. 2012).

Au cours de l'odontogenèse, l'édification corono-radiculaire et la formation des tissus de soutien sont le résultat d'interactions continues et réciproques entre l'épithélium et le mésenchyme sous-jacent (Ohshima 2008). Ces interactions se traduisent par l'invagination progressive de l'épithélium dans l'ectomésenchyme, décrite selon plusieurs phases successives appelées stades du bourgeon, de la cupule et de la cloche (Ohshima 2008). La papille et le follicule dentaires, précurseurs de la pulpe et du parodonte, partagent la même origine ectomésenchymateuse. Les cellules du sac folliculaire formeront les cémentoblastes, l'os alvéolaire et les cellules desmodontales, tandis que les odontoblastes sont issus de la papille dentaire (Ricucci et al. 2021 ; Rotstein 2017 ; Zehnder et al. 2002). Au début de l'édification radiculaire, la migration apicale des cellules épithéliales de la gaine de Hertwig forme une barrière discontinue entre la papille mésenchymateuse et le sac folliculaire. Une continuité majeure persiste en effet de part et d'autre du front épithélial et formera à terme le foramen apical (figure 3).

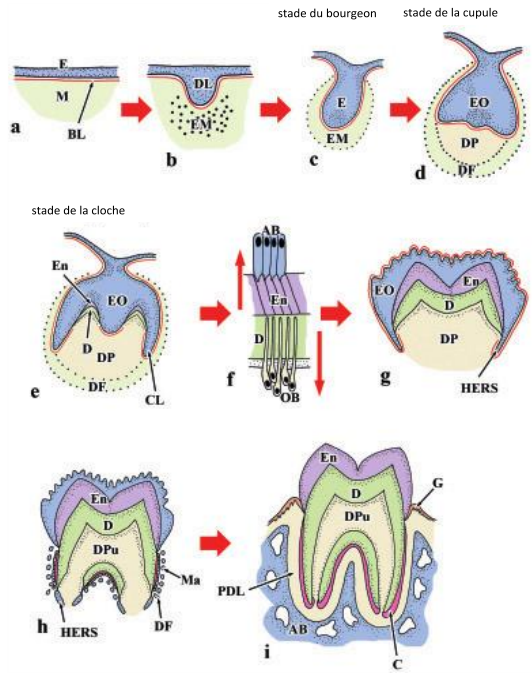


Figure 3. Diagramme schématique du processus de développement de la dent : (a) **E** : épithélium ; **BL** : lame basale ; **M** : mésenchyme ; (b) cellules des crêtes neurales entraînent la condensation de l'épithélium avec formation de la **DL** : lame dentaire ; **EM** : ectomésenchyme ; (c) stade du bourgeon ; (d) stade de la cupule : **EO** : organe de l'émail ; **DP** : papille dentaire ; **DF** : follicule dentaire ; (e) stade de la cloche **D** : dentine ; **En** : émail ; **CL** : boucle cervicale ; (f) **AB** : améloblastes ; **OB** : odontoblastes ; (g) **HERS** : gaine épithéliale de Hertwig en formation ; (h) **Ma** : gaine épithéliale de Hertwig en dégénérescence : débris épithéliaux de Malassez ; **DPu** : pulpe dentaire ; (i) **G** : gencive ; **PDL** : ligament alvéolo-dentaire ; **C** : cément ; **AB** : os alvéolaire (Ohshima 2008).

A mesure que les cellules épithéliales de la gaine épithéliale de Hertwig entourent la papille dentaire, elles initient la différenciation des odontoblastes à partir de cellules ectomésenchymateuses en périphérie de la papille dentaire, entraînant la formation de la dentine radiculaire. Des molécules sécrétées par la membrane basale de l'épithélium, notamment les protéines dérivées de l'émail, jouent également un rôle clé dans la différenciation de cellules du sac folliculaire en cémentoblastes (Ohshima 2008). Au cours de l'édification radiculaire, des canaux ectomésenchymateux sont incorporés à travers des ruptures de continuité au sein de la gaine de Hertwig et formeront des canaux accessoires ou latéraux (Kirkham 1975 ; Singh 2011). Par endroits, des défauts de formation du cément peuvent également produire des zones de communication tubulaire entre l'endodonte et le parodonte (Ahmed 2012 ; Rotstein 2017 ; Singh 2011). En résumé, la cascade d'événements qui aboutit à la formation du complexe dento-parodontal explique l'origine des voies physiologiques de communications endo-parodontales.

1.1.2. Voies de communications physiologiques entre l'endodonte et le parodonte

Le concept de « continuum endo-parodontal » a été proposé par Schilder pour illustrer la proximité anatomique entre le milieu endodontique et l'environnement parodontal ainsi que leurs implications physiopathologiques (Schilder 1965). La cavité pulpaire et le parodonte sont connectés via trois principales voies de communication que sont le foramen apical, les canaux latéraux/accessoires et les tubules dentinaires (Gomes et al. 2009 ; Solomon et al. 1995).

1. INTRODUCTION

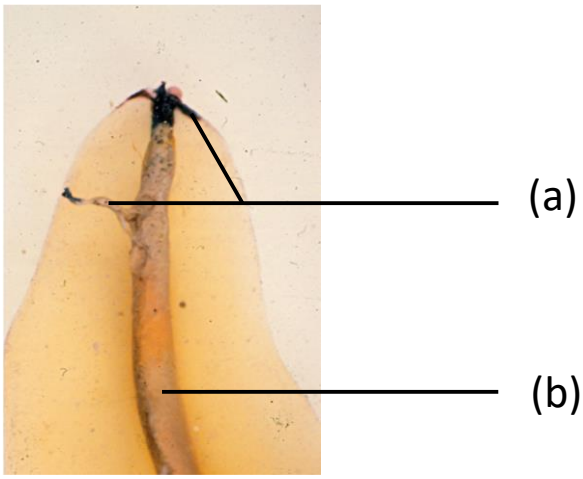


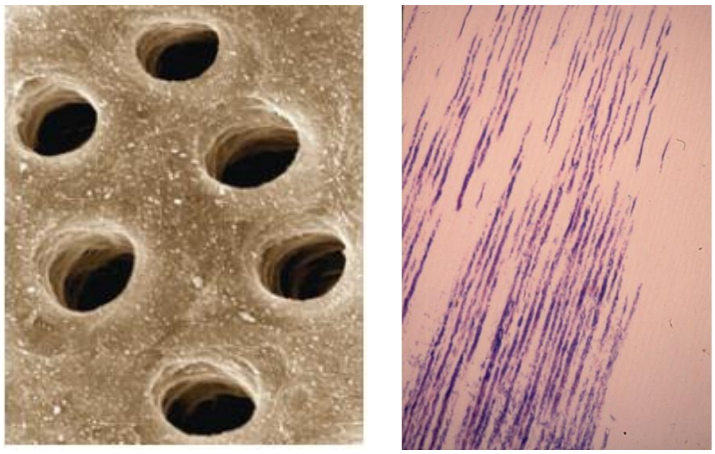
Figure 4. Exemple de (a) canaux secondaires et d'un (b) canal principal à l'apex d'une racine (Moreinos et al. 2021).

Le foramen apical est un orifice d'environ 0,21 à 0,39 mm (Morfis et al. 1994), situé à l'extrémité du péri-apex, au niveau du canal principal (figure 4). Il est la voie de passage la plus importante et la plus directe entre l'endodonte et le parodonte (Zehnder et al. 2002). En conditions physiologiques, il permet les échanges vasculaires, lymphatiques et nerveux, entre la partie interne et l'environnement externe de la dent (Ahmed 2012 ; Rotstein 2017). En cas d'infection pulpaire, il sert au passage de métabolites bactériens et médiateurs inflammatoires qui aboutissent à une résorption osseuse péri-apicale et la formation d'une lésion péri-apicale (LPA) ou d'une lésion inflammatoire péri-radiculaire d'origine endodontique (LIPOE). La présence d'un canal unique est exceptionnelle. Des foramina, deltas, boucles et furcations sont fréquemment observés à l'extrémité apicale du canal (Siew et al. 2019).

Les canaux latéraux, accessoires et secondaires sont des voies de communication endo-parodontales mineures (40 à 100 µm) (figure 4), mais fréquentes (Bonaccorso 2014 ; Rotstein 2017 ; Venturi et al. 2003). Leur proportion varie entre 1,6% dans le tiers coronaire, 8,8% dans le tiers médian et 17% dans le tiers apical des racines (De Deus 1975). Les canaux latéraux sont situés au tiers moyen de la racine et perpendiculaires au canal principal (De Deus 1975 ; Kirkham 1975); les canaux secondaires sont situés de 1 à 3 mm de l'apex et les canaux accessoires sont des ramifications d'un canal secondaire. Au niveau de la furcation, les canaux accessoires sont présents au niveau de 30% à 60% des molaires (Aksel et Serper 2014 ; De Deus 1975 ; Rotstein 2017).

Les tubules dentinaires (figure 5) s'étendent de façon quasi rectiligne de la pulpe vers la jonction cémento-dentinaire. Leur diamètre compris entre 1 et 3 µm diminue avec l'âge, du fait de la sclérose dentinaire (Moreinos et al. 2021). Leur densité varie entre 8 000 par millimètre carré au niveau de la jonction cémento-dentinaire et 57 000 par millimètre carré à proximité de la pulpe

camérale (Rotstein 2017; Zehnder et al. 2002). En présence de zones dentinaires exposées du fait de l'absence de cément, des tubules dentinaires « ouverts » peuvent servir de voies de communication entre la pulpe et le parodonte. L'absence de cément peut être congénitale ou d'origine pathologique. En microscopie électronique, la dentine est exposée dans 18% des cas en général et dans 25% des dents antérieures (Rotstein 2017 ; Zehnder et al. 2002).



(a) (b)

Figure 5. Image de (a) tubules dentinaires au microscope électronique à balayage (Bonaccorso 2014) ; (b) bactéries dans les tubules dentinaires (Moreinos et al. 2021).

1.2. Les lésions endo-parodontales

1.2.1. Définition

Le terme « lésion endo-parodontale » (LEP), désigne une situation clinique où coexistent, au niveau d'une même dent, une pathologie parodontale et une pathologie pulpaire (Herrera et al. 2018 ; Papapanou et al. 2018). Elles peuvent se manifester sous une forme aiguë (abcès accompagné de douleurs), notamment lorsqu'elles sont associées à une condition traumatique ou iatrogène récente (fracture radiculaire ou perforation par exemple), ou sous forme chronique avec peu de symptômes. La présence de poches parodontales profondes atteignant (ou à proximité de) l'apex, associées à une réponse « anormale » (négative ou altérée aux tests de vitalité pulpaire) sont des signes cliniques typiques de LEP. D'autres symptômes associés aux LEP comme la résorption osseuse dans la zone apicale ou furcatoire, la douleur spontanée, la douleur à la palpation et à la percussion, l'exsudat purulent, la mobilité, la présence d'un trajet fistulaire et de dyschromies dentaires ou gingivales sont rapportés dans la littérature (Gomes et al. 2015 ; Herrera et al. 2018). L'hétérogénéité des situations cliniques désignées sous l'appellation de LEP et la diversité des termes utilisés pour désigner ces situations cliniques très proches voire identiques (« lésions infra-osseuses avec une atteinte péri-apicale » ou « lésion apico-marginale ») est une source potentielle de confusion. Un récent consensus

en parodontologie propose que le terme LEP soit réservé aux « LEP vraies », c'est-à-dire celles qui touchent à la fois le parodonte et la pulpe (Herrera et al. 2018 ; Papapanou et al. 2018).

1.2.2. Prévalence

La prévalence des LEP varie selon les populations et les définitions/classifications utilisées. Deux études récentes (en Inde) l'évaluent entre 14,9% et 17,3% des patients (Altaf et al. 2019 ; Prashaanthi et Shantha Sundari 2021). Une autre (en Allemagne), basée sur la classification de Chicago 2017, estime la fréquence des LEP à 4,9% des patients et 0,4% des dents en patientèle hospitalière (Ruetters et al. 2022).

Les LEP sont plus souvent diagnostiquées chez des patients adultes, de 31-40 ans (Prashaanthi et Shantha Sundari 2021) et de plus de 50 ans (Altaf et al. 2019 ; Sepolia et al. 2021). Certaines études indiquent une prédominance masculine (Altaf et al. 2019 ; Prashaanthi et Shantha Sundari 2021 ; Sepolia et al. 2021). Elles semblent légèrement plus fréquentes à la mandibule (48,04% à 57,20%) (Sepolia et al. 2021) et concernent davantage les molaires (38,65 à 76,92% des dents touchées par une LEP et 21,30% pour les « LEP vraies ») (Altaf et al. 2019 ; Cucolo et al. 2021 ; Sepolia et al. 2021). Les prémolaires (24,51% à 25,05%), les canines (20,06%) et les incisives (12,34%) sont moins souvent touchées (Altaf et al. 2019 ; Sepolia et al. 2021). Il est intéressant de remarquer que les molaires sont aussi les dents les plus souvent traitées endodontiquement ou perdues pour raisons parodontales (Bahrami et al. 2008 ; Fan et al. 2020 ; Imura et al. 2007 ; Kirkevang et al. 2001 ; Kirkevang et al. 2017 ; Nunn et al. 2012). Dans une étude récente, la pulpe non vitale présentait l'association la plus significative avec la perte dentaire chez des patients parodontaux en maintenance depuis plus de 10 ans, mais les données de la littérature sont contradictoires sur ce point (Kato et al. 2020).

En résumé, les estimations de la prévalence des LEP montrent des écarts parfois importants, probablement liés à la taille et au type d'échantillons étudiés. Les LEP vraies semblent relativement peu fréquentes et mal connues. Seulement 31 à 45% des dentistes, souvent des spécialistes, seraient compétents pour les diagnostiquer et les prendre en charge, tandis qu'une grande majorité (92%) se sent insuffisamment formée (Khandelwal et al. 2020 ; Sepolia et al. 2021).

1.3. Étiologies des lésions endo-parodontales

Comme la parodontite et les LIPOE, les LEP ont une origine multifactorielle (figure 6)(Ahmed 2012 ; Rotstein 2017 ; Siew et al. 2019). L'expérimentation princeps de Kakehashi et al. ont démontré que l'infection bactérienne est indispensable au développement d'une pathologie péri-apicale d'origine endodontique. En effet, l'exposition de l'endodonte à l'environnement buccal n'entraîne

aucune pathologie chez les animaux exempts de germes, tandis que les rats contrôles développent une nécrose pulpaire et un abcès apical (Kakehashi et al. 1965). Des expérimentations similaires ont permis d'établir l'origine infectieuse des lésions parodontales (Socransky et Haffajee 1992). Blomlöf et al. ont également constaté que l'infection de la pulpe altérait la cicatrisation de lésions parodontales induites chez le singe, quel que soit le stade d'édification radiculaire (Blomlöf et al. 1992). Ces données probantes soutiennent que l'infection bactérienne est le principal facteur étiologique des LEP. Cependant, l'implication d'autres agents pathogènes vivants ou non, le rôle clé de la réponse inflammatoire, ainsi que de nombreux facteurs favorisant ou facteurs de risque locaux et généraux, sont établis ou supposés (Parolia et al. 2013 ; Rotstein 2017).

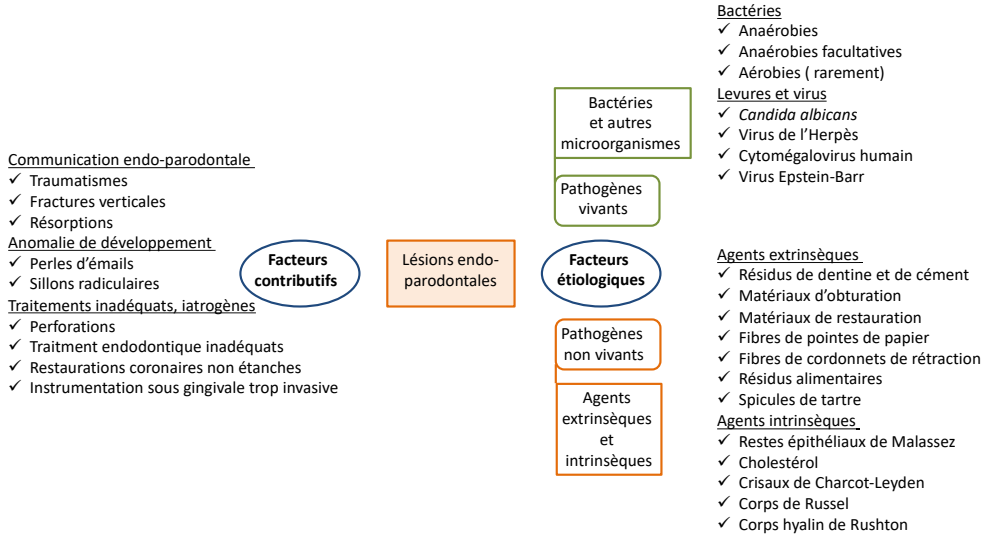


Figure 6. Facteurs étiologiques et contributifs des lésions endo-parodontales (d'après Parolia et al. 2013).

1.3.1. Facteur microbien et mécanismes de destruction tissulaire dans les lésions endo-parodontales

Rôle des agents pathogènes vivants

➢ *Les bactéries*

La question des similitudes, différences et interactions potentielles entre la population bactérienne de la poche parodontale et du canal dentaire est récurrente dans la littérature (figure 7). De nombreuses études ont examiné la possibilité d'infections croisées entre ces deux compartiments dans les LEP avec des résultats variables (Gambin et al. 2021 ; Herrera et al. 2018 ; Ruetters et al. 2021 ; Slots 2017).

Dans l'ensemble, les analyses microbiologiques traditionnelles ou par PCR montrent que 13,1% à 62,5% des espèces bactériennes seraient communes aux deux sites (Xia et Qi 2013). Les résultats varient selon les études et les techniques, mais un grand nombre d'espèces identifiées dans les canaux radiculaires infectés sont des pathogènes parodontaux du complexe rouge et orange, tels que

Porphyromonas gingivalis, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia* (Cucolo et al. 2021) et *Prevotella intermedia* (Didilescu et al. 2012 ; Gambin et al. 2021 ; Herrera et al. 2018 ; Rovai et al. 2019). Selon d'autres études utilisant des techniques moléculaires "ouvertes" (le séquençage de nouvelle génération [NGS], l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant [DGGE], le clonage et le séquençage), le microbiote endodontique est moins complexe et moins diversifié que celui de la poche parodontale (Lopes et al. 2021). Des taxons tels que *Enterococcus faecalis, Filifactor alocis,* issus du genre *Desulfobulbus, Dialister, Fretibacterium,* ou *Rothia*, peu décrits dans les parodontites, ont été identifiés dans les canaux radiculaires (Herrera et al. 2018 ; Li et al. 2014). Des travaux récents identifient cependant, que ces familles de bactéries seraient également associées aux parodontites (Oliveira et al. 2016 ; Pérez-Chaparro et al. 2014). En résumé, la littérature ne montre pas de différences majeures entre la population bactérienne de la poche parodontale et des canaux radiculaires. Au-delà de potentielles infections croisées, cette proximité est le résultat probable de l'adaptation de biofilms bactériens complexes à des écosystèmes comparables en termes de nutriments et de conditions environnementales anaérobies notamment.

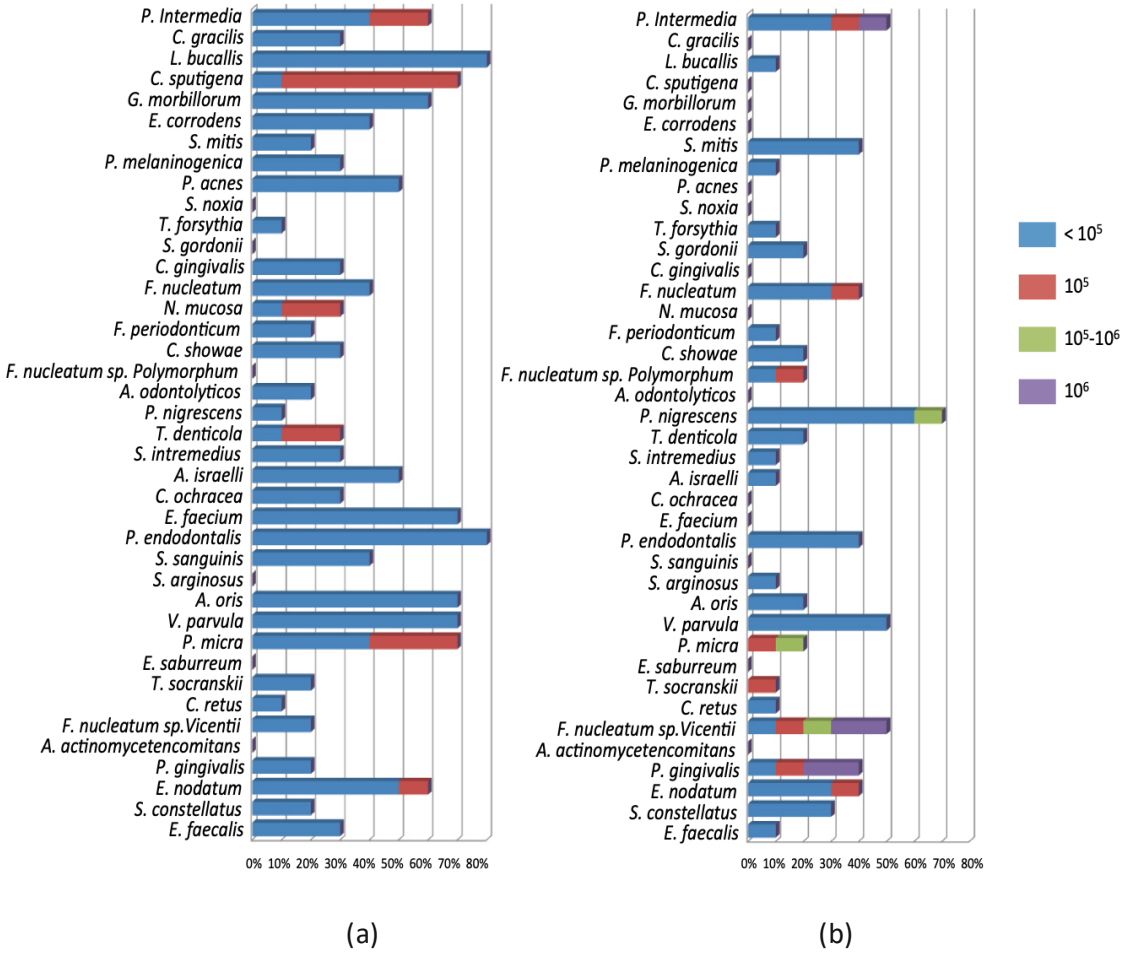


Figure 7. Prévalence d'espèces bactériennes obtenues par hybridation ADN-ADN en damier à partir d'échantillons issus de : (a) l'endodonte et (b) du parodonte de lésions endo-parodontales (Rovai et al. 2019).

- *Autres microorganismes*

Les fungi, en particulier *Candida albicans*, font partie des autres pathogènes associés aux infections endodontiques persistantes et aux LEP. *C. albicans* est un micro-organisme opportuniste, pathogène commensal chez les humains en bonne santé. Il peut provoquer des infections, parfois graves chez l'immunodéprimé. Ses nombreux facteurs de virulence (invasion tissulaire, hémolyse entre autres) et ses capacités d'adaptation (adhésion épithéliale, formation de biofilms) en font un pathogène difficile à éradiquer (Gomes et al. 2017 ; Sardi et al. 2011). *C. albicans* a été détecté dans 21% des canaux radiculaires infectés et il est fréquemment isolé chez les patients adultes atteints de parodontite (Rotstein 2017). Gomes et al. l'ont isolé à la fois dans les canaux pulpaires et les poches parodontales chez 40% des patients présentant une LEP (Gomes et al. 2017).

Des études de plus en plus nombreuses suggèrent l'implication de virus dans l'étiologie des pathologies parodontales et endodontiques. Glick et al. ont été les premiers à détecter un virus (HIV) dans la pulpe dentaire chez un patient immunodéprimé (Glick et al. 1989). La présence d'Herpèsvirus communs (HSV, EBV, CMV) a ensuite été observée dans les poches parodontales, et plus récemment dans les canaux radiculaires et les lésions apicales (Rajasekaran et al. 2016). Cependant, leur rôle précis reste débattu. Ils pourraient agir comme cofacteurs, responsables de l'augmentation de la proportion de certaines bactéries telles que *P. gingivalis, P. nigrescens, T. denticola, P. intermedia et A. actinomycetemcomitans* (Rajasekaran et al. 2016 ; Rotstein 2017). D'autres études suggèrent un effet potentiel sur la réactivation de lésions non symptomatiques (Rotstein 2017).

Agents pathogènes non vivants

L'analyse anatomopathologique de lésions apicales, dans des rapports de cas le plus souvent, étaye le rôle possible d'agents extrinsèques ou intrinsèques dans l'inflammation des tissus péri-radiculaires ou les échecs de traitements (Karamifar 2020). Cependant, il est difficile d'établir le rôle causal de ces agents pathogènes non vivants sur la seule base des rapports de cas qui ont constaté leur présence souvent fortuite (Karamifar 2020). Les agents extrinsèques ou corps étrangers décrits comprennent des résidus de dentine ou de cément (Holland et al. 1980 ; Wong et al. 1989), des matériaux d'obturation ou de restauration (Parolia et al. 2013 ; Rotstein 2017 ; Siew et al. 2019), des fibres provenant de pointes de papier ou de cordonnets de rétraction (Koppang et al. 1989), des résidus alimentaires (Philipsen et Reichart 2010) ou des spicules de tartre. Les agents intrinsèques peuvent être des résidus embryonnaires de l'odontogénèse (restes épithéliaux de Malassez) (Seltzer et al. 1969), des cristaux (cholestérol ou de Charcot-Leyden) et d'autres structures (corps de Russel, corps hyalin de Rushton) issus de la lyse de cellules inflammatoires (El-Labban 1979 ; Nair 2006 ; Rotstein 2017).

1. INTRODUCTION

Mécanismes de destruction tissulaire dans les lésions endo-parodontales

Les études de la réponse immune de l'hôte et de mécanismes de destruction tissulaire, potentiellement spécifiques, dans les LEP sont quasi inexistantes. A ce jour, seule une étude récente a étudié la réponse inflammatoire dans les LEP, en se limitant au dosage de biomarqueurs pré sélectionnés (interleukines [IL-1α, -1β], facteur de nécrose tumorale [TNF-α], prostaglandine E2 [PGE2], métalloprotéinases matricielles [MMP-2, -3, -8, -9 et -13]) avant/après traitement endodontique (Duque et al. 2019). Cependant, des similitudes étiopathogéniques remarquables entre les LIPOE et la parodontite offrent une base pour la compréhension des mécanismes de destruction tissulaire dans les LEP (figure 8) (Graves et al. 2011 ; Karteva et Manchorova-Veleva 2020).

Les LIPOE sont associées à une contamination bactérienne et une nécrose pulpaire, qui évoluent typiquement en quatre étapes : (i) l'exposition et la contamination pulpaire, (ii) l'inflammation et la nécrose de la pulpe dentaire, (iii) le développement d'une inflammation dans la zone péri-apicale et (iv) la résorption osseuse péri-apicale associée à la formation de granulomes ou de kystes (Graves et al. 2011). De même, la destruction de l'attache et la formation de la poche parodontale sont initiées par l'accumulation du biofilm dans le sillon gingival qui déclenche la réponse de l'hôte et aboutit à la destruction de l'attache épithélio-conjonctive et la résorption de l'os alvéolaire (Page et Schroeder 1976). Il n'est donc pas surprenant que les mêmes acteurs cellulaires de l'immunité innée et adaptative (polymorphonucléaires [PMN], macrophages, cellules TH1, TH2, TH17, lymphocytes B, ostéoclastes) et médiateurs (IL-1β, IL-6, IL-17, TNF-α, RANKL/OPG) soient impliqués dans les deux pathologies (Karteva et Manchorova-Veleva 2020). Parmi les médiateurs cellulaires, les PMN et les cytokines jouent un rôle clé dans la régulation de l'activité des cellules inflammatoires, la destruction et le remaniement tissulaire. De nombreuses études ont mis en évidence leurs effets parfois contradictoires sur la résorption osseuse parodontale et endodontique (Graves et al. 2011). Les raisons de ces paradoxes apparents ne sont pas élucidées. Parmi les médiateurs pro-inflammatoires décrits, TNF-α et IL-6, jouent un rôle régulateur dans la réponse immunitaire innée. Le TNF-α induit la résorption osseuse et tissulaire par : (i) une activation des leucocytes et des cellules endothéliales, (ii) une stimulation de la production de chimiokines, et (iii) une régulation à la hausse de PGE2 et des MMPs impliquées dans la dégradation du tissu conjonctif (Karteva et Manchorova-Veleva 2020). L'IL-6 stimule : (i) la production de RANKL, (ii) l'ostéoclastogenèse, et (iii) la résorption osseuse (Graves et al. 2011).

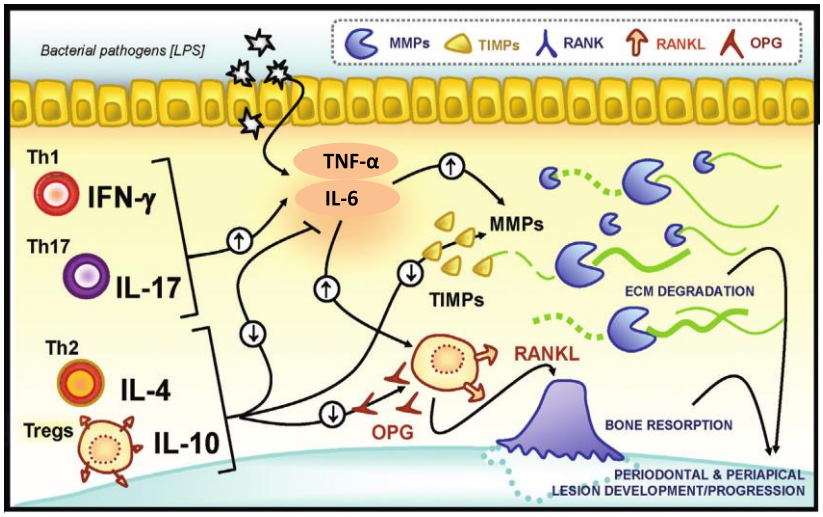


Figure 8. Régulation par les cytokines de la dégradation de la matrice et de la résorption osseuse dans les environnements parodontaux et péri-apicaux. (D'après Graves et al. 2011 ; Karteva et Manchorova-Veleva 2020).

1.3.2. Facteurs contributifs

De nombreux facteurs contributifs, parfois abusivement qualifiés de facteurs de risque, peuvent favoriser le développement et la progression d'une LEP. Ils peuvent être regroupés en (i) communications pathologiques entre l'endodonte et le parodonte, (ii) anomalies du développement dentaire et (iii) traitements inadéquats (Siew et al. 2019 ; Rotstein 2017). Compte tenu des nombreuses voies de communications entre le parodonte et la pulpe, les effets réciproques des maladies parodontales sur l'état pulpaire et de l'infection endodontique sur la perte d'attache sont souvent décrits comme un aspect de l'étiologie des LEP, mais cette hypothèse reste controversée (Harrington et al. 2002 ; Kirkham 1975 ; Rotstein 2017). Enfin, le rôle des facteurs de risque comportementaux ou médicaux de la parodontite ou des pathologies apicales dans les LEP est une hypothèse de plus en plus étudiée (Moreinos et al. 2021 ; Schmidt et al. 2014).

Communications pathologiques entre l'endodonte et le parodonte

Les traumatismes dentaires et les lésions dento-parodontales qu'ils engendrent peuvent être à l'origine de LEP, lorsque les atteintes concernent la racine dentaire et/ou la pulpe (Rotstein 2017 ; Siew et al. 2019). En particulier, les fractures verticales (« vertical root fracture » VRF) offrent une niche pour la contamination bactérienne le long de la racine, provoquant une inflammation des tissus parodontaux (Singh 2011). Elles peuvent survenir suite à un traumatisme externe ou interne (obturation endodontique ou pose de tenon radiculaire) (Moreinos et al. 2021; Singh 2011). Tamse et al. ont constaté la présence d'une poche parodontale étroite dans 67% des cas de VRF (Tamse et al. 1999). En cas d'infection parodontale, une nécrose pulpaire consécutive à la dissémination bactérienne à travers le trait de fracture est possible (Al-Fouzan 2014).

1. INTRODUCTION

Les résorptions dentaires sont des pertes de substance dentaire provoquées par l'activité de cellules clastiques appelées odontoclastes. Leur prévalence est estimée entre 13% et 16% des patients (Potarnichie et al. 2012). Elles sont souvent liées à des agressions physiques, chimiques et toxiques sur des dents traitées endodontiquement et/ou avec un antécédent de traumatismes (Rotstein 2017). La perte d'intégrité radiculaire et *a fortiori* la présence d'une perforation pour les lésions les plus étendues, crée une communication endo-parodontale pouvant induire la nécrose pulpaire. De même, l'inflammation pulpaire chronique peut entraîner une résorption interne qui aboutit à une perforation et des complications parodontales (Moreinos et al. 2021 ; Singh 2011).

Anomalies du développement dentaire

Certaines anomalies du développement dentaire peuvent augmenter le risque parodontal local, en favorisant l'accumulation bactérienne et la destruction tissulaire, ou en compliquant l'accès à l'instrumentation et la réponse au traitement. C'est le cas des perles d'émail, retrouvées dans 1,1% à 9,7% des cas, généralement au niveau des racines des molaires (Fonzi et al. 1992 ; Moreinos et al. 2021 ; Xie et al. 2017) ou des sillons radiculaires, plus fréquemment situés sur la face palatine des incisives latérales maxillaires (1,9% à 14% des cas) (Moreinos et al. 2021 ; Rotstein 2017 ; Siew et al. 2019). Ces anomalies peuvent expliquer la présence de poches parodontales localisées atteignant le péri-apex.

Traitements inadéquats, iatrogènes et leurs complications

Des traitements endodontiques, parodontaux ou restaurateurs inadaptés et/ou iatrogènes sont des sources potentielles de communications endo-parodontales indésirables et d'inflammation chronique pouvant aboutir à des pathologies parodontales, péri-apicales ou combinées. C'est le cas notamment :

(i) des perforations endodontiques, qui surviennent le plus souvent pendant l'instrumentation du canal radiculaire (43% des cas) et la préparation du canal pour un ancrage prothétique (53% des cas) (figure 9) (Moreinos et al. 2021 ; Rotstein 2017 ; Singh 2011),

(ii) des traitements endodontiques inadéquats qui favorisent la réinfection du canal et le développement ou la persistance d'une lésion apicale chronique (Singh 2011),

(iii) des restaurations coronaires non étanches qui sont une source de recontamination du canal et d'échec du traitement endodontique (82% d'échecs avec une restauration défectueuse contre 9% avec une obturation coronaire étanche) (Ray et Trope 1995),

(iv) d'une instrumentation sous-gingivale trop invasive qui peut altérer l'intégrité du cément et provoquer l'exposition des tubules dentinaires, favorisant une agression chronique de la pulpe (Al-Fouzan 2014 ; Herrera et al. 2018 ; Rotstein 2017 ; Siew et al. 2019 ; Singh 2011).

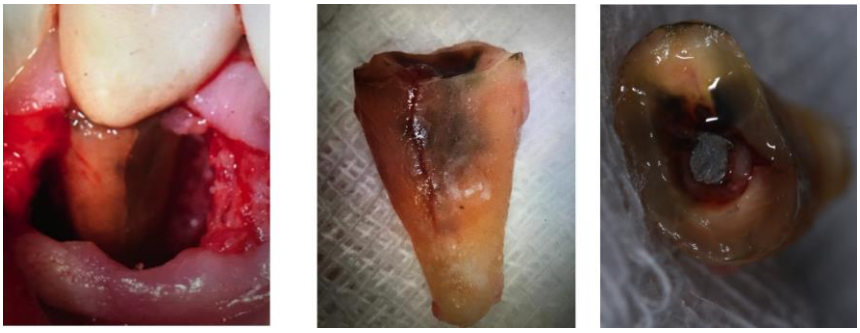


Figure 9. Exemple de fracture radiculaire verticale d'origine iatrogène, liée à la contrainte mécanique du tenon prothétique (courtoisie Pr Agossa).

Effets réciproques des pathologies endodontiques et parodontales : données et controverses

- *Effet de l'état pulpaire sur la perte d'attache et la cicatrisation parodontale*

Cette hypothèse s'appuie notamment sur une série de publications des années 90, issues pour la plupart de la même cohorte de patients, qui ont associé la présence d'une LPA à une profondeur de poche plus importante (+0,2 à 0,7 mm) ou une progression accélérée de la perte osseuse marginale (0,19 mm/an vs 0,06 mm/an) (Ehnevid et al. 1993a; 1993b ; Jansson et al. 1993a ; 1993b ; Jansson et al. 1995). Une autre étude a rapporté de meilleurs résultats en termes de gain osseux après le traitement chirurgical de défauts infra-osseux au niveau de dents pulpées par rapport aux dents traitées endodontiquement (65% contre 33%) (Sanders et al. 1983). Cependant, les nombreux traitements endodontiques inadéquats inclus dans ces études et la pertinence clinique des différences constatées apparaissent comme un biais sérieux à l'interprétation de ces données. L'association suggérée dans ces travaux historiques entre la présence d'une LPA et l'état parodontal n'a pas pu être confirmée par des études plus rigoureuses (Nyman et Lindhe 1979 ; McGuire et Nunn 1996). En résumé, l'effet du statut endodontique sur le risque de perte d'attache apparait négligeable s'il existe. De même, un faisceau cohérent d'arguments indique que lorsque le traitement endodontique est de bonne qualité, la réponse au traitement parodontal de la dent dépulpée et de la dent pulpée sont comparables (Harrington 1979).

- *Effet de la pathologie parodontale sur l'état pulpaire*

Quelques études histologiques antérieures aux années 80, ont rapporté des signes de dégénérescence pulpaire au niveau de dents indemnes de caries présentant des lésions parodontales sévères (Seltzer et al. 1969 ; Langeland et al. 1974) mais ces observations sont contredites par des analyses plus récentes (Czarnecki et Schilder 1979 ; Jaoui et al. 1995 ; Torabinejad et Kiger 1985). Par ailleurs, les données probantes cliniques minimisent ou réfutent le rôle potentiel de la parodontite comme facteur causal de nécrose pulpaire. En effet, chez des patients atteints de parodontite sévère

traitée et en maintenance, très peu de dents nécessitent à long terme un traitement endodontique pour cause parodontale, quelle que soit la sévérité de l'atteinte parodontale (Bergenholtz et Nyman 1984 ; Jaoui et al. 1995). Dans de rares cas, seule une perte osseuse atteignant l'apex de la racine pourrait potentiellement altérer le paquet vasculo-nerveux et provoquer une nécrose pulpaire (Moreinos et al. 2021 ; Rotstein 2017 ; Wan et al. 2015).

En conclusion, malgré l'existence de voies de communication endo-parodontales évidentes, les influences réciproques entre les pathologies endodontiques et parodontales apparaissent très limitées.

Rôle des facteurs de risque médico-comportementaux

La grande majorité des études menées sur les LEP excluent les patients atteints de maladies systémiques ou ne présentent pas de groupe contrôle adéquat. Par conséquent, peu de preuves directes montrent l'effet de facteurs médico-comportementaux sur l'apparition ou la progression des LEP. Cependant, il fait sens de penser que les facteurs de risque médicaux des parodontites, comme le diabète, pourraient augmenter le risque de LEP, puisqu'elles sont associées à la présence de lésions parodontales plus sévères (Gambin et al. 2021 ; Segura-Egea et al. 2015). Des études récentes suggèrent également l'existence de liens entre les pathologies péri-apicales d'origine endodontique et la santé générale (Kumar 2019 ; Liccardo et al. 2019 ; Preshaw et al. 2012 ; Segura-Egea et al. 2015). Gomes et al. ont observé une augmentation significative de la prévalence et de la virulence de *C. albicans* dans les LEP de patients diabétiques par rapport aux non diabétiques (87,5% contre 50%). Ils expliquent ce résultat par les effets du diabète sur le microbiote oral (Gomes et al. 2017). D'autres études suggèrent une susceptibilité accrue aux infections apicales chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) (Agossa et al. 2021 ; Halme et al. 1993 ; Piras et al. 2017 ; Poyato-Borrego et al. 2020). L'une d'entre elles indique même une association avec l'activité de la MICI (Halme et al. 1993). A l'inverse, les traitements biologiques comme les anti-TNF administrés à ces patients pourraient avoir un effet positif sur la cicatrisation de ces lésions (Piras et al. 2017).

Le tabac est également un facteur de risque reconnu des parodontites, dont il augmente fortement le risque d'apparition, de progression et dont il diminue la réponse au traitement (Leite et al. 2018). L'effet du tabac sur le risque ou la sévérité des lésions péri-apicales est controversé (Duncan et Ford 2006 ; Segura-Egea et al. 2015). Cependant, le tabac semble réduire les chances de succès du traitement de lésions péri-apicales et serait associé aux LPA persistantes (OR = 1,16 ; 95% CI = 1,07–1,26 ; p = 0,0004) (Cabanillas-Balsera et al. 2020 ; Segura-Egea et al. 2015).

1.4. Classifications et diagnostic des lésions endo-parodontales

1.4.1. Classifications historiques

De nombreuses classifications ont été décrites pour le diagnostic des LEP, en se basant sur l'origine de la pathologie, son évolution, ses caractéristiques cliniques ou le traitement requis (Ahmed 2012 ; Bonaccorso 2014 ; Peeran et al. 2021) (tableau 1). La plus répandue est celle de Simon (1972), qui prend en compte la cause primaire de la maladie (Moreinos et al. 2021) et comprend 5 catégories (Simon et al. 1972) :

(i) les lésions endodontiques primaires : la réponse pulpaire est anormale (ou la nécrose est avérée), mais la maladie parodontale est exclue compte tenu du niveau des crêtes osseuses proximales,

(ii) les lésions endodontiques primaires avec une atteinte parodontale secondaire : la pathologie pulpaire non traitée entraîne une atteinte des structures parodontales,

(iii) les lésions parodontales primaires : la sensibilité pulpaire est normale (ou la pulpite est réversible mais la nécrose écartée), cependant, la progression de la lésion parodontale peut atteindre l'apex,

(iv) les lésions parodontales primaires avec une atteinte endodontique secondaire : la progression de la parodontite peut conduire à une nécrose pulpaire,

(v) les lésions parodontales « vraies » associées ou combinées : la nécrose pulpaire et les signes de parodontite sont avérés.

Cette classification a été tour à tour simplifiée (Rotstein et Simon 2004), parfois en la limitant aux LEP vraies (Abbott et Salgado 2009), ou au contraire détaillée (Al-Fouzan 2014). Son principal inconvénient est d'être basée sur l'historique de la pathologie, souvent inconnu au moment du diagnostic. Par ailleurs, la distinction de certaines catégories (classes iv et v par exemple), dans lesquelles à la fois le traitement endodontique et parodontal sont requis, apparaît peu pertinente (Simon et al. 1972).

1. INTRODUCTION

Tableau 1. Évolution des classifications des lésions endo-parodontales (d'après Bonaccorso 2014 ; Ahmed 2012 ; Peeran et al. 2021).

Auteurs (date) Critères de classification	**Classifications**
Simon et al (1972) repose sur l'étiologie et l'évolution	Classe I : Lésion endodontique primaire Classe II : Lésion parodontale primaire Classe III : Maladie endodontique primaire avec atteinte parodontale secondaire Classe IV : Maladie parodontale primaire avec atteinte endodontique secondaire Classe V : Lésion combinée vraie
Rotstein et Simon (2004) repose sur l'étiologie et l'évolution	Classe I : Maladie endodontique primaire Classe II : Maladie parodontale primaire Classe III : Maladies combinées : A) Une maladie endodontique primaire avec une atteinte parodontale secondaire B) Une maladie parodontale primaire avec atteinte endodontique secondaire C) Les véritables maladies combinées
Abbott et Salgado (2009) repose sur l'étiologie des lésions endo-parodontales combinées	1) Maladies endodontiques et parodontales concomitantes sans communication 2) Maladies endodontiques et parodontales concomitantes avec communication
Force (2011) repose sur l'étiologie	Classe 1 : Lésions parodontales induites par la plaque dentaire Classe 2 : Lésions parodontales d'origine endodontique Classe 3 : Lésions endo-parodontales combinées Classe 4 : Pseudo lésions endo-parodontales, pour les situations dans lesquelles les examens cliniques et radiologiques initiaux indiquent des sources endodontiques et parodontales
Ahmed (2012)	Classe I : Lésion endo-parodontales synchrones Classe II : Lésions pulpaires 1. Modèle pathologique localisé 2. Modèle de distribution unilatérale Classe III : Lésions parodontales avec atteinte pulpaire ultérieure 1. En développement 2. Non développées Classe IV : Lésions endo-parodontales indépendantes Classe V : Lésions endo-parodontales iatrogènes 1. Procédures endodontiques provoquant des lésions parodontales 2. Procédures parodontales provoquant des lésions pulpaires 3. Procédures non endodontiques/non parodontales provoquant des lésions endo-parodontales Classe VI : Lésions endo-parodontales avancées 1. Lésions endo-parodontales avancées avec implication parodontale indépendante 2. Lésions endo-parodontales avancées sans atteinte parodontale indépendante Classe VII : Lésions endo-parodontales indéfinies
Al-Fouzan(2014)	1) La maladie parodontale rétrograde : a. Lésion endodontique primaire avec drainage à travers le ligament parodontal b. Lésion endodontique primaire avec atteinte parodontale secondaire 2) Lésion parodontale primaire 3) Lésion parodontale primaire avec atteinte endodontique secondaire 4) Lésion combinée endo-parodontale 5) Lésion parodontale iatrogène. 1. Dent qui ne nécessite qu'un traitement endodontique 2. Dent qui ne nécessite qu'une thérapie parodontale 3. Dent nécessitant une thérapie endodontique et parodontale 4. Dent destinée à être extraite

1.4.1. Classification de Chicago

Un nouveau système de diagnostic des LEP a récemment été proposé dans le cadre de la classification des maladies et conditions parodontales dite de Chicago 2017 (Papapanou et al. 2018). Selon ce système, le diagnostic et la classification des LEP reposent sur l'état actuel de la lésion et le pronostic de la dent concernée, afin d'orienter la thérapeutique et la décision de conservation ou d'extraction (Herrera et al. 2018). Il tient compte de (i) l'intégrité radiculaire (présence/absence de fracture ou de perforation), (ii) l'état parodontal (présence/absence de parodontite) et (iii) l'étendue de la destruction tissulaire autour de la dent (figure 10) (Herrera et al. 2018).

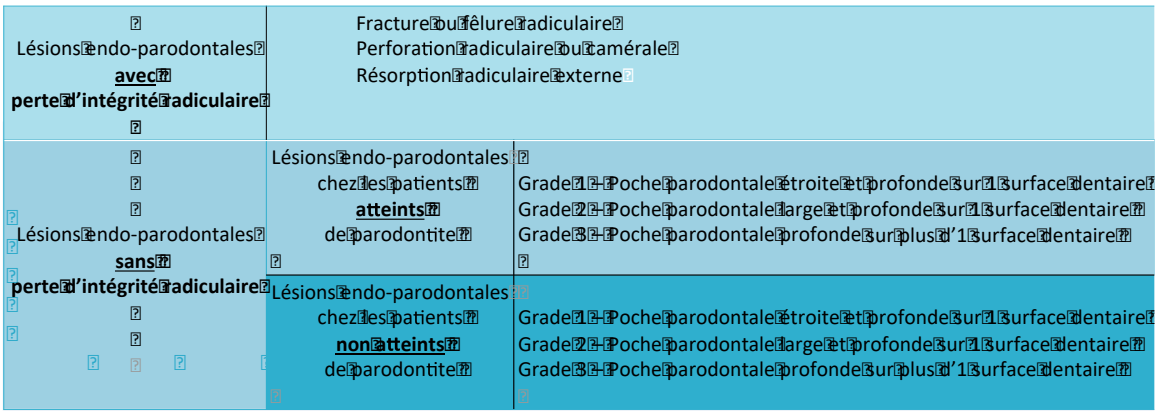
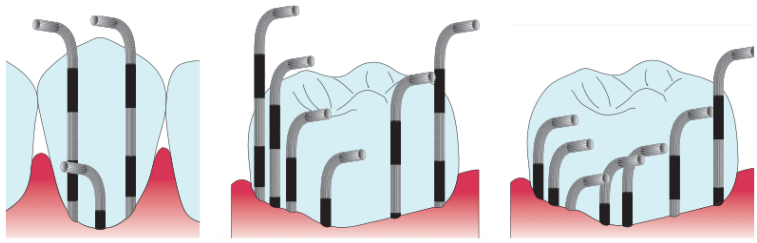


Figure 10. Classification des lésions endo-parodontales (Chicago 2018) (Herrera et al. 2018).

1.4.2. Aspects cliniques et radiologiques

Compte tenu de la grande variété de situations cliniques possibles et de l'absence de signe pathognomonique, le diagnostic de LEP est basé sur un faisceau d'éléments cliniques et paracliniques (Corbet et al. 2009 ; Dakó et al. 2020 ; Guglielmi 2021 ; Parolia et al. 2013 ; Ruetters et al. 2021). Les principaux critères rapportés dans la littérature sont résumés dans le tableau 2. Une importance particulière est accordée au sondage parodontal de proche en proche, décrit comme ponctiforme et/ou arciforme selon la présence d'une fistule desmodontale, d'une poche parodontale ou d'une LEP vraie (figure 11) (Harrington 1979). Ces éléments orientent le diagnostic différentiel mais peuvent être inconstants. En cas de fistule, l'exploration à l'aide d'un matériel radio-opaque semi-rigide (cône de gutta le plus souvent) peut permettre l'identification de la dent/racine causale sur un cliché radiographique (Dakó et al. 2020 ; Parolia et al. 2013). Le test de sensibilité ou de vitalité pulpaire, réalisé à l'aide de différents stimuli (thermiques ou électriques le plus souvent) (Sonde et Edwards 2020) est l'autre élément essentiel du diagnostic (Farughi et al. 2021 ; Neves et al. 2017 ; Roy et al. 2008) et un critère clé de décision thérapeutique. Sa fiabilité et sa reproductibilité sont cependant

variables, en particulier pour les dents pluriradiculées et les dents restaurées (Almutairi et al. 2021 ; Neves et al. 2017). Certains auteurs préconisent dans les lésions les plus sévères un traitement endodontique « préventif » quelle que soit la réponse au test, mais cette approche ne fait pas consensus (Cortellini et Tonetti 2015 ; Kwon et al. 2013).



(a) (b) (c)

Figure 11. Sondage des lésions endo-parodontales (LEP) : (a) lésion endodontique : sondage ponctiforme ; (b) lésion parodontale : sondage arciforme ; (c) LEP : sondage ponctiforme et arciforme (Harrington 1979 [*in* Rangé 2007]).

Les radiographies sont souvent indiquées pour confirmer la présence, l'étendue de la lésion endo-parodontale et l'intégrité radiculaire. Elles orientent également sur l'existence de causes iatrogènes et, en cas d'exploration de fistule, sur la dent/racine causale (Bonaccorso 2014 ; Dakó et al. 2020). La radiographie rétro-alvéolaire (RA) est l'examen de choix en première intention (Corbet et al. 2009 ; Ruetters et al. 2021). Dans les LEP, la RA met généralement en évidence une radioclarté le long de la racine, dans la furcation ou sous la forme d'une lésion infra-osseuse atteignant (ou proche de) l'apex (Dakó et al. 2020 ; Parolia et al. 2013). Certains aspects, en « doigt de gant » (J-shaped) seraient typiques de fracture radiculaire, mais sont inconstants (Moreinos et al. 2021 ; Farmakis et al. 2012).

Les radiographies 3D telles que le CBCT (cone beam computed tomography), ont été introduites pour pallier l'aspect bidimensionnel de la RA (Gbadebo et al. 2014 ; Farmakis et al. 2012). Elles offrent des informations utiles au diagnostic et à la planification thérapeutique notamment chirurgicale (Gbadebo et al. 2014). Lofthag-Hansen et al. ont comparé le CBCT à la RA pour le diagnostic de pathologies péri-apicales. Dans 32 des 46 cas (70%), le CBCT apportait des informations pertinentes supplémentaires, y compris la présence d'une communication entre le péri-apex et le parodonte marginal (Lofthag-Hansen et al. 2007). Des résultats similaires ont été rapportés par Low et al. pour les molaires maxillaires (Low et al. 2008). G et al. ont récemment comparé la fiabilité diagnostique de la RA et du CBCT à l'examen visuel direct en per-opératoire (G et al. 2021). Ils confirment la supériorité du CBCT pour la détection de résorptions radiculaires (100% contre 88%), de lésions apicales (100% contre 91%) et de communications apico-marginales (67% contre 17,7%) (G et al. 2021). Un tiers environ des communications apico-marginales restent donc indétectables, même au CBCT, et soulignent le caractère complémentaire des examens radiographiques.

Tableau 2. Éléments de diagnostic d'une lésion endo-parodontale (LEP).

	LEP avec atteinte de l'intégrité radiculaire			**LEP sans atteinte de l'intégrité radiculaire**	
	Fracture/Fêlure	**Résorption**	**Perforation**	**Patient non atteint de parodontite**	**Patient atteint de parodontite**
Douleur	Légère ou sourde à la mastication	+/ - spontanée	+/- présente	+/- présente	+/- présente
Examen clinique					
Inspection	Fêlure : micro-fracture +/- gonflement	*pink* spot si atteinte supra-gingivale	Exsudat de pus à l'endroit de la perforation +/- gonflement, abcès parodontal et inflammation chronique de la gencive	+/- gonflement, exsudat purulent et altération de la couleur de la couronne	Inflammation gingivale plaque et tarte récessions +/- gonflement, exsudat purulent et altération de la couleur de la couronne
Palpation	+/- abcès parodontal aigu		+/ - douloureuse	+/ - douloureuse	+/ - douloureuse
Percussion	+/ - douloureuse		+/ - douloureuse		+/ - douloureuse
Mobilité	+/ - mobile	+/ - mobile		+/ - mobile	Mobilité généralisée
Test de la dent fêlée (test de morsure)	Positif				+/- positif
Test de sensibilité pulpaire	+/- positif	Négatif	+/- positif	Négatif	Négatif
Sondage parodontal	Ponctiforme		Ponctiforme	Ponctiforme et arciforme	Ponctiforme et arciforme pour la LEP Arciforme sur les autres dents
Examen radiologique					
Tractus sinusal	Présent	Absent	Présent	+/- présent	+/- présent

1.5. Traitement et pronostic des lésions endo-parodontales

La plupart des données sur le traitement des LEP provient de rapports ou de séries de cas. Un essai contrôlé randomisé évalue l'efficacité de traitements complémentaires chirurgicaux (Tewari et al. 2018). Schmidt et al. ont analysé les stratégies de traitement des LEP décrites dans 5 séries de cas et 18 rapports de cas (Schmidt et al. 2014). Dans toutes les études, le traitement initial consistait en un traitement canalaire. Dans une étude sur trois environ, la décision de traitements parodontaux complémentaires dépendait de la réponse au traitement endodontique. Dans les autres, un traitement combiné endodontique et parodontal (non chirurgical et/ou chirurgical) était systématiquement réalisé. Les techniques chirurgicales comprenaient un lambeau d'assainissement seul ou combiné à des procédures régénératrices ou résectrices. Dans l'ensemble, une réduction significative de la profondeur de poche est rapportée entre 6 et 12 mois (Schmidt et al. 2014). Dans les LEP de grades 2 et 3, le traitement combiné endodontique et parodontal apparaît plus efficace que le traitement endodontique seul, en termes d'amélioration des paramètres cliniques, du gain osseux radiographique et des symptômes subjectifs (Fan et al. 2020).

1.5.1. Thérapeutiques endodontiques

Non chirurgicales

Le traitement endodontique conventionnel (orthograde) est la thérapeutique de première intention pour éliminer l'infection d'origine pulpaire et contrôler les voies de contamination endo-parodontale, afin de créer les conditions biologiques propices à la cicatrisation péri-apicale (Dioguardi et al. 2019 ; Karamifar 2020 ; Siqueira et Rôças 2013). Sa mise en œuvre repose sur les 3 principes de nettoyage, de mise en forme et d'obturation canalaire tridimensionnelle (« cleaning, shaping and sealing ») décrits par Schilder en 1974 (Schilder 1974).

Dans certaines situations, la cicatrisation parodontale partielle ou complète de la LEP est possible après le traitement endodontique seul. Haueisen et al. ont observé la fermeture de poches localisées (fistules) et des signes radiographiques de cicatrisation dans la quasi-totalité des cas traités (10 à 20 dents) après le traitement endodontique seul (Haueisen et al. 2000). Parmi les molaires traitées, deux-tiers montraient une résolution de l'atteinte de la furcation après le traitement endodontique (Haueisen et al. 2000). Ruetters et al. ont également étudié l'effet du traitement endodontique seul sur la cicatrisation parodontale de LEP de grade 3 (19 dents chez 13 patients) (Ruetters et al. 2021). Une réduction d'au moins 50% de la profondeur de poche initiale a été enregistrée au niveau de 8 dents (-3.19 ± 3.41 mm) et une amélioration du score radiologique au niveau de 5 dents à 6-12 mois.

Lorsque l'état pulpaire est incertain, l'indication du traitement endodontique est controversée. Certaines données cliniques et histologiques soutiennent que des LEP atteignant l'apex peuvent être traitées avec succès en préservant la vitalité pulpaire si l'origine parodontale de la lésion est établie (Langeland et al. 1974 ; Gold et Moskow 1987). Dans d'autres études, le traitement endodontique préventif est recommandé, pour prévenir une nécrose tardive ou secondaire à l'instrumentation de la région apicale lors de la chirurgie, qui pourrait compromettre la cicatrisation parodontale (Bender et Seltzer 1972 ; Blomlöf 1992 ; Cortellini et Tonetti 2015 ; Jansson et al. 1993a ; Kwon et al. 2013).

Chirurgicales

La chirurgie apicale est un traitement endodontique qui comprend la résection apicale et une obturation rétrograde à l'aide de différents matériaux (Del Fabbro et al. 2016 ; Abou ElReash et al. 2021). Plusieurs études soutiennent l'efficacité de ce type de procédure, couplée à une technique de régénération, dans des lésions apicales de grande taille avec une communication parodontale (lésions apico-marginales). Cependant, la présence d'une communication parodontale est considérée comme un facteur pronostic négatif dans ce type de traitement (Kim et al. 2008 ; von Arx et Alsaeed 2011).

1.5.2. Thérapeutiques parodontales

Non chirurgicales

Le traitement parodontal non-chirurgical est efficace et permet en général la fermeture de 75% des poches parodontales à 6-8 mois (Suvan et al. 2020). Cependant, moins d'un tiers des poches parodontales profondes (>7 mm) présentent une résolution complète après instrumentation sous-gingivale (Citterio et al. 2022). Ceci explique pourquoi dans des LEP, typiquement associées à des poches très profondes, des traitements chirurgicaux complémentaires sont souvent nécessaires.

Chirurgicales

Dans des LEP induites chez l'animal, les membranes résorbables, seules ou combinées à un substitut osseux, augmentent le gain osseux et la formation d'un néo-cément par rapport au lambeau d'assainissement seul (Britain et al. 2005). Les techniques de régénération apparaissent donc comme des traitements de choix dans ce type de lésions (tableaux 3 et 4). En restaurant le support parodontal, elles améliorent le pronostic de la LEP (Aksel et Serper 2014 ; Dakó et al. 2020 ; Parolia et al. 2013). Dans les études cliniques, différentes procédures de régénération tissulaire guidée (membranes), induite (amélogénines ou dérivés plaquettaires) ou par comblement osseux ont été appliquées dans

les LEP (tableau 3) (Dhiman et al. 2015 ; Goyal et al. 2011 ; Kim et al. 2008 ; Oh, et al. 2019 ; Von Arx et Bosshardt 2018). Les principes biologiques et la mise en œuvre de ces techniques ont été largement décrits dans la littérature (figure 12) (Bravard et Agossa 2021 ; Nibali et al. 2021 ; Oktawati et al. 2020 ; Trombelli et al. 2002). La plupart des études évaluant l'efficacité des traitements de régénérations dans les LEP n'ont pas de groupe contrôle (AlJasser et al. 2021 ; Dietrich et al. 2003 ; Goyal et al. 2011 ; Marín-Botero et al. 2006 ; Kim et al. 2008 ; Oh et al. 2019 ; Von Arx et Bosshardt 2018). Il est donc difficile de déterminer quelle technique est la plus efficace dans ce contexte (tableau 4).

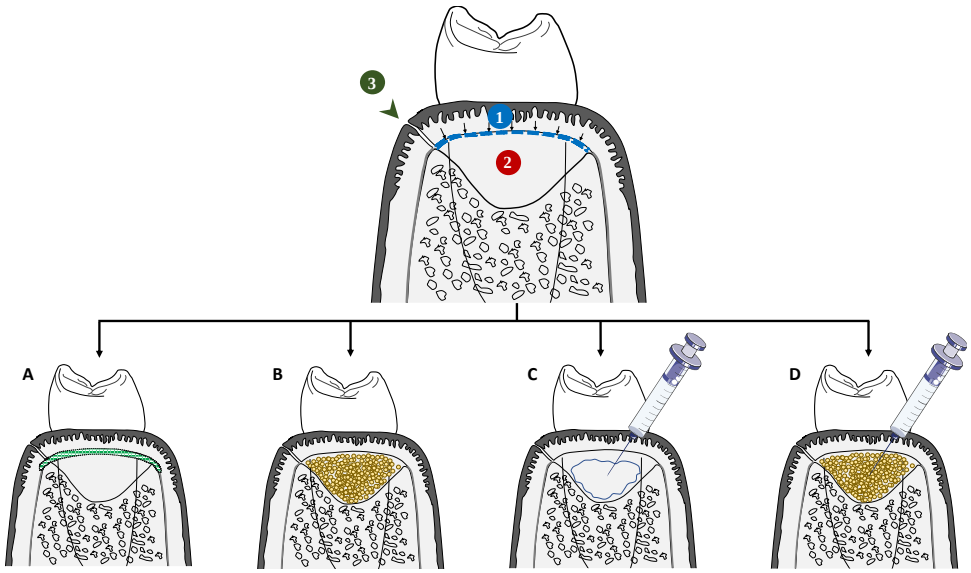


Figure 12. Prérequis biologiques à la régénération parodontale : 1) maintien d'un espace de régénération sous la papille, (2) stabilité du caillot formé dans cet espace, (3) protection du site par une fermeture de première intention du lambeau. Les stratégies pour atteindre ces objectifs sont (A) la mise en place de membranes (régénération tissulaire guidée), (B) le comblement du défaut à l'aide de substituts osseux, (C) l'application d'agents biologiques ou (D) la combinaison de différentes stratégies. (Bravard et Agossa 2021).

Le comblement osseux (xénogreffe ou allogreffe), seul ou associé à une membrane résorbable, est la stratégie de régénération la plus étudiée (Oktawati et al. 2020 ; Sánchez-Torres et al. 2014). Après traitement, une réduction de la profondeur de poche allant jusqu'à 5,8 mm à 1 an a été enregistrée (Dietrich et al. 2003). Les taux de guérison complète variaient entre 40% avec une membrane seule (Marín-Botero et al. 2006) et 90 % avec un substitut osseux allogénique (AlJasser et al. 2021). Marín-Botero et al. ont comparé l'utilisation du périoste comme « membrane autologue », à une membrane résorbable synthétique à base de polymère et ont obtenu des résultats cliniques et radiographiques comparables (Marín-Botero et al. 2006).

Quelques études ont montré des résultats probants en appliquant des matériaux bio-inducteurs tels que les protéines dérivées de l'émail et les concentrés plaquettaires (plasma riche en plaquettes [PRP] et plasma riche en fibrine [PRF]) dans les LEP. Les taux de guérison complète variaient

entre 53,33% avec le PRF (Dhiman et al. 2015), 76,47% avec l'EMD (Von Arx et Bosshardt 2018), et 83,30% avec le PRP (Goyal et al. 2011 ; Von Arx et Bosshardt 2018).

Les thérapeutiques résectrices comme l'hémisection et l'amputation radiculaire sont également efficaces pour améliorer le pronostic de molaires qui présentent une LEP (Anand et al. 2012 ; Parolia et al. 2013 ; Rotstein 2017). Les taux de survie à 10 ans atteignent 75% après résection radiculaire pour cause de fracture, et près de 92 % lorsque la cause est carieuse ou endodontique (Falabella et al. 2021).

1.5.3. Effet des adjuvants dans le traitement des lésions endo-parodontales

Le débridement mécanique est l'aspect le plus important du traitement endodontique et parodontal mais différents moyens complémentaires sont proposés pour améliorer son efficacité (Gomes et al. 2009). Le bénéfice des antibiotiques systémiques semble limité dans les LEP puisque leur utilisation n'est recommandée ni dans les lésions apicales chroniques avec fistule, ni dans les abcès aigus sans altération de l'état général (Segura-Egea et al. 2017). Une étude rapporte l'effet positif de la doxycycline à faible dose chez des patients diabétiques, comme adjuvant du traitement endodontique et parodontal non chirurgical, pour prévenir les complications sinusiennes (Zaharescu et al. 2021). Il est à noter qu'aux doses administrées, l'effet antimicrobien de la doxycycline est négligeable, mais un effet anti-inflammatoire a été démontré dans la littérature (Henehan et al. 2017).

Différents systèmes d'administration locale d'antibiotiques ont également été développés (Abbott et Salgado 2009 ; Arruda et al. 2018 ; Devaraj et al. 2016 ; Lakhani et al. 2017). Leur efficacité dans la poche parodontale est étayée par des preuves limitées (Sanz et al. 2020) et leur application intracanalaire n'est pas recommandée (Segura-Egea et al. 2017). L'effet des médications intracanalaires non antibiotiques, notamment à base d'hydroxyde de calcium et/ou d'antiseptiques, est détaillé dans une autre partie de ce travail (cf. 1.6.). Peu d'études évaluent des adjuvants non-antimicrobiens dans les LEP. Une étude a montré l'effet positif du laser diode en intracanalaire et en sous-gingival sur la réduction de la profondeur de poche (Li et al. 2012). Une autre suggère que la déminéralisation de la surface radiculaire à l'acide citrique, combinée au lambeau d'assainissement, procure un avantage potentiel en termes de gain d'attache (Hassan et al. 1986).

Tableau 3. Synthèse des matériaux de régénération utilisés dans le traitement des lésions endo-parodontales.

Matériaux de régénération	Nom commercial	Action	Études cliniques utilisant ce matériau
Membranes			
Membrane de collagène (collagène de type I et III), Origine porcine et résorbable	Bio-Gide®	Maintien de l'espace cicatriciel	Dietrich et al. (2003)
Membrane de collagène (collagène de type I), Origine animale et résorbable	Healiguide®	Maintien de l'espace cicatriciel	Goyal et al. (2011)
Membrane de polyglactine 910 (copolymère de 90% de glycolide et 10% de L-lactide) Synthétique et résorbable	Vicryl®	Maintien de l'espace cicatriciel	Marin-Botero et al. (2006)
Membrane de collagène (collagène de type I) Origine bovine et résorbable	CollaTape®	Maintien de l'espace cicatriciel	Kim et al. (2008)
Matériaux de comblement			
DBBM particulaire (minéral osseux bovin déminéralisé) Origine bovine et non résorbable	Bio-Oss®	Matériau ostéoconducteur	Dietrich et al. (2003) Oh et al. (2019)
Allogreffes d'os lyophilisé décalcifié (DFDBA) Origine humaine et non résorbable	Puros®	Matériau ostéoconducteur	AlJasser et al. (2021)
Matériaux bio-inducteur			
Plasma riche en plaquettes (PRP) Résorbable		Contient des facteurs de croissance	Goyal et al. (2011)
Plasma riche en fibrine (PRF) Résorbable		Contient des facteurs de croissance	Dhiman et al. (2015)
Protéines dérivées de la matrice amélaire (Amélogénine) Origine porcine	Emdogain®	Régénération tissulaire induite	Von Arx et Bosshardt (2018)

Tableau 4. Synthèse des études cliniques utilisant les techniques de régénération pour le traitement de lésions endo-parodontales (LEP) ; lésion apico-marginale : LEP présentant une lésion péri-apicale et parodontale concomitantes avec communication, dont l'atteinte a entrainé la destruction complète du mur osseux vestibulaire.

Auteurs	Type de lésion endo-parodontale	Nombre de défauts	Traitements réalisés	Pourcentage de guérison complète
AlJasser et al. (2021)	LEP combinée vraie	30 30	Gutta + Comblement (Puros®) MTA + Puros®	50% à 1 an 90% à 1 an
Dietrich et al. (2003)	Lésion apico-marginale	23	Comblement + Membrane (Bio-oss® + Bio-Gide ®)	83% à 6 mois
Dhiman et al. (2015)	Lésion apico-marginale	15 15	Induction (PRF) Groupe contrôle	53,33% à 1 an 53,33% à 1 an
Goyal et al. (2011)	Lésion apico-marginale	10 6 9	Membrane (Healiguide®) Induction (PRP) PRP + Membrane (CollaCote®)	70% à 1 an 83,33% à 1 an 77,78% à 1 an
Kim et al. (2008)	Lésion endo-parodontale très avancée	19	Membrane (CollaTape®)	57,89% à 1 an
Marin-Botero et al. (2006)	Lésion apico-marginale	15	Membrane (polyglactine 910)	40% à 1 an
Oh et al. (2019)	LEP grade 2-3	29 23	Comblement (Bio-Oss®) Comblement + Membrane (Bio-oss® + Bio-Gide ®)	Amélioration de tous les paramètres cliniques Δ PPP : 2,24 ±0,69 Amélioration de tous les paramètres cliniques Δ PPP : 2,12 ±0,75
Von Arx et Bosshardt (2018)	Lésion apico-marginale	17	Induction (Emdogain®)	76,47% à 1 an

MTA : « mineral trioxide aggregate» : agrégat de trioxyde minéral

1.5.4. Séquences thérapeutiques et délais de cicatrisation

Est-il préférable de différer le traitement parodontal par rapport au traitement endodontique ?

Deux essais contrôlés randomisés conduits par la même équipe ne montrent aucune différence entre un traitement parodontal, non chirurgical ou chirurgical, immédiat ou différé de 3 mois (Gupta et al. 2015 ; Tewari et al. 2018). Cependant, en cas de parodontite, la temporisation ne doit pas compromettre le pronostic parodontal global (Sonde et Edwards 2020). Il semble donc judicieux dans ces cas, d'engager au minimum la première étape du traitement parodontal (modifications comportementales, instrumentation supra gingivale), avant ou en parallèle du traitement endodontique, puis de terminer l'instrumentation sous-gingivale de la dent concernée après celui-ci (Al-Fouzan 2014 ; Raheja et al. 2014 ; Sonde et Edwards 2020).

Lorsque le traitement endodontique et le traitement parodontal sont asynchrones, quel délai est nécessaire pour réévaluer les résultats du traitement endodontique ?

La cicatrisation des lésions péri-apicales peut prendre plusieurs mois (voire années) et varier en fonction de facteurs héréditaires, environnementaux ou comportementaux (Ricucci et al. 2009 ; Holland et al. 2017). La Société Européenne d'Endodontie recommande un suivi pendant au moins 4 ans (European Society of Endodontology 2006). De même, la fermeture de la poche est un processus lent, en particulier dans les sites profonds (Citterio et al. 2022). Zehnder propose un délai minimum de 6 mois avant d'évaluer les résultats du traitement endodontique et le besoin de traitements complémentaires (Zehnder 2001). Dans la littérature, le délai moyen varie entre 3 et 12 mois (Aksel et Serper 2014 ; Alquthami et al. 2018 ; Schmidt et al. 2014). Abbot et Salgado recommandent de réaliser le traitement parodontal après la mise en place d'une médication intracanalaire temporaire, puis l'obturation définitive après réévaluation des résultats du traitement parodontal (Abbott et Salgado 2009). En conclusion, la littérature ne permet pas de dégager un consensus concernant la chronologie et les délais entre le traitement endodontique et le traitement parodontal.

1.5.5. Pronostic des lésions endo-parodontales

Facteurs pronostiques

Le pronostic des dents présentant une LEP dépend en grande partie du diagnostic étiologique et différentiel de la lésion (tableau 5). Selon Rotstein et Simon, les lésions endodontiques primaires ont le meilleur pronostic et cicatrisent généralement après le traitement endodontique seul. En revanche, les LEP vraies ont un pronostic plus réservé qui dépend de la sévérité de l'atteinte parodontale et de

la réponse au traitement (Rotstein et Simon 2004). En d'autres termes, plus la part de la lésion causée par l'infection pulpaire est importante, meilleur est le pronostic de régénération de l'appareil d'attache (Bergenholtz et Hasselgren *in* Lindhe et al. 2008). Selon Herrera et al., le pronostic des LEP d'origine traumatique ou iatrogène est en général « sans espoir », tandis que celui de LEP liées à des infections endodontiques et parodontales varie de « favorable » à « sans espoir » en fonction de l'étendue de la lésion et du statut parodontal du patient (Herrera et al. 2018). De nombreux autres facteurs pronostiques, indépendants ou associés entre eux, sont rapportés dans littérature. La plupart sont aussi des indicateurs connus de perte dentaire au cours de la maintenance parodontale (Graetz et al. 2017).

Taux de succès et de survie dentaire après traitement

Après un traitement microchirurgical, Kim et al. ont obtenu un taux de succès (absence de signes cliniques et comblement radiographique) à 5 ans de 77,5% (31/40 dents) pour les LEP contre 95,2% (141/148 dents) pour les lésions apicales isolées suggérant un effet important de la morphologie de la lésion. La plupart des échecs étaient enregistrés au cours de la première année post-opératoire (Kim et al. 2008). Cortellini rapporte 92% de succès (23 dents/25) à 5 ans, après chirurgie de régénération de dents présentant des LEP chroniques et/ou une perte d'attache atteignant ou dépassant l'apex (Cortellini 2011). Le taux de succès du traitement de LEP sans procédure de régénération concomitante est plus faible, estimé entre 27% et 37% (Dakó et al. 2020 ; Parolia et al. 2013).

Les taux de survie varient entre 92.3% à 5 ans après chirurgie de régénération (Oh et al. 2019) et de 61 à 100%, tous types de traitements confondus (Kim et al. 2008 ; Schmidt et al. 2014). Ces estimations doivent être regardées avec prudence en raison du grand nombre de rapports/séries de cas ou d'études rétrospectives, potentiellement soumises à des biais de publications (les succès seraient plus susceptibles d'être publiés) et de sélection (les dents de plus mauvais pronostic seraient plus susceptibles d'être écartées). Dans l'ensemble, le pronostic global du traitement des LEP semble favorable et oriente vers la conservation au lieu de l'extraction dans la majorité des cas.

Tableau 5. Facteurs de pronostic d'une lésion endo-parodontale (LEP).

Facteurs de pronostic	Conséquences	Références
Facteurs liés au patient et au praticien		
Tabac	Pronostics parodontal (OR = 5,18 ; IC 95% = 1.14 - 23.63) et endodontique défavorables	Fan et al. 2020 ; Shao et al. 2018
Statut parodontal	Mauvais pronostic si parodontite, active et sévère (OR = 2,84 ; IC 95% = 1,07 – 7,52)	Fan et al. 2020 ; Herrera et al. 2018 ; Kuoch et Bonte 2020 ; Shao et al. 2018
Observance du patient	Bon contrôle de la plaque dentaire et implication du patient dans la TPS nécessaire	Abbott et Salgado 2009 ; Sonde et Edwards 2020
Compétence du clinicien	Dépistage précoce de la LEP et connaissance des options thérapeutiques disponibles car la LEP est un défi clinique impliquant une certaine expérience du praticien	Sonde et Edwards 2020 Dembowska et al. 2022
Facteurs liés à la dent		
Mobilité de la dent	Contention favorise la cicatrisation des plaies et améliore le pronostic des techniques de régénération	Oh et al 2019
Nombre de racines et atteinte de la furcation	Résultats cliniques moins favorables pour les dents pluriradiculées (OR = 2,91 ; IC 95% = 1,22 – 6,94)	Fan et al. 2020 ; Ruetters et al. 2018 ; Shao et al. 2018
	Taux de survie molaires amélioré grâce aux techniques de résection	Rotstein 2017
	Lésions inter-radiculaires (LIR) et défauts anatomiques aggravent le pronostic de la LEP	Herrera et al. 2018
Facteurs liés à la lésion		
Ancienneté de la lésion	Si ancienneté des lésions, pronostic beaucoup plus incertain	Hiatt 1977
Taille/ étendue de la lésion	Importance de la perte tissulaire (extension apicale de la lésion, perte d'attache et gravité de l'atteinte parodontale) avant le traitement, réduit le taux de succès des thérapeutiques	Abbott 1998 ; Anand et al. 2012 ; Fan et al. 2020 ; Oktawati et al. 2020 ; Parolia et al. 2013
Profondeur de la poche	Si profondeur de poche ≥ 6 mm, pronostic de guérison altéré (OR = 2,41 ; IC 95% = 1,24 – 4,65)	Fan et al. 2020 ; Shao et al. 2018
Localisation	Défauts avec localisation proximale : PPD résiduelles significativement plus élevées après 12 mois	Dietrich et al. 2003
Résorption et perforation	Diagnostic précoce (temps), petite lésion (taille) et accessibilité de la lésion (localisation) → impact positif sur le pronostic	Alhadainy 1994 ; Fuss et Trope 1996 ; Jew et al. 1982
Facteurs liés au traitement		
Matériau d'obturation	Si obturation endodontique avec le MTA : amélioration des résultats de régénération par comblement (90% *vs* 50 % avec gutta)	AlJasser et al. 2021
Matériau de régénération	Résultats avec substitut osseux allogénique (90 %) = meilleurs qu'avec membrane protéoglycane 910 (40%)	AlJasser et al. 2021 ; Marín-Botero et al. 2006
	En RTI : meilleurs résultats obtenus avec PRF (83,3%) puis EMD (76,47%) et PRP (53,33%)	Dhiman et al. 2015 ; Goyal et al. 2011 ; Von Arx et Bosshardt 2018

TPS : thérapeutique parodontale de soutien ; MTA : « mineral trioxide aggregate » : agrégat de trioxyde minéral ; PPD : profondeur de poche ; RTI : régénération tissulaire induite

1.6. Intérêt des médications intracanalaires pour le traitement des lésions endo-parodontales

Dans un canal infecté, les bactéries peuvent persister dans les ramifications canalaires et les tubules dentinaires après le débridement mécanique (Puri et Puri 2013). Les médications intracanalaires (MIC) temporaires, placées dans le canal pendant plusieurs jours, ont pour but de potentialiser l'effet de la préparation mécanique en désinfectant les zones inaccessibles à l'instrumentation (Gomes et al. 2009 ; Mohammadi et Dummer 2011). Idéalement, la MIC doit répondre au cahier des charges suivant (Fava et Saunders 1999 ; Mohammadi et Dummer 2011 ; Grossman *in* Gutmann 2016) :

(i) posséder une forte activité antimicrobienne sur les bactéries associées aux infections endodontiques,

(ii) être non toxique et non irritante pour les tissus,

(iii) favoriser (ou au moins ne pas entraver) la cicatrisation péri-apicale,

(iv) présenter une bonne stabilité en milieu aqueux et une capacité à maintenir pendant plusieurs jours une concentration efficace de principes actifs,

(v) posséder des propriétés mécaniques compatibles avec une mise en place aisée et un remplissage optimal du canal et de ses ramifications.

L'hydroxyde de calcium, la chlorhexidine et leur combinaison sont des MIC fréquemment citées dans la littérature et utilisées en pratique clinique. Différents sels métalliques ont également été proposés comme molécules antiseptiques alternatives (Halkai et al. 2018a ; Kreth et al. 2008 ; Revathi et Thambidurai 2019).

1.6.1. L'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$)

L'utilisation de l'hydroxyde de calcium en endodontie s'est très largement répandue depuis son introduction en 1920 et fait de cette MIC une référence (Gomes et Herrera 2018 ; Karamifar et al. 2020 ; Mohammadi et Dummer 2011). Son effet antimicrobien est lié à sa dissociation en ions calcium et hydroxyles en milieu aqueux, responsables d'une forte alcalinisation du milieu qui altère les protéines de la membrane bactérienne (Siqueira et Lopes 1999). Les valeurs de pH rapportées varient entre 12,5 et 12,8 (Mohammadi et Dummer 2011). Plusieurs études montrent une réduction significative de la charge bactérienne à l'intérieur de canaux remplis d'hydroxyde de calcium (Vera et al. 2012). Par sa consistance, le $Ca(OH)_2$ aurait aussi un effet de barrière physique qui prévient la recontamination bactérienne en cas de percolation (Siqueira et Lopes 1999). D'autres propriétés

biologiques intéressantes notamment anti-inflammatoires, d'inhibition de la résorption et d'induction de la minéralisation lui sont également attribuées et pourraient expliquer son effet sur la cicatrisation des lésions apicales (Leonardo et al. 2006 ; De Rossi et al. 2005). En revanche, son effet désinfectant à l'intérieur des tubules serait limité, en raison d'une neutralisation par différents composés de la dentine et de la boue dentinaire (notamment des phosphates, bicarbonates, acides et protéines) (Sayin et al. 2009 ; Parikh et al. 2019). Sa relative inefficacité sur des microorganismes tels que *E. faecalis* et *C. albicans*, persistants dans les canaux en cas d'échecs et de retraitements, est également une limite fréquemment invoquée contre cette médication mais les études sont hétérogènes sur ce point (Abbott et Salgado 2009 ; Ferguson, et al. 2002 ; Carbajal Mejía 2014).

1.6.2. Médications intracanalaires à base de chlorhexidine (CHX)

La chlorhexidine est l'antiseptique de référence en odontologie (Gomes et al. 2013). Ses propriétés antimicrobiennes, son large spectre d'action et sa toxicité faible ont motivé son usage comme médication intracanalaire (Gomes et al. 2013 ; Mohammadi et al. 2017). La chlorhexidine en solution montre une efficacité plus constante que le $Ca(OH)_2$ contre *E. faecalis* et *C. albicans*. Cet effet serait lié à l'interaction des charges positives de la CHX (molécule dicationique) avec les groupes phosphates chargés négativement des parois cellulaires bactériennes (Raheja et al. 2014). *In vitro*, la chlorhexidine semble moins inhibée par la dentine et sa structure lui permet même de se lier à l'hydroxyapatite, ce qui prolonge la durée de l'effet antimicrobien par libération lente du principe actif et améliore la désinfection des tubules (Gomes et al. 2013). En revanche, elle ne possède ni les propriétés biologiques du $Ca(OH)_2$, ni sa capacité à former une barrière physique (Gomes et al. 2006).

1.6.3. La combinaison hydroxyde de calcium – chlorhexidine

L'association de $Ca(OH)_2$ avec la CHX a pour but de combiner les avantages de ces deux molécules pour élargir le spectre d'activité de la MIC aux pathogènes peu sensibles au $Ca(OH)_2$ seul (Duque et al. 2019 ; Raheja et al. 2014). Une méta-analyse montre des résultats contrastés concernant l'effet *in vitro* ou *ex vivo* de l'addition de la CHX sur l'activité antibactérien du $Ca(OH)_2$ seul sur *E. faecalis* (Saatchi et al. 2014). Parmi 21 comparaisons analysées (9 études), 10 en sont en faveur de la combinaison $Ca(OH)_2$ + CHX, 8 ne montrent pas de différence entre $Ca(OH)_2$ + CHX et $Ca(OH)_2$ seul et 3 sont en faveur de $Ca(OH)_2$ seul. Cette hétérogénéité est révélatrice du manque de standardisation des méthodes utilisées dans les études (différences de techniques, de formulation, de concentrations, de temps de contact par exemple). Chez l'animal, la mise en place d'une MIC à base de $Ca(OH)_2$ + CHX

1% pendant 15 jours améliore la réduction de la lésion apicale par rapport au traitement en une séance, indépendamment du type d'instrumentation utilisé (De Rossi et al. 2005). Un essai clinique récent indique un léger avantage du $Ca(OH)_2$ + CHX 2% par rapport au $Ca(OH)_2$ seul en termes de pourcentage de réduction de la taille des lésions apicales à 3 mois, mais la différence observée n'est pas significative (Riaz et al. 2018).

1.6.4. Médications intracanalaires à base de sels métalliques

Différents sels métalliques possèdent des propriétés antimicrobiennes intéressantes pour lutter contre les infections buccales. Parmi ces métaux, l'argent (Ag), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), naturellement présents dans la cavité buccale à faible concentration, ont reçu une attention particulière (Ahrari et al. 2015 ; Lynch 2011). Ils ont été testés avec succès pour fonctionnaliser différents supports et matériaux, auxquels ils sont incorporés sous forme de sels, d'ions ou de nanoparticules (Afkhami et al. 2015 ; Ahrari et al. 2015 ; Charannya et al. 2018). Leur effet antimicrobien serait lié à différents mécanismes tels que l'interaction physique avec la membrane bactérienne, l'induction d'un stress oxydatif, l'altération de l'ADN (Alves et al. 2018 ; Attarilar et al. 2020 ; Lemire et al. 2013 ; Visinescu et al. 2018). Sous forme de MIC, les agents métalliques ont montré un effet antimicrobien sur des pathogènes tels que *P. gingivalis* et *E. faecalis* associées aux pathologiques endo-parodontales (Halkai et al. 2017 ; Halkai et al. 2018b). Cependant, le rapport efficacité/toxicité de ces métaux à des doses thérapeutiques est variable et freine encore leur utilisation en pratique courante (Attarilar et al. 2020 ; Charannya et al. 2018 ; Halkai et al. 2018a). Des formes innovantes de ces principes actifs ont été récemment développées en combinant les métaux à des polymères biocompatibles tels que le chitosan (CHT) ou la cyclodextrine (PCD). Ces structures sophistiquées semblent prometteuses pour améliorer la stabilité, la biodisponibilité, la biocompatibilité et la biodégradabilité des agents métalliques antiseptiques, mais leur intérêt en endodontie reste à confirmer (Carapeto et al. 2017 ; Ma et al. 2016).

1.6.5. Effet des médications intracanalaires sur la cicatrisation péri-apicale et parodontale

Données cliniques

La persistance de bactéries dans le canal augmente le risque d'échec de cicatrisation des lésions péri-apicales, tandis que l'utilisation de MIC améliore généralement la désinfection canalaire et la cicatrisation, indépendamment du type d'instrumentation et de la qualité de l'obturation

définitive (Fabricius et al. 2006). Des données émergentes suggèrent également un effet positif des MIC dans les LEP. Raheja et al. ont montré qu'une MIC pendant 14 jours avec un gel de CHX à 2% dans les canaux améliore la réduction du pourcentage de poches ≥ 5mm, 6 mois après lambeau d'assainissement (Raheja et al. 2014). Une autre étude conclut que l'obturation canalaire à l'aide du mélange minocycline + agrégat de trioxyde minéral (MTA : « mineral trioxide aggregate ») est associée à une amélioration significative des paramètres parodontaux à 2 ans, supérieure aux monothérapies (minocycline seule ou MTA seul) (Shao et al. 2018). L'application d'une MIC de $Ca(OH)_2$ pendant 30 jours entraîne une réduction des niveaux de lipopolysaccharides (LPS), MMPs, IL-1 β et TNF-α dans la poche parodontale, indépendamment du nombre de bactéries détectées dans le canal et la poche (Duque et al. 2019). Ces résultats cliniques suggèrent que les MIC exercent, à l'extérieur de la racine, un effet favorable à la cicatrisation parodontale.

Données expérimentales

Les mécanismes qui pourraient expliquer l'influence des MIC sur l'environnement parodontal font l'objet d'hypothèses, formulées à partir de données expérimentales limitées. Des études *ex vivo* ont montré des variations de pH à l'extérieur de racines obturées au $Ca(OH)_2$ (Carvalho et al. 2016 ; Chamberlain et al. 2009 ; Esberard et al. 1996 ; Miñana et al. 2001), qui peuvent s'expliquer par le passage d'ions hydroxyles à travers la paroi radiculaire. Les modèles utilisés simulent le plus souvent une diffusion via les tubules dentinaires et ne permettent pas de comparaison avec les autres voies physiologiques de communication endo-parodontale.

Deux études ont montré l'effet antimicrobien (inhibition de contact), de la paroi externe de racines contenant des MIC à base de chlorhexidine, de tétracycline ou du mélange $Ca(OH)_2$ + CHX (Silva et al. 2014 ; Gomes et al. 2009), mais pas des dents contenant une solution saline ou du $Ca(OH)_2$ seul (Gomes et al. 2009). Ces résultats suggèrent la diffusion trans-radiculaire de molécules antimicrobiennes, mais ne permettent pas de les quantifier ni d'analyser leur cinétique de libération.

Les propriétés biologiques (non antimicrobiennes) des MIC pourraient également expliquer leurs effets sur la cicatrisation. Certaines études ont montré que l'hydroxyde de calcium stimule la prolifération d'ostéoblastes, mais les effets sur la réponse biologique des autres cellules parodontales telles que les cémentoblastes ou les cellules desmodontales sont mal connues (Aguiar et al. 2015).

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Ce travail *in vitro* et *ex vivo*, s'intéresse à l'effet de médications intracanalaires sur le compartiment extra-radiculaire, pour mieux comprendre leur influence, *in vivo*, sur l'environnement parodontal. Les objectifs de l'étude sont :

- dans un premier temps, *développer des MIC combinant $Ca(OH)_2$ (MIC de référence) et chlorhexidine (antiseptique de référence), ou différentes métaux antimicrobiens (antiseptiques alternatifs).* En effet, les MIC combinées qui associent le $Ca(OH)_2$ à d'autres antiseptiques pourraient être plus efficaces que celles contenant un seul principe actif. La formulation développée devra avoir une activité antimicrobienne sur *E. faecalis* et *C. albicans*, associés aux infections endodontiques persistantes et aux échecs de traitement. Elle devra également présenter des propriétés mécaniques adaptées à une application facilitée dans le canal en pratique. Différents paramètres tels que l'injectabilité, le durcissement, le changement de masse et les propriétés rhéologiques seront étudiés. Les résultats obtenus devront permettre de mieux comprendre l'effet de la composition de la MIC sur ses performances et de sélectionner la (ou les) formulation(s) la (ou les) plus performante(s) pour la suite des expérimentations.

- dans un deuxième temps, *étudier les effets induits par la (ou les) formulation(s) optimale(s) sur les conditions physicochimiques à l'extérieur de la racine et la réponse biologique de cellules parodontales à l'aide de différents modèles in vitro et ex vivo.* En effet, des études cliniques récentes apportent des arguments en faveur d'un effet des MIC à l'extérieur de la racine, favorable à la cicatrisation parodontale, mais les mécanismes en jeu doivent être clarifiés. Différents paramètres seront étudiés tels que la diffusion à travers l'apex et les tubules dentinaire (*ex vivo*), la toxicité, le potentiel de minéralisation et les effets sur les molécules de l'inflammation (culture cellulaire *in vitro*). Les modèles utilisés devront permettre de mettre en évidence d'éventuels effets liés à la dose de principes actifs ou aux temps de contact, afin de fournir des observations qui pourront être comparées aux études antérieures. En effet, il existe une très grande hétérogénéité des conditions expérimentales décrites dans la littérature sur le sujet. Les résultats obtenus devront permettre de compléter le rationnel du recours aux MIC comme adjuvant du traitement des LEP.

3. MATERIELS ET METHODES

3.1. Développement et caractérisation d'une médication intracanalaire à base d'hydroxyde de calcium combiné à un agent antiseptique

3.1.1. Formulation de la médication

3.1.1.1. Composition des médications

L'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$) utilisé pour la préparation extemporanée se présentait sous la forme d'une poudre blanche (hidroxido de calcio [DentaFlux, Madrid, Spain]).

La chlorhexidine (CHX) utilisée dans cette étude était de la chlorhexidine digluconate sous forme de solution stock à 20% (Evonik, Hanau, Allemagne).

Les ions métalliques étudiés étaient (i) l'argent : sulfate d'argent (Ag_2SO_4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), (ii) le cuivre : sulfate de cuivre (II) anhydre ($CuSO_4$) (Alfa Aesar, Kandel, Allemagne) et (iii) le zinc : chlorure de zinc anhydre ($ZnCl_2$) (Alfa Aesar, Kandel, Allemagne).

Les polymères utilisés pour fabriquer les nanoparticules métalliques polymériques (NPMP) étaient : (i) un chitosan (CHT) de faible poids moléculaire (poids moléculaire (Mw) : 140 kg.mol-1 ; degré de désacétylation (DD) : 77%) (Sigma-Aldrich) et (ii) un polymère de cyclodextrine (PCD), issu de la β-cyclodextrine (Roquette, Kleptose®, Lestrem, France (Mw : 1135 g.mol-1 ; solubilité : 18.5 g/L dans l'eau à 25°C).

3.1.1.2. Formulation des solutions de principes actifs

Chlorhexidine

Une solution de 512 mg/L de CHX a été obtenue en diluant 1024 mg d'une poudre extraite du lyophilisat de la solution de CHX digluconate à 20%, dans 100 mL d'eau distillée (ED).

Les autres solutions de CHX ont été obtenues par dilution de la solution stock de CHX à 20% dans de l'eau distillée stérile (ED), afin d'obtenir les concentrations souhaitées.

Ions métalliques

Une solution pour chaque ion métallique a été préparée par dissolution de 640 mg de poudre métallique (Ag_2SO_4, $CuSO_4$, ou $ZnCl_2$) dans des fioles jaugées contenant 100 mL d'eau ultrapure. Les solutions obtenues contenaient 6400 mg/L d'argent (Ag^+), de cuivre (Cu^{2+}) ou de zinc (Zn^{2+}). Les différentes concentrations de liquides étaient obtenues par dilution en série à partir de ces solutions d'antimicrobiens, dans de l'eau ultrapure.

Nanoparticules métalliques de polymère

- Nanoparticules métalliques de chitosan (CHT/NPM) :

Dans un premier temps, une solution de CHT (0,5%) a été préparée en diluant 500 mg de CHT dans une solution d'acide lactique 1% (VWR, Fontenay Sous-Bois, France). Après agitation à 50 rpm (GLF 3033 ; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Allemagne), à température ambiante, pendant 24 h, la solution de CHT est devenue homogène.

Ensuite, 640 mg de Ag_2SO_4, $CuSO_4$, ou $ZnCl_2$ ont été ajoutés à chaque fiole volumétrique de 100 mL. Le tout a été maintenu sous agitation pendant 24 h à 70°C dans l'obscurité. Cent mL de solution de NPMP d'argent, de cuivre et de zinc à 3200 mg/L ont été obtenus et appelés respectivement CHT/Ag, CHT/Cu et CHT/Zn (Mogrovejo-Valdivia et al. 2019 ; Carapeto et al. 2017). Les différentes concentrations de liquides étaient obtenues par dilution en série à partir de ces solutions d'antimicrobiens, dans de l'eau ultrapure.

- Nanoparticules métalliques de polymère de cyclodextrine (PCD/NPM) :

Le polymère de cyclodextrine (PCD) a été synthétisé par solubilisation de β-cyclodextrine dans l'acide citrique (CTR, Saint-Quentin Fallavier, France) et l'hypophosphite de sodium (NaH_2PO_4, Saint-Quentin Fallavier, France), dans des rapports de poids respectifs de 10 g /10 g /3 g dans 100 mL d'eau. Après élimination de l'eau, le mélange solide a été durci à 140°C pendant 30 minutes sous vide, puis 200 mL d'eau distillée ont été ajoutées. La suspension résultante a ensuite été filtrée et le filtrat a été dialysé pendant 72 h à l'aide de membranes de 6 kDa à 8 kDa (Spectrapor 1, Spectrumlabs). Enfin, le PCD anionique soluble dans l'eau a été obtenu par lyophilisation. Le polymère contenait 50 % en poids de β-cyclodextrine, 4 mmol/g de groupes -COOH et sa masse moléculaire était de 20 000 g/mol (mesurée par chromatographie d'exclusion de taille combinée à la diffusion de la lumière sous plusieurs angles SEC-MALS).

Une poudre de ce PCD a été utilisée pour préparer les solutions aqueuses de NPMP. Chaque solution de PCD à 0,3 % a été préparée dans des fioles volumétriques de 100 mL, en diluant 300 mg de poudre dans de l'eau ultrapure. Puis, le mélange a été agitée pendant une nuit (50 rpm) , à température ambiante.

Ensuite, 640 mg de chaque agent métallique (argent, cuivre ou zinc) ont été ajoutés à chaque fiole jaugée qui ont été maintenues sous agitation pendant 24 h à 70°C dans l'obscurité, afin d'obtenir des solutions de NPMP d'argent, de cuivre et de zinc appelés respectivement PCD/Ag, PCD/Cu et PCD/Zn à 3200 mg/L (Mogrovejo-Valdivia et al. 2019 ; Carapeto et al. 2017). Les différentes concentrations de liquides étaient obtenues par dilution en série à partir de ces solutions d'antimicrobiens, dans de l'eau ultrapure.

3.1.1.3. Préparation des échantillons de médications intracanalaires

Le ratio liquide/poudre permettant d'obtenir une texture optimale a été déterminé au préalable. Trois formulations de $Ca(OH)_2$ correspondant à 3 ratios liquide/poudre (l / p : 50 : 50 ; 30 : 70 ; 70 : 30) ont été préparées avec la poudre de $Ca(OH)_2$ et l'ED. L'injectabilité, la cinétique de prise et la variation de masse de ces formulations ont été comparées à une formulation du commerce prête à l'emploi : le Calasept®. Le ratio liquide/poudre qui présentait la consistance la plus adaptée à un usage clinique a été retenu et utilisé pour la formulation des pâtes nécessaires aux différents tests réalisés.

Les formulations tests étaient obtenues en remplaçant l'ED par les diverses solutions antimicrobiennes préparées (cf. 3.1.1.2.) selon le ratio retenu. Les pâtes de $Ca(OH)_2$ obtenues résultaient du mélange de la poudre de $Ca(OH)_2$ aux liquides suivant, à différentes concentrations :

- eau distillée : groupe témoin : $Ca(OH)_2$
- cuivre en solution : (i) ionique (Cu^{2+}), (ii) de nanoparticules métalliques (NPM) de CHT (CHT/Cu) ; (iii) de NPM de PCD (PCD/Cu)
- zinc en solution : (i) ionique (Zn^{2+}), (ii) de NPM de CHT (CHT/Zn) ; (iii) de NPM de PCD (PCD/Zn)
- argent en solution : (i) ionique (Ag^{+}), (ii) de NPM de CHT (CHT/Ag) ; (iii) de NPM de PCD (PCD/Ag)
- chlorhexidine en solution (CHX)

Le temps de spatulation pour tous les tests était de 45 secondes à température ambiante, sur une plaque de verre, à l'aide d'une spatule à ciment.

3.1.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne

3.1.2.1. Milieux et réactifs

Les milieux de culture bactérienne étaient les milieux Mueller Hinton (MH) (Oxoid®, Basingtoke, UK), Brain Heart (BH) (Oxoid, Basingtoke, UK), Mueller Hinton Agar (MHA) composé de MH (Oxoid®, Basingtoke, UK) et de 1,5% agar (Becton-Dickinson®, Le Pont de Claix, France) et Columbia Cystéiné (CC) (Oxoid®, Basingstoke, UK). Le milieu CC était +/- enrichi avec du sang de cheval défibriné (E&O Laboratoire, Burnhouse, UK). Le milieu de dilution bactérienne était le Ringer Cystéiné (RC) (Oxoid®, Basingtoke, UK).

3.1.2.2. Sélection et préparation des souches microbiennes

Les souches suivantes ont été utilisées dans cette étude :

- *E. faecalis* (C159-6), une bactérie Gram positive anaérobie facultative issue de collections du

laboratoire (isolées de prélèvements cliniques),

- *C. albicans* (ATCC 10231), une levure issue d'une collection de référence,
- *P. gingivalis* (W83), une bactérie parodonthopathogène Gram négative anaérobie, issue d'une collection du laboratoire.

Les souches ont été cultivées dans le MH ou le BH, diluées dans le RC et ensemencées sur des géloses de MHA ou de CC enrichie en sang (CS).

La pureté des souches a été contrôlée par une coloration de Gram, puis par une analyse morphologique au microscope optique et enfin par une spectrométrie de masse MALDI-TOF (Microflex, Brukker Daltonics, Wissembourg, France).

3.1.2.3. Susceptibilité antimicrobienne

La susceptibilité antimicrobienne a été déterminée par la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB) des agents antimicrobiens, face aux bactéries étudiées selon les protocoles standard (Clinical and Laboratory Standard Institute protocols CLSI M26-A), par micro-dilution en série dans des plaques de 24 puits (ClearLine., 131020C, Brumath, France) (Abedini et al. 2014 ; Freire et al. 2016 ; Li et al. 2021). Les souches ont été repiquées 24 à 72h avant le test pour obtenir un inoculum dont la charge bactérienne était comprise entre 10^4 et 10^6 unités formant colonie par millilitre (UFC/mL). Un gradient de concentrations croissantes de l'agent antimicrobien a été réalisé à partir des solutions fabriquées (Ag^+, Cu^{2+}, Zn^{2+} ; CHX ; CHT/Ag, CHT/Cu et CHT/Zn ; PCD/Ag, PCD/Cu et PCD/Zn ; [cf. 3.1.1.2.]). Les concentrations des agents testés étaient comprises entre 1 et 512 µg/mL pour l'argent et la CHX et entre 300 à 3200 µg/mL pour le cuivre et le zinc.

Le milieu de culture (1600 µL) a été déposé au fond du puits. Le principe actif (200 µL de solution) a ensuite été ajouté, puis, 200 µL d'inoculum bactérien y ont été ensemencés. Les cultures ont été réalisées à 37°C. Contrairement aux deux autres souches, *P. gingivalis* a été placé dans une jarre d'anaérobiose contenant un sac catalyseur (AnaeroGen, Sigma) pour générer une atmosphère anaérobie stricte. La CMI était la plus faible concentration de principe actif pour laquelle aucune croissance bactérienne n'était visible à l'œil nu (absence de turbidité) après 24 à 48 h de culture à 37°C.

Pour déterminer la CMB, le contenu des puits limpides (100 µL) a été ensemencé sur une gélose de MHA ou de CS. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicata.

Une première sélection d'agents antibactériens a ainsi été faite à partir des CMI et des CMB : les molécules et les formes ayant les CMI et CMB les plus faibles ont été sélectionnées pour les tests suivants.

3.1.2.4. Cinétique de bactéricidie (« kill-time ») en culture mono-espèce

Pour le test de « kill-time », 1 mL de chaque formulation a été injectée au fond d'un tube Falcon de 15 mL (Greiner, Courtaboeuf, France), recouverte de 8 mL de milieu de culture MH ou BH selon la souche. Ensuite, chaque solution a été ensemencée avec 1 mL d'inoculum bactérien, dilué à une concentration d'environ 10^6 UFC/mL. Les tubes ont été incubés en anaérobiose ou en aérobiose selon les souches, à 37°C sous agitation (50 rpm). Des prélèvements ont été effectués à T0, 2 h, 4 h, 6 h et 24 h. Ils ont été dilués puis ensemencés sur des géloses MHA ou CS, incubés pendant 24 h à 5 jours à 37°C puis dénombrés afin d'estimer la charge bactérienne aux temps définis. La fenêtre de lecture était comprise entre 15 et 150 colonies (Abedini et al. 2014 ; Sy et al. 2020). Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicata.

3.1.2.5. Activité anti-biofilm

Activité antimicrobienne sur un biofilm en formation

Pour étudier l'effet antimicrobien de l'hydroxyde de calcium sur la formation d'un biofilm d'*E. faecalis*, la croissance de ce dernier a été évaluée chaque semaine pendant quatre semaines (Bago Jurič et al. 2016 ; Raoof et al. 2019).

- Mise en contact de la formulation avec le biofilm

Tout d'abord, 300 µL de chaque formulation ont été déposés dans les puits de quatre microplaques (une pour chaque semaine) de 24 puits à fond plat. Ensuite, le milieu MH a été ajouté (1400 µL/puits). Puis, les microplaques ont été inoculées avec 300 µL de culture bactérienne (*E. faecalis*) par puits à une concentration de 10^6 UFC/mL, suivi d'une incubation à 37°C en condition anaérobie pendant trois semaines. Pour les contrôles négatifs correspondant aux puits sans bactérie, la formulation de $Ca(OH)_2$ a été directement placée au fond du puits et le milieu ajouté (1700 µL/puits). Les contrôles positifs correspondaient aux puits avec les bactéries (300 µL/puits) et le milieu (1700 µL/puits). Le milieu a été changé tous les 3-4 jours.

- Quantification des biofilms

Après une, deux, trois ou quatre semaines de culture, le contenu de chaque puits a été mélangé, puis 300 µL y ont été prélevés avec une micropipette. Cent µL du contenu ont été placés sur le gel d'agarose MHA de la boîte de Pétri et 200 µL du même prélèvement a été placé dans un bouillon de BH pour la culture. Le bouillon et la boîte de Pétri ont ensuite été incubés à 37 °C. Après 24-48 h, les colonies de micro-organismes incubées sur les boîtes de Pétri de gélose MHA ont été comptées

pour évaluer la viabilité. La turbidité des tubes de bouillon de BH pendant la période d'incubation indiquait une croissance bactérienne. La pureté des souches des géloses et des bouillons a été vérifiées à chaque semaine.

Activité antimicrobienne sur un biofilm mature

Pour étudier l'effet antimicrobien de l'hydroxyde de calcium contre le biofilm d'*E. faecalis*, les formulations de $Ca(OH)_2$ ont été ajoutées après trois semaines de croissance du biofilm bactérien (Bago Jurič et al. 2016).

- Création d'un biofilm bactérien

Du milieu MH a été ajouté (1700 µL/puits) dans des microplaques de 24 puits à fond plat ayant un volume total de 2 mL par puits. Les milieux MH ont été inoculés avec 300 µL de culture bactérienne (*E. faecalis*) par puits à une concentration de 10^6 bactéries par mL, suivie d'une incubation à 37°C en condition anaérobie pendant trois semaines pour permettre la fixation des bactéries. Les contrôles négatifs (puits sans bactéries) contenaient seulement du milieu (2000 µL/puits). Les contrôles positifs contenaient 300 µL/puits de bactéries et 1700 µL /puits de milieu. Le milieu a été rafraîchi tous les 3-4 jours.

- Mise en contact de la formulation avec le biofilm

Après la formation du biofilm (trois semaines), le milieu de chaque puits a été complètement retiré. L'agent antimicrobien (300 µL) a été ajouté au puits correspondant avec le milieu MH (1700 µL) et incubé à 37°C en condition anaérobie pendant une semaine.

- Quantification des biofilms

Après une semaine, 300 µL du mélange ont été prélevés avec une micropipette. Cent µL du contenu ont été placés sur la boîte de Pétri de gel d'agarose MHA et 200 µL du même prélèvement ont été placés dans un bouillon de BH pour la culture. Le bouillon et la gélose ont ensuite été incubés à 37°C. Après 24-48 h d'incubation sur les plaques agar MHA, les colonies de micro-organismes ont été comptées pour évaluer la viabilité. La turbidité du bouillon de BH des tubes pendant la période d'incubation indiquait la croissance bactérienne. La pureté des souches des géloses et des bouillons a été vérifiées.

3.1.3. Évaluation des propriétés mécaniques

3.1.3.1. Instruments et techniques de mesure

L'évaluation des propriétés mécaniques a nécessité l'utilisation de seringues Injekt® de 5 mL (B. Braun Medical, Boulogne Billancourt, France), d'aiguille Fine-ject® (Henke-Sass Wolf, Göttingen, Allemagne), d'un agitateur (GLF 3033 ; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Allemagne) d'un analyseur de texture (TA''XT.Plus ; Stable Micro Systems, Surrey, UK) et d'une balance de précision (Precisa 120A ; PAG Oerlikon AG, Zürich, Swiss).

Les propriétés rhéologiques ont été évaluées à l'aide d'un rhéomètre compact modulaire contrôlé par la contrainte (MCR 301 : Anton Paar, Les Ulis, France) présentant une géométrie à plaques parallèles (diamètre de 25 mm) et un dispositif de température à plaque Peltier (HPTD200, Anton Paar) pour contrôler la température (figure 13).

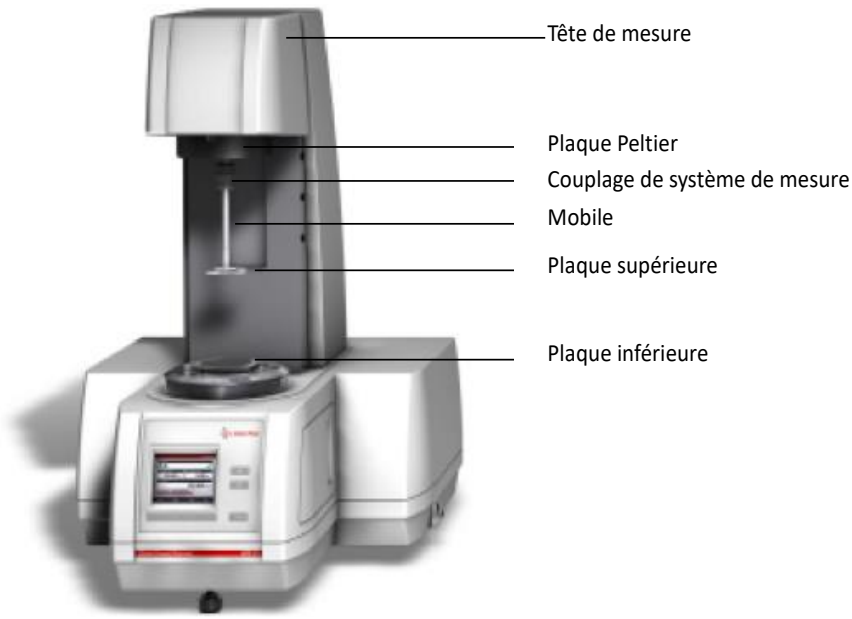


Figure 13. Exemple de rhéomètre similaire à celui utilisé dans ce travail : il est relié à un ordinateur pour le traitement des données (d'après Anton-Paar).

3.1.3.2. Injectabilité

La seringue a été remplie avec 1,5 mL de formulation et fixée sur le support de l'analyseur de texture en mode compression avec une cellule de 50 kg. La sonde cylindrique (6 mm de diamètre), reliée au bras mobile de l'analyseur de texture, comprimait le piston de la seringue de haut en bas à une vitesse constante de 1 mm/s sur une distance de 5 mm (Winkler et Margerison 2012). Le test a été réalisé en triplicata en changeant l'aiguille entre chaque test et de seringue entre chaque condition.

3.1.3.3. Cinétique de durcissement

Pour étudier le « profil de durcissement », un test de pénétration répété à différents temps (t0 ; t=15mn ; t=30mn ; t=60mn et t=24h) a été réalisé selon une méthode décrite préalablement (Agossa et al. 2017). Brièvement, un gel d'agarose (0,6% w/v) a été préparé dans des boîtes de Pétri en verre (diamètre = 9 mm). Au centre du gel, des puits cylindriques (diamètre = 6 mm) ont été réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur puis remplis de 0,2 mL de formulation. Les boîtes ont ensuite été incubées aux temps prédéfinis (t15 ; t30 ; t60 ou t24h) sous agitation à 80 rpm. Au temps défini, une sonde sphérique (diamètre = 5 mm) de l'analyseur de texture (cellule de calibration : 1 kg) a été amenée au contact de la formulation pour s'enfoncer jusqu'à 50% de la hauteur de l'échantillon à une vitesse constante (1 mm/s). Tous les tests ont été réalisés en triplicata à température ambiante (figure 14).

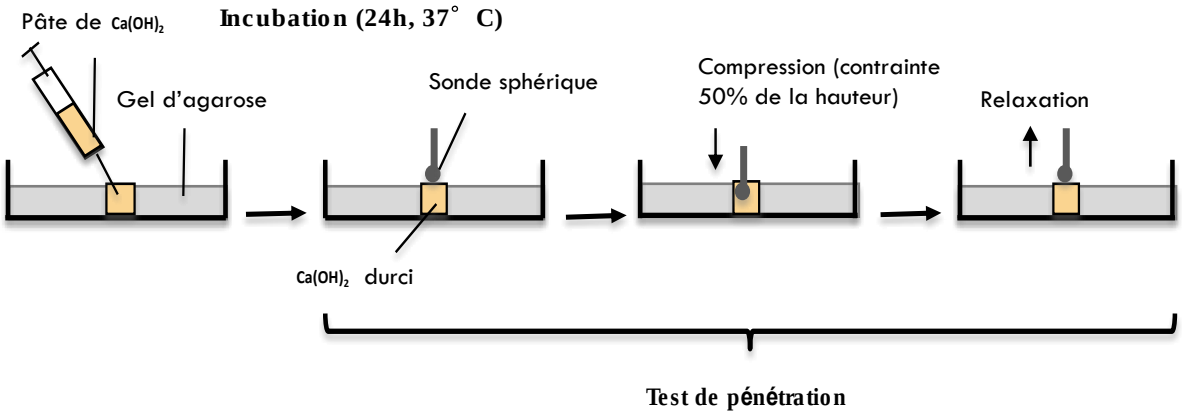


Figure 14. Étude du « profil de durcissement » : protocole utilisé pour le test de pénétration

3.1.3.4. Variations de masse en milieu aqueux

La variation de masse au cours du temps a été mesurée quotidiennement pendant 7 jours. Cinquante µL de formulation ont été injectés dans un tube Eppendorf® puis recouverts de 1 mL d'ED. Chaque jour, à un temps défini, le surnageant a été prélevé et la pesée réalisée. Le changement de masse (%) au temps t a été calculé, comme décrit précédemment (Lizambard et al. 2019), en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Changement de masse } (\%)(t) = 100.\frac{masse\ (t) - masse(t=0)}{masse\ (t=0)}$$

où la masse (t = 0) est le poids initial de la formulation de $Ca(OH)_2$ utilisée. Toutes les manipulations ont été réalisées en triplicata.

3.1.3.5. Analyse des propriétés rhéologiques

Les échantillons de pâtes $Ca(OH)_2$ ont été placés sur la plaque inférieure du rhéomètre immédiatement après spatulation de la formulation sur la plaque de verre. La plaque supérieure a été placée en position de mesure, l'écart entre les 2 plaques a été fixé à 1 mm, et l'excès d'échantillon a été rogné à l'aide d'une spatule. Un essai préliminaire a été réalisé afin d'analyser le modèle de prise, de déterminer les réglages du rhéomètre (amplitude de déformation et fréquence angulaire) et la méthode d'analyse des données.

Balayage en fréquence et en amplitude

Les tests en balayage de fréquence déterminant G' et G'' à une déformation constante de 0,01% et les essais de balayage en amplitude déterminant G' et G'' à une déformation de cisaillement différente ont été réalisés pour déterminer les paramètres de rhéologie. Il s'agit d'un préliminaire réalisé pour chaque produit afin d'analyser le schéma de prise et de déterminer les réglages du rhéomètre ainsi que la méthode d'analyse des données.

Essais viscoélastiques

L'évolution des paramètres dans le temps a été évaluée pendant 10 minutes en fonction de la fréquence et de la déformation préalablement déterminées. Les modules de stockage et de perte (G' et G'') ont été déterminés à une vitesse constante de 300 s^{-1} et à une température fixe de 25°C, en mode oscillatoire. Les mesures ont commencé 1,5 min après le mélange initial, afin de normaliser les tests pour qu'ils se produisent tous de manière similaire. Trois tests ont été effectués pour chaque groupe. Enfin, l'évolution de la viscosité en fonction de la contrainte exercée (γ, 1/s) a été mesurée pour chaque formulation étudiée (de Freitas et al. 2020).

3.2. Effets des médications intracanalaires sur le milieu extra-radiculaire et la réponse biologique de cellules parodontales

3.2.1. Diffusion trans-radiculaire de composés actifs

3.2.1.1. Médications, milieux et réactifs

Le $Ca(OH)_2$ servant à la préparation extemporanée se présentait sous la forme d'une poudre blanche (hidroxido de calcio [DentaFlux, Madrid, Spain]). La chlorhexidine (CHX) utilisée dans cette partie était de la chlorhexidine digluconate 1% obtenu à partir de la solution stock à 20% (Evonik, Hanau, Allemagne).

Durant différentes étapes de préparation, la chloramine-T à 0,5% (Sigma-Aldrich®, Saint-Louis, Missouri, États-Unis), une solution saline stérile (chlorure de sodium à 0,9%, laboratoires Gilbert, Paris, France), de l'hypochlorite de sodium à 2,5% (laboratoire Oxena, Coldis, Entraigues-Sur-La-Sorgue, France), une poudre d'EDTA (Progil, Prolabo, Lyon, France) et de l'eau déionisée (Fisher Bioreagents™, Thermofisher, Strasbourg, France) ont été nécessaires.

Un disque (MetaServ® 250 Grinder-Polisher, Buehler, Uzwil, Suisse) a été utilisé pour la préparation des dents.

3.2.1.2. Modèle de diffusion

Soixante dents monoradiculés, dont la racine mesurait environ 15 mm de long et extraites pour diverses raisons, ont été sélectionnées. Conformément à la législation française, le consentement éclairé des patients a été obtenu à l'Université de Lyon 1 - Hospices civils de Lyon (HCL), France. Les dents ont été soumises à un examen radiographique mésio-distal et vestibulo-palatin pour vérifier la présence d'un canal radiculaire unique, l'absence de tout signe de calcification locale ou étendue, de résorption interne ou de traitement endodontique antérieur (Carvalho et al. 2016).

Après avoir retiré la matière organique de la surface de la racine, elles ont été conservées une semaine dans la chloramine-T à 0,5% pour la désinfection. Une fois désinfectées, les dents ont été conservées dans une solution saline stérile dans un réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation (Carvalho et al. 2016). Les couronnes dentaires ont été découpées par un disque dont la vitesse était réglée à 450 rpm et les longueurs des racines ont été standardisées entre 11 et 12 mm (Carvalho et al. 2016 ; Chamberlain et al. 2009) (figure 15).

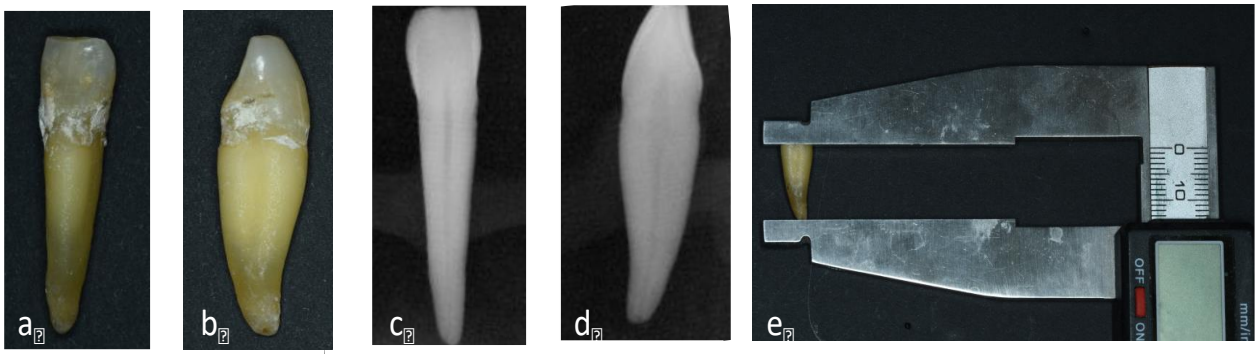


Figure 15. Protocole de fabrication du modèle de diffusion avant la préparation chimio-mécanique : (a) vue vestibulaire de l'incisive (IC) ; (b) vue mésial de l'IC ; (c) radiographie mésio-distale de l'IC ; (d) radiographie vestibulo-palatine de l'IC ; (e) mesure de la longueur de la racine après découpe par disque.

La longueur de travail a été déterminée à l'aide d'une lime 15 (Carvalho et al. 2016 ; Lima et al. 2019 ; Yazdanpanahi et al. 2021) qui a été insérée afin de dépasser de l'apex avant que 1 mm de la longueur obtenue ne soit retiré (Yazdanpanahi et al. 2021). Elles étaient comprises entre 10,5 mm et

12 mm pour toutes les dents. Les canaux ont été préparés par instrumentation rotative à l'aide du système ProTaper à lames multiples conventionnel (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suisse), jusqu'à une lime apicale maîtresse de taille F3 (taille 30, conicité 0,05) (Forghani et al. 2014). Entre chaque instrument, les canaux ont été irrigués avec 2,5 mL de solution d'hypochlorite de sodium à 2, 5%, contenu dans une seringue Injekt® de 5 mL (B. Braun Medical, Boulogne Billancourt, France) et à l'aide d'une aiguille de 27 Gauge Fine-ject® (Henke-Sass Wolf, Göttingen, Allemagne) (Eftekhar et al. 2014 ; Lima et al. 2019). La couche de « *smear* » a été éliminée en irriguant le canal, pendant 1 minute, avec 5 mL de solution d'EDTA à 17% (Carvalho et al. 2016 ; Forghani et al. 2014), préparée à partir de la poudre d'EDTA par dilution de 17,36 mg dans 100 mL d'ED. Ensuite un rinçage final avec l'ED (Lima et al. 2019), complété par un rinçage avec le NaOCl, ont été effectués. Les canaux ont été séchés avec des pointes de papier (Coltène/Whaledent, Le Mans, France) et les surfaces externes avec un papier-filtre (Carvalho et al. 2016).

La moitié des échantillons, soit 30 dents, constituait le groupe latéral (L), qui évaluait la diffusion latérale à travers les tubules dentinaires. Une cavité latérale de 1 mm de profondeur et 3 mm de diamètre a donc été réalisée dans le tiers médian de la racine de ce groupe, avec une fraise cylindrique qui marque la profondeur (Komet, Paris, France) (figure 16) (Eftekhar et al. 2014 ; Shetty et al. 2014 ; Yazdanpanahi et al. 2021). Puis, trois couches de vernis ont été appliquées sur chaque dent, y compris au niveau apical, mais sans toucher à la cavité latérale. Pour l'autre moitié des dents constituant le modèle de diffusion apicale (A), un cône de gutta a été placé dans chaque canal. Il dépassait légèrement en apical. Les couches de vernis ont été appliquées en présence de ce cône, afin de ne pas isoler la zone apicale (Shetty et al. 2014).

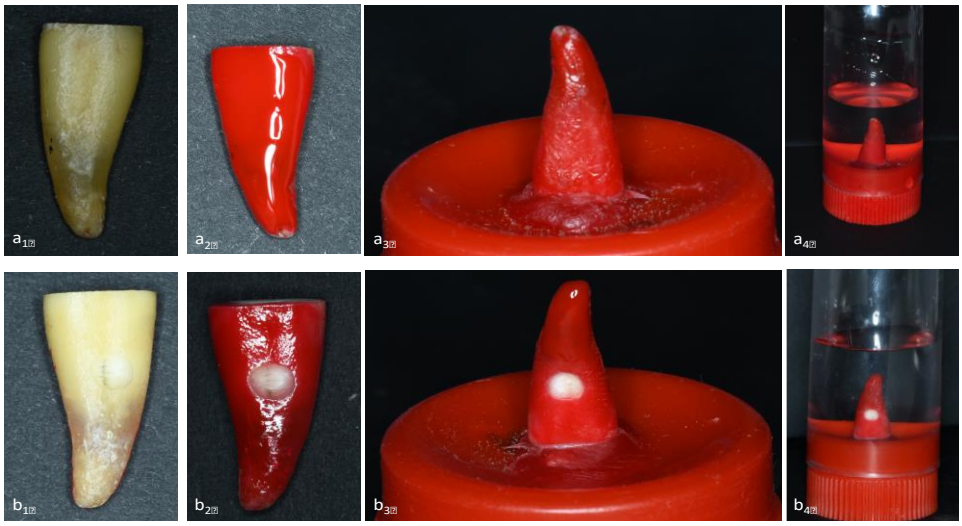


Figure 16. Protocole de fabrication du modèle de diffusion sur une incisive (IC) suite à la préparation chimio-mécanique : (a_1 et b_1) vues vestibulo-palatines (a_1) pour la diffusion apicale et (b_1) pour la diffusion latérale suite à la préparation de la cavité ; puis (a_2 et b_2) suite à l'application du vernis ; suivit de (a_3 et b_3) la fixation des racines sur le bouchon du flacon ; avant (a_4 et b_4) l'immersion dans 10 mL d'eau déionisée et l'incubation à 37°C sous une atmosphère humide.

Chaque groupe de diffusion apicale (A) et latérale (L) a été divisé en 3 groupes : (i) le groupe $Ca(OH)_2$ contenant une MIC de $Ca(OH)_2$ seul ; (ii) le groupe CHX, contenant une MIC de $Ca(OH)_2$ + une solution de CHX à 1% obtenue par dilution dans l'ED de la solution de CHX à 20% et (iii) le groupe témoin T, ne contenant aucune MIC. La MIC a été mise en place avec un lentulo (Dentsply Maillefer, Avignon France) et la partie coronaire a été condensée avec une pointe de papier (Yazdanpanahi et al. 2021).

Six groupes ont ainsi été obtenus selon le type de diffusion étudié et la MIC injectée : (i) $Ca(OH)_2$ seul en diffusion apicale ($Ca[OH]_2$ apical); (ii) $Ca(OH)_2$ seul en diffusion latérale ($Ca[OH]_2$ latéral) ; (iii) $Ca(OH)_2$ + CHX 1% en diffusion apicale (CHX apical) ; (iv) $Ca(OH)_2$ + CHX 1% en diffusion latérale (CHX latéral) ; (v) groupe témoin en diffusion apicale (T apical) ; (vi) groupe témoin en diffusion latérale (T latéral).

Ensuite, un composite (Tetric EvoFlow, Mega Dental, Crosne, France) a été placé en coronaire et de la cire collante a été ajouté sur ce composite de façon à la fixer au bouchon d'un flacon de 50 mL contenant 10 mL d'eau déionisée (figure 16 a_4 et b_4), afin de ne pas interférer avec les ions libérés depuis les tubules dentinaires ou l'apex (Carvalho et al. 2016 ; Chamberlain et al. 2009).

L'ensemble des échantillons a été incubé à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2. Aux points de temps déterminés, J7, J14, J21 et J28, le milieu de libération (eau désionisée) a été complètement renouvelé par une nouvelle solution de 10 mL (Yazdanpanahi et al. 2021).

3.2.1.3. Instruments et techniques de mesure

Les mesures de pH ont été effectuées à l'aide d'un pHmètre HI9125 (Hanna) avec une précision à 0,01.

La quantité d'ions calcium libérés dans les solutions recueillies a été mesurée par spectroscopie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (Vista-MPX CCD Simultaneous ICP-OES, Varian Inc., Palo Alto, USA), *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP-MASS).

Les quantités de CHX dans les liquides prélevés ont été déterminées par chromatographie en phase liquide haute performance (module de séparation Waters Alliance 2695, détecteur Waters 2489 UV/vis), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC-UV).

3.2.1.4. Variations du pH dans le milieu extra-radiculaire

La quantification des ions hydroxyles a été effectuée par la mesure du pH de la solution de 10 mL à différents temps : J0, J7, J14, J21 et J28 (Forghani et al. 2014 ; Yazdanpanahi et al. 2021), à raison de 3 mesures par échantillons (Shetty et al. 2014) et d'une calibration toutes les 6 mesures.

3.2.1.5. Dosage des ions calcium dans le milieu extra-radiculaire

Deux mL du milieu de libération de chaque échantillon ont été filtrés en amont avec un filtre en nylon de 0,45 m (VWR, International, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis). Les courbes d'étalonnage ont été obtenues en préparant des solutions standard de Ca^{2+} à 2, 5, 10 et 20 ppm. Puis, les mesures ont été réalisées pour différents temps : J0, J7, et J28 (Carvalho et al. 2016). Une calibration entre chaque groupe de mesures a été effectuée. Trois réplicas ont été collectés pour chaque mesure (Lizzi et al. 2020).

3.2.1.6. Dosage de la chlorhexidine dans le milieu extra-radiculaire

Deux mL du milieu de libération de chaque échantillon ont été filtrés en amont avec un filtre en nylon de 0,45 m (VWR, International, Radnor, Pennsylvanie, États-Unis). Puis, les mesures ont été réalisées avec 500 µm pour les temps J0, J7, et J28. Vingt µL d'échantillons ont été injectés dans une colonne RP C18 (Gemini-NX(C18), 250*4.6mm, 5µm ; Phenomenex, Le Pecq, France) avec un débit de 1 mL/min. La méthode de gradient suivante a été appliquée : l'éluant A : solution aqueuse contenant 0,05% d'acide trifluoroacetic, 0,05% d'acid heptafluorobutyrique et 0,1% de triéthylamine. L'éluant B était de l'acétonitrile. La composition de la phase mobile était la suivante : diffusion de l'éluant A pendant 4 min, suivi d'un mélange A : B (60 : 40), (v/v) pendant 6 min. Les temps de rétention du principe actif étaient d'environ 2,5 et 6,9 min, respectivement. La colonne a été maintenue à température ambiante et la longueur d'onde de détection était λ=260 nm (Kudo et al. 2002 ; Xue et al. 2009). Toutes les expériences ont été menées en triplicata.

3.2.2. Réponse de cellules parodontales à la stimulation par des extraits de médications intracanalaires

3.2.2.1. Médications, milieux et réactifs

Le $Ca(OH)_2$ servant à la préparation extemporanée se présentait sous la forme d'une poudre blanche (hidroxido de calcio [DentaFlux, Madrid, Spain]). La chlorhexidine (CHX) utilisée dans cette partie était de la chlorhexidine digluconate à 0,5% et à 1%. Elles étaient obtenues à partir de la solution stock à 20% (Evonik, Hanau, Allemagne).

Les milieux de culture utilisés étaient le Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco™, ThermoFisher, Strasbourg, France), le Fibroblaste Medium (FM) (ScienCell™, USA) et la solution tampon était le Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Gibco™, ThermoFisher, Strasbourg, France).

3.2.2.2. Formulation des extraits

Dans cette partie, ce sont des extraits issus des MIC qui ont étaient mis en contact avec les cellules. Les MIC utilisées pour préparer les extraits étaient : (i) le $Ca(OH)_2$ seul ($Ca[OH]_2$) ; (ii) le $Ca(OH)_2$ + une solution de la CHX à 0,5% obtenu par dilution de la solution stock de CHX à 20% ($Ca[OH]_2$ + CHX 0,5%) ; et (iii) le $Ca(OH)_2$ + une solution de la CHX à 1% obtenu par dilution de la solution stock de CHX à 20% ($Ca[OH]_2$ + CHX 1%).

Afin d'obtenir les extraits aqueux, les pâtes (1 mL) de $Ca(OH)_2$ seul, de $Ca(OH)_2$ + CHX 0,5% et de $Ca(OH)_2$ + CHX 1%, ont été injectées au fond d'un tube Falcon de 15 mL (Fisherbrand™ Thermofisher, Strasbourg, France) et recouvertes de 9 mL de milieu de culture (DMEM ou FM selon le type cellulaire étudié par la suite), sans sérum, selon les indications ISO 10993-Part 12 et ISO 10993-Part 18. L'ensemble des échantillons a ensuite été incubé à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2, pendant 24 h (Abbaszadegan et al. 2016 ; Ciapetti et al. 1998 ; Mukhtar-Fayyad 2011). Les extraits obtenus, étant issus des formulations de pâte de $Ca(OH)_2$ seul, de $Ca(OH)_2$ couplé à la CHX à 0,5% et de $Ca(OH)_2$ couplé à la CHX à 1%, ont été nommés respectivement : $Ca(OH)_2$, CHX 0,5% et CHX 1%. Ils ont été collectés et filtrés à travers un filtre stérile en polyéthersulfone de 0,45 µm (Nalgene®, Thermofisher, Strasbourg, France) (Mukhtar-Fayyad 2011 ; Peng et al. 2022 ; Scelza et al. 2012). Puis, ils ont été dilués avec du DMEM ou du FM + 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour obtenir 3 dilutions différentes : pure (dilution 1) ; 1/2 (dilution 1/2) et 1/10 (dilution 1/10) (Peng et al. 2022 ; Mukhtar-Fayyad 2011).

3.2.2.3. Culture cellulaire et protocole de stimulation

Modèles cellulaires

Les cellules étudiées étaient :

- les fibroblastes du ligament alvélo-dentaire (PDL) humains, dérivés d'une culture cellulaire primaire humaine (#2630, ScienCell, USA),
- les ostéoblastes (MG63), lignée cellulaire humaine immortalisée (MG63, CRL1427, ATCC) obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC® CRL-1427™),
- les cémentoblastes (OCM), dérivés d'une lignée cellulaire de souris immortalisées (lignée OCCM.30 mouse cementoblasts, ABM - Applied Biological Materials Inc.)

Les MG63 et les OCM ont été cultivées dans le DMEM et les PDL dans le FM. Les rinçages étaient effectués avec le PBS. Les cellules contrôles (témoins de culture ou témoin positif) étaient cultivées dans le milieu (DMEM ou FM) supplémenté par 10% de SVF, 5% de pénicilline/streptomycine et 0,2% d'amphotéricine B. Pour FM, 1% de facteurs de croissance ont également été ajoutés.

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2.

Entretien cellulaire

Les milieux ont été changés tous les 2 à 3 jours. Après avoir atteint la confluence, les cellules ont été trypsinées, remises en suspension dans le milieu de culture et observées de façon routinière sous un microscope inversé avec module à épifluorescence (CKX41, Olympus, France). Puis, elles ont été centrifugées à 1200 rpm/min pendant 5 minutes et comptées à l'aide d'un compteur cellulaire automatique (Scepter™, Millipore, USA). Après l'élimination de la trypsine, les culots cellulaires restants ont été remis en suspension dans un milieu frais.

Protocole de stimulation

La veille de chaque test, chaque population cellulaire a été ensemencée dans 200 µL de milieu d'une plaque de 96 micropuits, à une densité de 10^2 cellules/mL à $1,25.10^3$ cellules/mL selon les tests. Les plaques étaient ensuite incubées pendant 24h, à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2.

Le jour des tests, les milieux ont été retirés des plaques et remplacés par 200 µL de chaque extrait (cf. 3.2.2.2) (Peng et al. 2022 ; Mukhtar-Fayyad 2011) avant une incubation à 37°C, sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2. Le temps d'incubation était compris entre un à quatorze jours selon le test. Le milieu était renouvelé par les extraits tous les 3-4 jours. Le groupe témoins constituait les puits contenant les cellules seules. Pour chaque condition, un puits contenait uniquement les extraits. Les tests ont été effectués en triplicata.

Stimulation cellulaire par le lipopolysaccharide (LPS) de *P. gingivalis*

La stimulation par LPS a eu lieu deux jours avant le test. Les PDL ont été ensemencées dans 200 µL de milieu d'une plaque de 96 micropuits, à une densité de 10^3 cellules/mL. Les plaques étaient ensuite incubées à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2, pendant 24 h.

La veille du test, le LPS de *P. gingivalis* (Invivogen, San Diego, CA, USA) a été ajouté dans l'ensemble des puits tests à une concentration de 1 mg/mL. Les plaques ont à nouveau été incubées pendant 24h à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2 (Morand et al. 2015).

Le jour des tests, les milieux ont été retirés des plaques et remplacés par 200 µL de chaque extrait (Peng et al. 2022 ; Mukhtar-Fayyad 2011) avant une incubation pendant 24 h, à 37°C sous une atmosphère contrôlée contenant 5% de CO_2. Un groupe de cellules contrôles (groupe témoin) a été stimulé par le LPS mais n'a pas été en contact avec un extrait de MIC et un autre groupe de cellules (témoin de culture) n'a été stimulé ni par le LPS ni par les extraits.

3.2.2.4. Instruments et techniques de mesure

Un spectromètre (Infinite® M200 PRO NanoQuant, Tecan, France) a été utilisé pour l'ensemble de tests cellulaires.

3.2.2.5. Évaluation de la viabilité cellulaire

Après 1, 3 et 7 jours de contact des extraits avec les cellules, le contenu des puits a été transvasé dans une nouvelle plaque 96 puits et 20 µL de réactif de viabilité cellulaire Alamar Blue™ a été ajoutée directement dans les puits à la concentration finale de 10% v/v. Les plaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 5 h. Ce réactif contient de la résazurine, non toxique, perméable aux cellules, de couleur bleue et pratiquement non fluorescente. Elle est ensuite réduite en résorufine (composé de couleur rose, très fluorescent), lorsqu'elle entre dans les cellules vivantes et actives métaboliquement. La quantité de résorufine formée a été déterminée en mesurant l'absorbance à 570 nm avec une référence de 600 nm. Elle est proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

3.2.2.6. Évaluation du potentiel de minéralisation

L'étude du potentiel de minéralisation a été effectuée sur les cellules OCM et MG63.

Potentiel de minéralisation précoce

Le potentiel d'ostéoinduction est évalué par un test colorimétrique de l'activité de la phosphatase alcaline (ALP), un marqueur précoce de la minéralisation. Après 1 et 10 jours de culture, sa quantité extracellulaire a été estimée dans le surnageant des cellules en contact direct grâce au test du kit ALP utilisé selon les instructions du fabricant (K412-500, BioVision Incorporated, USA) et précédemment décrit (da Silva et al. 2008a ; Zhou et Xie 2021).

Succinctement, 50 µL de monophosphate de thymolphtaléine ont été mélangés à 0,5 mL de tampon diéthanolamine 0,3 mol/L, pH 10,1 et laissés pendant 2 minutes à 37°C. La solution a ensuite été ajoutée à 50 µL des lysats obtenus dans chaque puits pendant 10 minutes à 37°C. Pour le développement de la couleur, 200 µL de carbonate de sodium anhydre (Na_2CO_3) 0,09 mol/L et d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,25 mol/L ont été ajoutés. L'enzyme ALP présente dans les échantillons convertit le substrat *p*-nitrophényl phosphate (*p*NPP) en une quantité égale de *p*-nitrophénol (*p*NP) coloré. Après 60 minutes, l'absorbance a été mesurée à 405 nm, et l'activité ALP a été calculée à partir d'une courbe standard en utilisant la thymolphtaléine pour donner une gamme de 0,012- 0,4 µmol de thymolphtaléine/ h/mL.

Enfin, l'activité ALP a été calculée selon l'équation suivante :

$$\text{Activité de l'ALP} = \frac{[\text{pNP}]}{\Delta T \times V} \times D$$

avec [pNP] = la quantité de pNP en (µmol) calculée à partir de la courbe standard, ΔT = le temps de réaction (min), V = le volume initial ajouté à chaque puits et D = le facteur de dilution.

Potentiel de minéralisation cellulaire tardive : alizarine rouge (ARS)

La capacité de reminéralisation a été réalisée sur les cellules en utilisant le rouge alizarine S (ARS), comme déjà décrit (Guerreiro et al. 2021 ; Narita et al. 2010). Ce produit cible les dépôts de calcium dans la matrice extracellulaire. Les cellules ont été fixées avec 3,7% de paraformaldéhyde pendant 30 min à température ambiante, rincées au PBS, lavées à l'eau distillée et incubées avec 100 µL de 40 mM d'ARS (2% - pH 4.1 ; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 45 min à température ambiante. Un test qualitatif a pu être réalisé en observant les nodules de minéralisation au microscope optique. Les précipités inorganiques ont été semi-quantifiés en dissolvant les nodules de matrice minéralisée générés par les cellules avec 200 µL d'une solution de chlorure de cétylpyridinium (CPC) à 10% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Les valeurs de densité optique représentant la quantité relative de nodules de minéralisation ont été lues à 560 nm.

3.2.2.7. Évaluation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires

Comme évoqué précédemment, la sécrétion de TNF-α et d'IL-6 (marqueurs pro-inflammatoires) par les cellules PDL a été évaluée après infection par les LPS pendant 24 h et contact avec l'extrait de MIC 24 h. Les surnageants des puits ont été utilisés pour la quantification de ces médiateurs inflammatoires et ont été analysés par la technique ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) comme déjà décrit (Jeanneau et al. 2019 ; Morand et al. 2015). Brièvement, les cellules ont été centrifugées 10 min à 13 000 g à 4°C. Ensuite, le dosage des médiateurs a été réalisé conformément aux instructions des fabricants à l'aide des kits Human (pour PDL et MG63) ou Mouse (pour OCM) TNF-α uncoated ELISA (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, France) pour le TNF-α et Human (pour PDL et MG63) ou Mouse (pour OCM) IL-6 ELISA (Elabscience®, USA) pour l'IL-6.

L'expérience a été réalisée en triplicata et les données ont été comparées à une courbe standard. Les valeurs de densité optique ont été lues comme décrit par les fabricants avec le lecteur de microplaques à 450 nm, avec une référence à 570 nm pour les kits de TNF-α.

3.3. Analyse statistique des données

Les valeurs ont été exploitées à l'aide de Microsoft Office Excel Mac OS 2011 (version 14.4.7 [141117]). Les analyses des données ont été réalisées à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) à sens unique avec un test de répétition suivi d'un test de Tukey Kramer. Les résultats ont été rapportés sous forme d'écart-type moyen (± SD) ou d'intervalle de confiance = 95% et les significations statistiques ont été acceptées à $p < 0,05$.

4. RESULTATS

4.1. Influence de la formulation sur l'activité antimicrobienne et les propriétés mécaniques

4.1.1. Choix du ratio liquide/poudre

4.1.1.1. Effet du ratio liquide/poudre sur la texture de la pâte

Les résultats des tests d'injectabilité obtenus pour les différents ratio liquide/poudre sont présentés sur la figure 17. L'aire sous la courbe d'injectabilité variait entre 182,36 N.sec (SD ± 40,09) et 534,16 N.sec (SD ± 97,17). Plus la quantité de poudre augmentait, plus l'injectabilité était élevée.

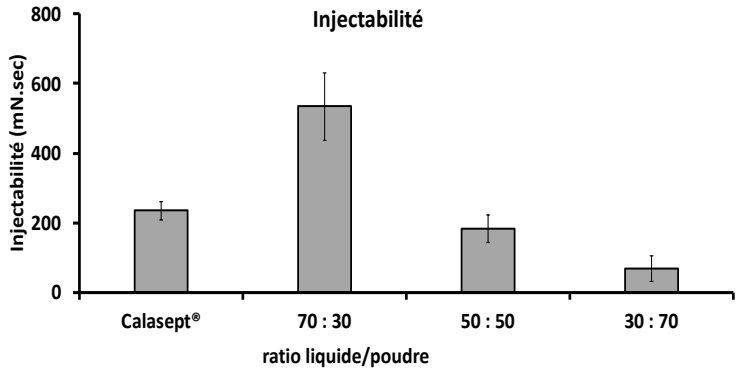
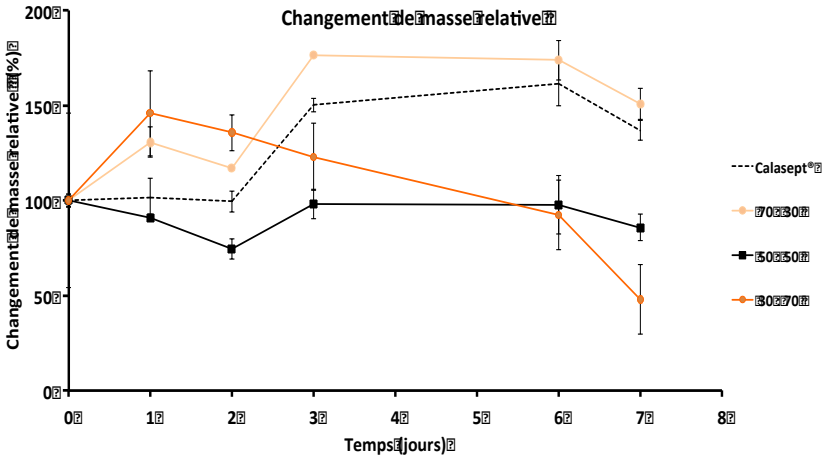


Figure 17. Injectabilité de la pâte de $Ca(OH)_2$: différents ratios liquide/poudre sont comparés au $Ca(OH)_2$ du commerce Calasept®.

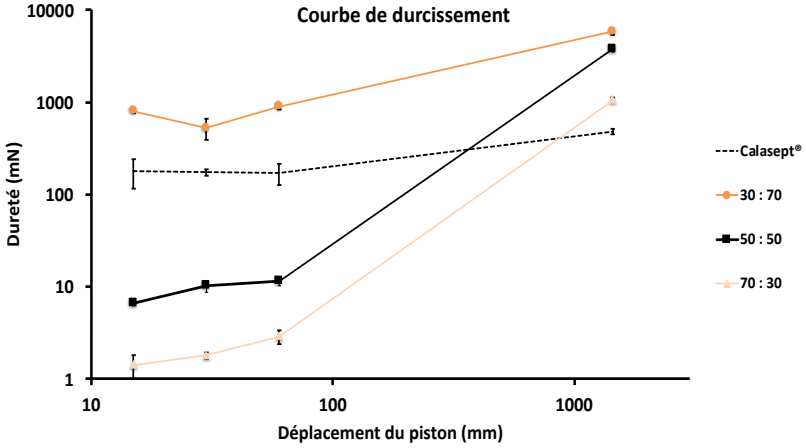
4.1.1.2. Effet du ratio liquide/poudre sur l'hydratation et le profil de durcissement

La figure 18a représente les variations de masse observés pour les différents ratios de $Ca(OH)_2$ et comparés au $Ca(OH)_2$ du commerce (Calasept®). Pour le ratio 50 : 50, la masse de la pâte était stable dans le temps. Une augmentation de la masse a été observée pour le ratio 70 : 30 et le Calasept® à partir du deuxième jour. Le ratio 30 : 70 au contraire présentait une diminution de masse continue.

La figure 18b représente la cinétique de prise des différentes formulations du présent travail. La dureté initiale mesurée pendant les temps les plus précoces dépendait de la consistance du mélange. Entre 0 et 1 h, la préparation extemporanée de ratio 30 : 70 présentait la dureté la plus élevée (entre 525 et 900 mN), tandis que le ratio 30 : 70 présentait la dureté la plus faible (entre 0,2 et 2,9 mN). La dureté de la pâte commerciale prête à l'emploi, quant à elle, était supérieure aux ratios 70 : 30 et 50 : 50. Ce produit commercial durcit peu entre 1 h et 24 h par rapport aux préparations extemporanées qui montrait peu de variation de la dureté pendant la première heure après préparation. Ensuite, la dureté des préparations extemporanées a fortement augmenté entre 1 h et 24 h en particulier pour les ratios 70 : 30 et 50 : 50.



(a)



(b)

Figure 18. Variations de masse relative (a) et durcissement (b) pour différents ratios de $Ca(OH)_2$ et une pâte commerciale prête à l'emploi (Calasept®).

Le ratio **50 : 50** présente la consistance la plus adaptée à une injection intracanalaire pour une application clinique : il a été utilisé dans la suite de ce travail.

4.1.2. Effet de l'ajout d'antiseptiques sur l'activité antimicrobienne de la médication intracanalaire

4.1.2.1. Susceptibilité antimicrobienne aux antiseptiques étudiés

Les résultats des tests de CMI et de CMB sur *C. albicans* et *E. faecalis,* pour tous les agents étudiés, sont présentés dans le tableau 6. Les différentes formes du cuivre (Cu^{2+}, CHT/Cu et PCD/Cu) et du zinc (Zn^{2+}, CHT/Zn et PCD/Zn) n'ont pas été incluses dans la gamme de concentrations choisies (CMI et CMB ≥ 3200 mg/L). Ces agents antimicrobiens n'étaient pas efficaces contre *C. albicans* et *E. faecalis,* à faible concentration, en particulier la forme CHT avec une CMB ≥ 3200 mg/L. En revanche,

les différentes formes d'argent (Ag^+, CHT/Ag, PCD/Ag) et la chlorhexidine en solution (CHX) étaient efficaces à faibles concentrations contre les deux bactéries. Pour l'argent, la CMI était comprise entre 25 et 50 mg/L et pour la CHX entre 2 mg/L contre *E. faecalis* et de 4 mg/L contre *C. albicans*.

Tableau 6. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de trois agents métalliques (le cuivre [Cu], le zinc [Zn], l'argent [Ag]) sous trois formes de solutions : solution ionique (Cu^{2+}, Zn^{2+}, Ag^+), solution de nanoparticules métalliques de chitosan (CHT/Cu, CHT/Zn, CHT/Ag) et solution de nanoparticules métalliques de polymères de cyclodextrine (PCD/Cu, PCD/Zn, PCD/Ag) ; et de la solution de chlorhexidine (CHX), contre 2 agents antibactériens : *C. albicans* et *E. faecalis*.

Antimicrobials Agents	***Candida albicans*** **CMI / CMB (mg/L)**	***Enterococcus faecalis*** **CMI / CMB (mg/L)**
Cu^{2+}	> 3200	> 3200
CHT/Cu	> 3200	> 3200
PCD/Cu	> 3200	> 3200
Zn^{2+}	3200	3200
CHT/Zn	3200 / > 3200	3200 / > 3200
PCD/Zn	3200	3200
Ag^+	50	50 / >200
CHT/Ag	25 / 50	50 / >100
PCD/Ag	25 / 50	25 / >100
CHX	4	2 / 16

Parmi les agents antimicrobiens étudiés, seul l'**argent** et la **CHX** ont été actifs à faibles concentrations, face aux antimicrobiens étudiés : ils ont été sélectionnés pour le test de « kill-time ».

4.1.2.2. Effet antibactérien des médications intracanalaires chargées en antiseptiques

Les figures 19 et 20 montrent les résultats du test de « kill-time », correspondant à l'effet des antimicrobiens testé sur les 2 pathogènes de la flore endodontique étudiés. Les pâtes de $Ca(OH)_2$ couplés aux 3 formes d'argent (Ag^+, CHT/Ag, PCD/Ag) ont été étudiées à 3 concentrations différentes comprises entre 12,5 mg/L et 100 mg/L (figures 19a, 19b, 19c, 20a, 20b et 20c). Les pâtes de $Ca(OH)_2$ couplés à la CHX ont été étudiées à 4 concentrations différents de CHX comprises entre 5.10^3 mg/L (0,5%) et 40.10^3 mg/L (4%) (figures 19d et 20d). La charge bactérienne initiale était comprise entre 5 à 7 log10 UFC/mL de *C. albicans* (figure 19) ou d'*E. faecalis* (figure 20).

Le $Ca(OH)_2$ seul (ligne pointillée) a eu un effet antimicrobien sur *C. albicans* (5 log10 de réduction de la charge bactérienne initiale au bout de 24 h), mais n'a pas affecté la croissance bactérienne d'*E. faecalis* (figures 19 et 20).

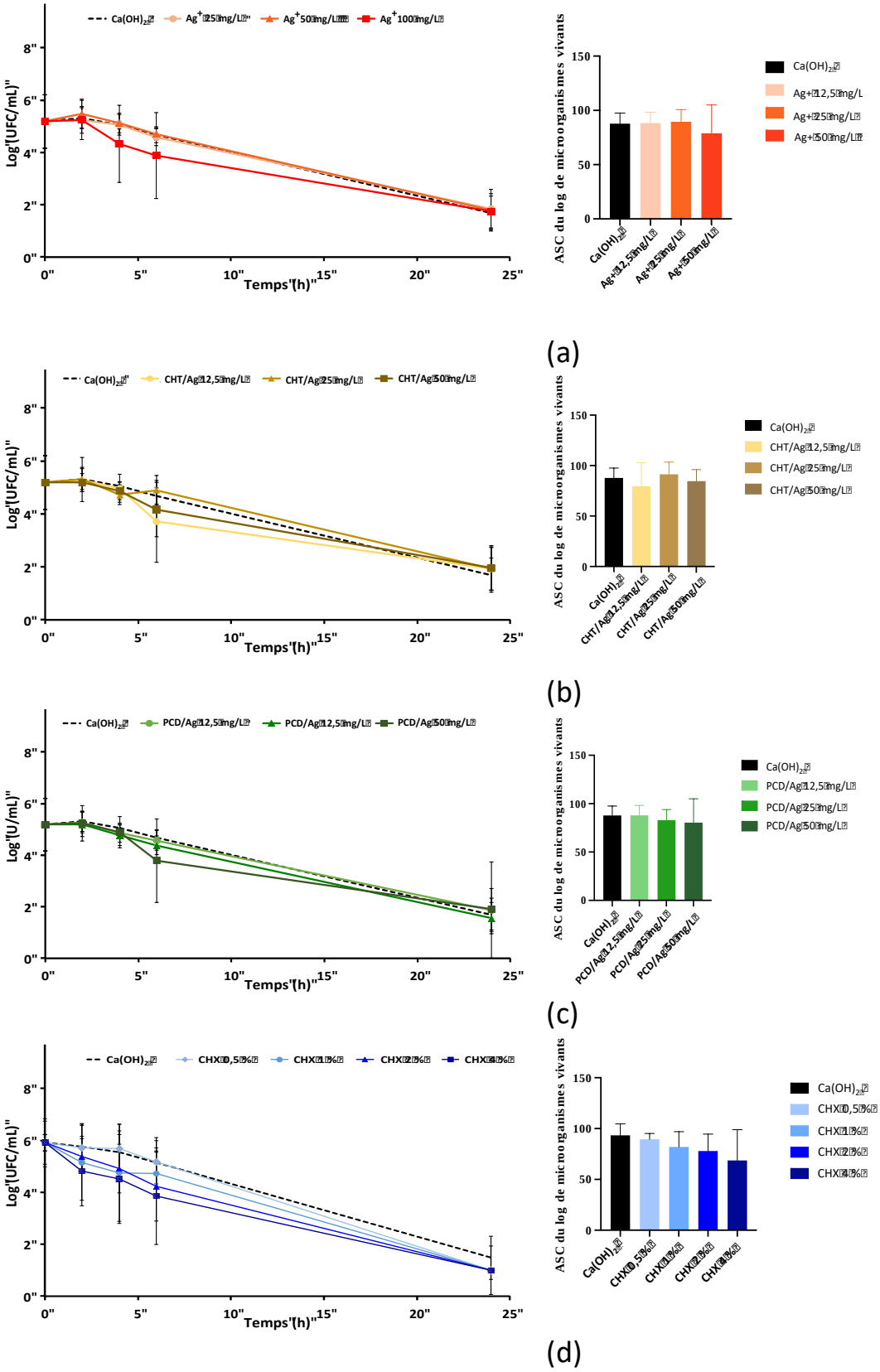


Figure 19. Cinétique de réduction bactérienne de *C. albicans* au contact de l'hydroxyde de calcium seul (Ca [OH]$_2$) et comparé à la formulation d'hydroxyde de calcium couplé à différentes concentrations : (a) d'argent en solution : (Ag+) (courbes orange) ; (b) d'argent sous forme de nanoparticules de chitosan (CHT/Ag) (courbes marron/jaunes) ; (c) d'argent sous forme de nanoparticules de polymère de cyclodextrine (PCD/Ag) (courbes vertes), (d) de chlorhexidine en solution (courbes bleues) ; à gauche les courbes du log10 de l'UFC par mL en fonction du temps et à droite les histogrammes de l'aire sous la courbe (ASC) du log10 de microorganismes vivants.

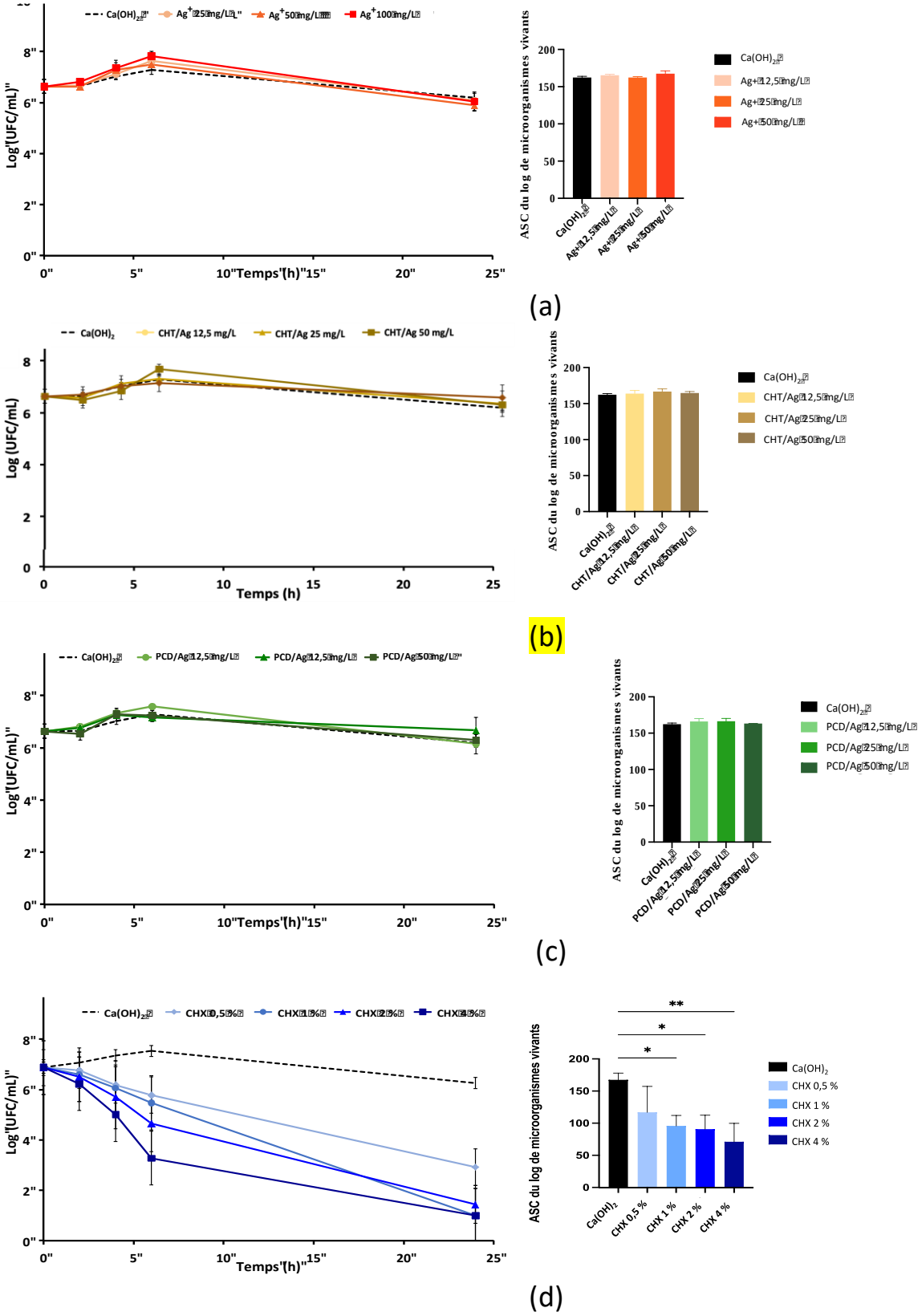


Figure 20. Cinétique de réduction bactérienne d'*E. faecalis* au contact de l'hydroxyde de calcium seul ($Ca[OH]_2$) et comparé à la formulation d'hydroxyde de calcium couplé à différentes concentrations : (a) d'argent en solution : (Ag+) (courbes orange) ; (b) d'argent sous forme de nanoparticule de chitosan (CHT/Ag) (courbes marron/jaunes) ; (c) d'argent sous forme de nanoparticule de polymère de cyclodextrine (PCD/Ag) (courbes vertes) ; (d) de chlorhexidine en solution (courbes bleues) ; à gauche les courbes du log10 de l'UFC par mL en fonction du temps et à droite les histogrammes de l'aire sous la courbe (ASC) du log10 de microorganismes vivants ; (*) différence significative ($p< 0,05$) (**) différence très significative ($p<0,01$).

Les formulations de pâtes couplés avec l'argent n'ont pas amélioré l'activité antimicrobienne du $Ca(OH)_2$ face aux 2 microorganismes testés.

Au contraire, l'ajout de CHX a accéléré la réduction de la charge microbienne par rapport au $Ca(OH)_2$ seul. Cet effet était plus important pour les doses les plus élevées de CHX. Pour *C. albicans*, l'ajout de CHX a potentialisé l'effet du $Ca(OH)_2$ durant les premières heures. Néanmoins, il n'y avait pas de différence significative entre les trois formulations et par rapport à la formulation-témoin ($Ca[OH]_2$ seul). Cependant, face à *E. faecalis,* la CHX a inhibée significativement la croissance microbienne. Pour la concentration la plus élevée, à 4% (40.10^3 mg/L) de CHX, le taux de croissance a diminué plus rapidement dans les six premières heures d'exposition (p=0,055 à t=6 h). A 24 heures, l'activité antibactérienne était significativement supérieure au $Ca(OH)_2$ seul, en particulier pour les concentrations de CHX de 1% (10.10^3 mg/L), de 2% (20.10^3 mg/L) et de 4% par rapport à la pâte de $Ca(OH)_2$ seule (p=0,001246).

La **CHX** est le seul agent antimicrobien testé qui a potentialisé l'efficacité du **$Ca(OH)_2$** face aux 2 pathogènes de la flore endodontique : elle a été sélectionnée pour le test de « kill-time » face à la bactérie parodontopathogène.

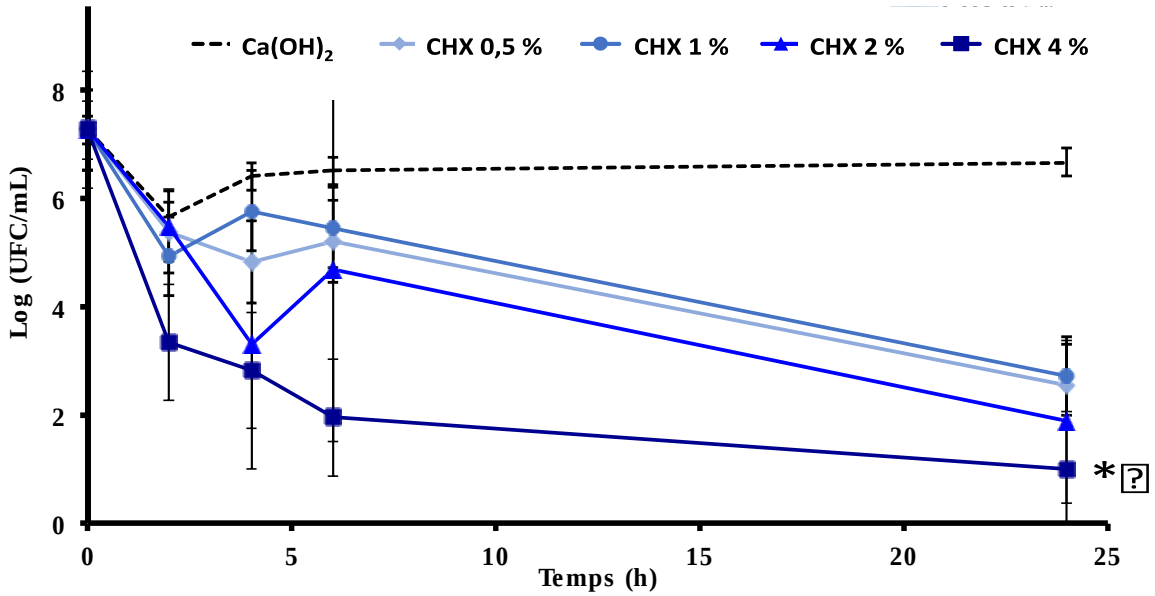


Figure 21. Cinétique de réduction bactérienne de *P. gingivalis* au contact de l'hydroxyde de calcium seul ($Ca[OH]_2$) et comparé à des formulations d'hydroxyde de calcium couplé à différentes concentrations de chlorhexidine (0,5% ; 1% ; 2% ; 4%) ; (*) différence significative (p<0,05).

Les résultats du test de « kill-time » face à *P. gingivalis* sont présentés sur la figure 21. Le $Ca(OH)_2$ seul n'était pas efficace conte *P. gingivalis.* Couplé à la CHX, il réduit la quantité d'antimicrobienne en fonction de la concentration en CHX présente dans la pâte. Ainsi, la formulation

de $Ca(OH)_2$ + CHX 4% (CHX 4%) était la plus efficace, dès 2 h de contact. A t=24 h, il y avait une différence significative entre le $Ca(OH)_2$ seul et la formulation de $Ca(OH)_2$ couplée avec la CHX à 4 % (p=0,047). Par contre, il n'y avait pas de différence significative entre $Ca(OH)_2$ seul et les autres formulations, ni entre les formulations contenant de la CHX.

L'argent n'a pas montré une efficacité contre les pathogènes étudiés. La **CHX** quant à elle, a montré ici un **activité antimicrobienne,** en particulier pour les concentrations à 1, 2 et 4%.

4.1.2.3. Dosage des principes actifs libérés

Afin de comprendre quelle quantité d'antimicrobien était active face à *C. albicans* et *E. faecalis* lors des tests de « kill-time » (figure 19 et 20), la quantité de principe actif libéré a été dosé.

Dosage de l'argent

La quantité d'argent libérée, à partir des pâtes de $Ca(OH)_2$ couplés aux différentes formes d'argent utilisées, a été recherchée pour toutes les formulations testées. Aucune molécule d'argent n'a été détectée avec les concentrations utilisées dans cette étude.

Libération de CHX

Les tests de libération de CHX ont été effectués sur les pâtes de $Ca(OH)_2$ couplées à la CHX à 1% et à 2%. Les résultats sont présentés sur la figure 22. Les courbes montrent peu de différences entre les deux formulations. La quantité de CHX libérée au cours du temps varie peu, notamment les 25 premières heures. Elle est comprise entre 1,76 mg/L et 2,35 mg/L entre 0 et 48 heures.

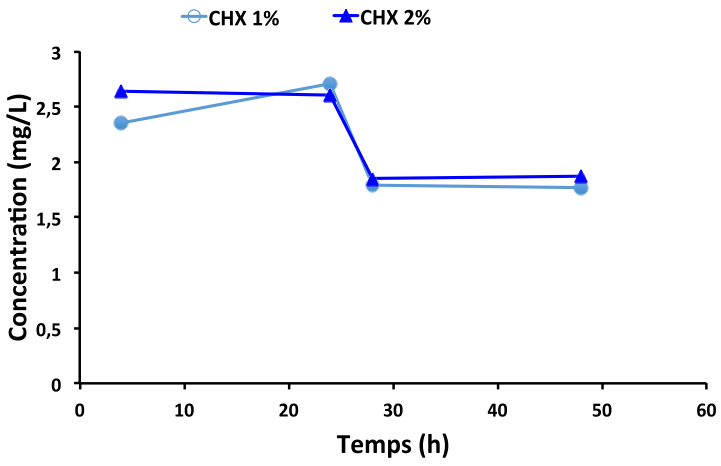


Figure 22. Évolution de la quantité de chlorhexidine libérée au cours du temps pendant 48 heures, à partir des pâtes d'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$) + chlorhexidine (CHX) 1% (CHX 1%) et de $Ca(OH)_2$ + CHX 2% (CHX 2%).

La **CHX** est le seul agent antimicrobien qui a potentialisé les effets du $Ca(OH)_2$ face aux pathogènes étudiés. La pâte de $Ca(OH)_2$ contenant de la CHX à **1 %** correspondait à la formulation la plus efficace, à la plus faible concentration de CHX, contre *E. faecalis* : elle a été sélectionnée pour les tests sur le biofilm de ce pathogène.

4.1.2.4. Effet anti-biofilm des médications intracanalaires chargées en antiseptiques

Les résultats des tests avec le biofilm d'*E. faecalis* sont présentés dans le tableau 7. Le tableau 7.A représente l'activité antimicrobienne des formulations face à un biofilm en formation. Les résultats montrent que le $Ca(OH)_2$ a inhibé la formation du biofilm en présence ou non de CHX 1 % à tous les temps : 1, 2, 3 et 4 semaines.

Tableau 7. Effets de médications intracanalaires d'hydroxyde de calcium seule ($Ca[OH]_2$) et de $Ca(OH)_2$ couplé à la CHX 1% ($Ca[OH]_2$ + CHX 1 %), sur un biofilm *d'E. faecalis* (A) mature ou (B) en formation (n=3).
(-) : pas de croissance des bactéries
(+) : croissance des bactéries

A

Échantillons testés	Échantillons tests				Échantillons contrôles négatifs				Échantillons contrôles positifs	
	$Ca(OH)_2$		$Ca(OH)_2$ + CHX 1%		$Ca(OH)_2$		$Ca(OH)_2$ + CHX 1%		*E. faecalis*	
Milieux	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)
Semaine 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Semaine 2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Semaine 3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Semaine 4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

B

Échantillons testés	Échantillons tests				Échantillons contrôles négatifs				Échantillons contrôles positifs	
	$Ca(OH)_2$		CHX 1%		$Ca(OH)_2$		CHX 1%		*E. faecalis*	
Milieux	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)	Liquide (MH)	Gélose (MHA)
Semaine 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Le tableau 7.B présente les résultats sur l'activité antimicrobien des formulations face à un biofilm mature. Là encore, le $Ca(OH)_2$ avec ou sans CHX 1% parviennent à détruire le biofilm après une semaine de contact.

La **CHX** a montré son efficacité contre les pathogènes étudiés. Cependant, afin de confirmer que cet antiseptique est le plus adapté, il est nécessaire de savoir s'il modifie les propriétés mécaniques des formulations et dans quelle mesure.

4.1.3. Effet de l'ajout d'antiseptiques sur les propriétés mécaniques de la médication intracanalaire

4.1.3.1. Injectabilité

Le figure 23 montrent l'effet de la CHX aux concentrations 0,5%, 1%, 2% et 4% sur l'injectabilité du $Ca(OH)_2$ (ratio 50 : 50). Les formulations à 0,5%, 1% et 2% de la CHX modifient peu l'injectabilité du produit. Cependant, l'ajout de 4% de CHX augmente significativement la force nécessaire pour injecter le produit.

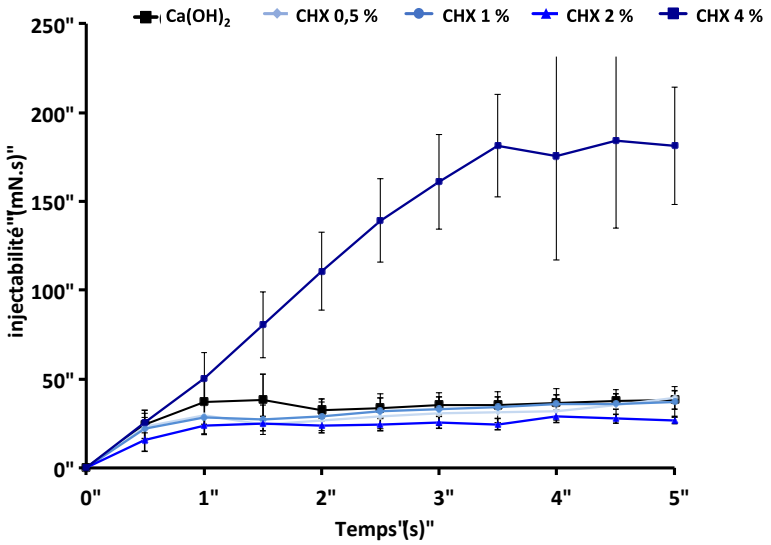


Figure 23. Variation de l'injectabilité de la pâte de $Ca(OH)_2$ seule ou en présence chlorhexidine (CHX) à différentes concentrations (0,5% ; 1% ; 2% ; 4%).

4.1.3.2. Profil de durcissement

La figure 24 montre l'effet de l'ajout de CHX (0,5% ; 1% ; 2% ; 4%) sur le durcissement des préparations extemporanées de $Ca(OH)_2$. L'addition de CHX modifie clairement la cinétique de prise de la pâte. Elle augmente la consistance initiale de la préparation (entre 0 et 1 h), mais limite son durcissement entre 1 h et 24 h, indépendamment de la dose de principe actif incorporée.

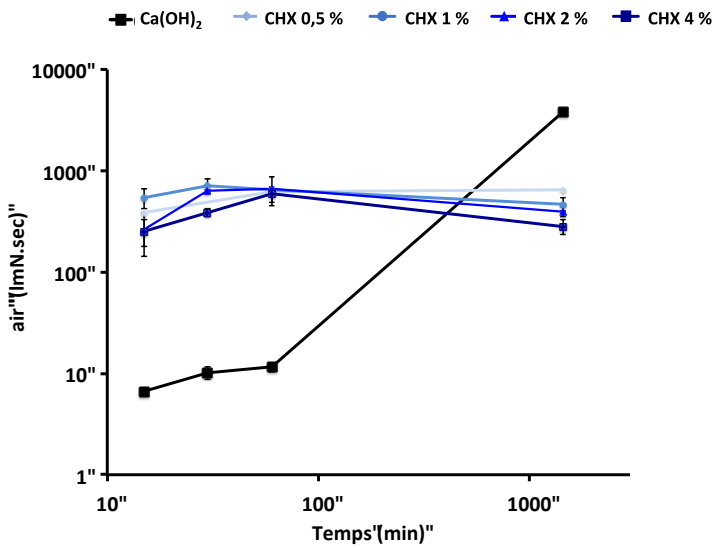


Figure 24. Variation de la cinétique de prise de la pâte de $Ca(OH)_2$ seule ou en présence chlorhexidine (CHX) à différentes concentrations (0,5% ; 1% ; 2% ; 4%).

4.1.3.3. Variations de masse et hydratation

La figure 25 montre l'effet de la CHX sur la variation de la masse relative (exprimée en % de la masse initiale) des pâtes de $Ca(OH)_2$. L'augmentation de la dose de CHX a augmenté la perte de masse à 7 jours.

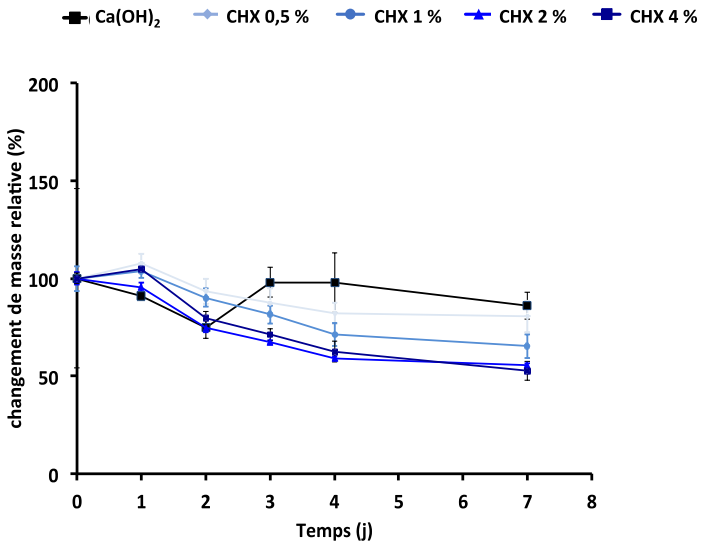
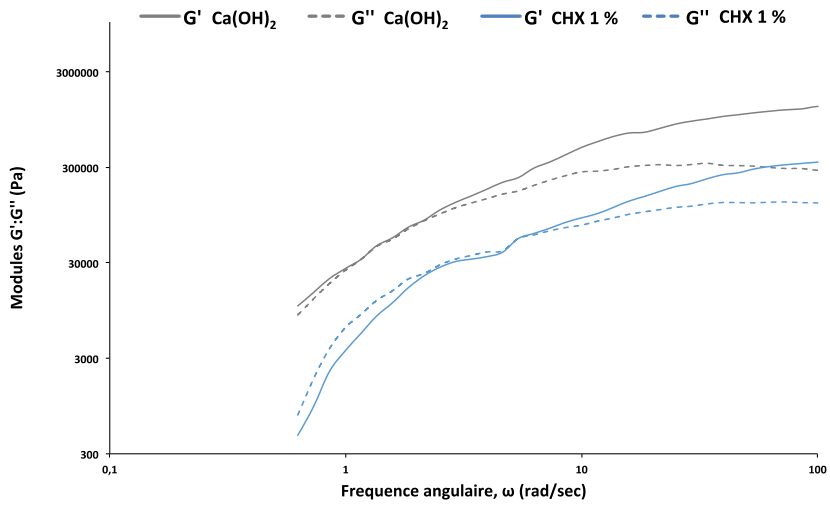


Figure 25. Variation de masse de la pâte de $Ca(OH)_2$ seule ou en présence chlorhexidine (CHX) à différentes concentrations (0,5% ; 1% ; 2% ; 4%).

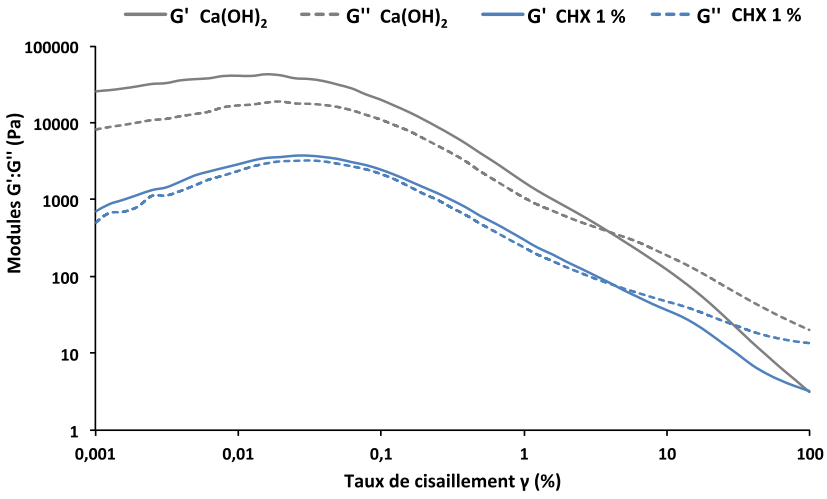
La formulation avec la **concentration efficace** la plus **faible** en CHX pour laquelle les propriétés mécaniques sont peu modifiées est la **CHX à 1%** : elle a été sélectionnée pour les tests de rhéologie.

4.1.3.4. Comportement rhéologique

Balayage en fréquences et en amplitude



(a)



(b)

Figure 26. Propriétés rhéologiques de la pâte d'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$) seul et de la pâte d'hydroxyde de calcium couplé à de la CHX à 1% (CHX 1%) : (a) modules dynamiques en fonction de la fréquence ; (b) balayages d'amplitude.

Les résultats du balayage en fréquence et du balayage temporel des deux formulations ($Ca[OH]_2$ seul et $Ca[OH]_2$ couplé à la CHX 1%) sont présentés sur la figure 26. Les courbes de balayage en fréquence ont montré une diminution des modules (G' et G'') en présence de CHX 1%. Le balayage en amplitude a montré qu'avec la CHX, les modules sont plus faibles que sans CHX. Pour les deux

formulations, le point d'écoulement était de 0,06%. Les points G étaient de 3,93% pour la formulation sans CHX et de 4,95% pour la formulation avec CHX. Les données choisies pour la suite des tests rhéologiques étaient 2,5 rad/s pour la fréquence angulaire et 0,01% pour l'amplitude de déformation.

Comportement viscoélastique

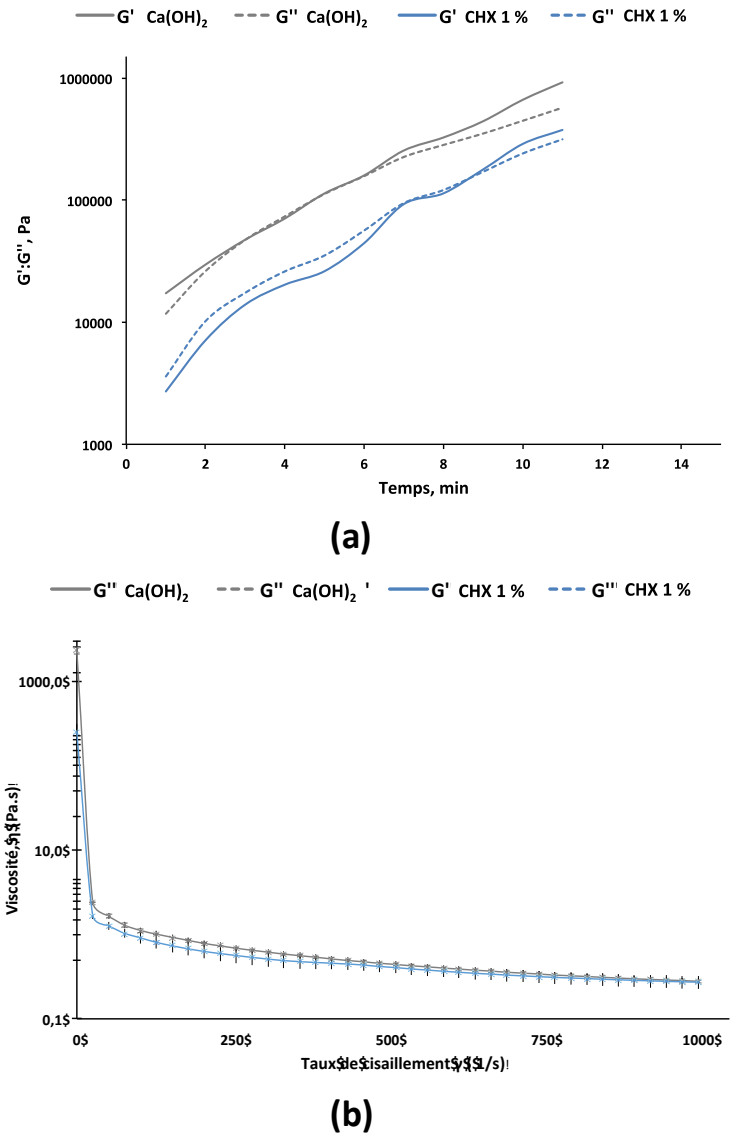


Figure 27. Propriétés rhéologiques de la pâte d'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$) seul et de la pâte d'hydroxyde de calcium couplé à de la CHX à 1% (CHX 1%) : (a) balayages temporels ; (b) viscosité.

Les résultats du balayage temporel et de la viscosité des deux formulations ($Ca[OH]_2$ seul et $Ca[OH]_2$ couplé à la CHX 1%) sont présentés sur la figure 27. La figure 27a montre l'évolution des modules de stockage (G') et de perte (G'') en fonction du temps à une fréquence de 2,5 rad/s à 20°C. Pour les deux formulations, G' et G'' ont augmenté au cours du temps. Pour la formulation sans CHX, le module de stockage (G') est très proche du module de perte (G'') (G' = G'' approximativement). Après

6 minutes, G' devient plus élevé que G''. En présence de CHX, les deux modules (G' et G'') sont moins proches : G'' est d'abord plus élevé que G', puis après 9 minutes G'' devient plus faible que G'.

La figure 27b montre l'évolution de la viscosité de la formulation en fonction de la contrainte, pendant les 15 premières minutes. Les deux formulations ont le même comportement mais la formulation sans CHX est mécaniquement plus consistante que la formulation avec CHX. En effet, la viscosité initiale de la pâte de $Ca(OH)_2$ seul diminue de 2320 Pa.s à 253 Pa.s avec la CHX, puis les valeurs deviennent similaires pour les deux formulations.

Les **propriétés rhéologiques** de la MIC sont **peu modifiées** en présence de CHX à 1%.

4.2. Effets de médications intracanalaires sur le milieu extra-radiculaire et réponse biologique de cellules parodontales

4.2.1. Diffusion trans-radiculaire de composés actifs

4.2.1.1. Ions hydroxyles

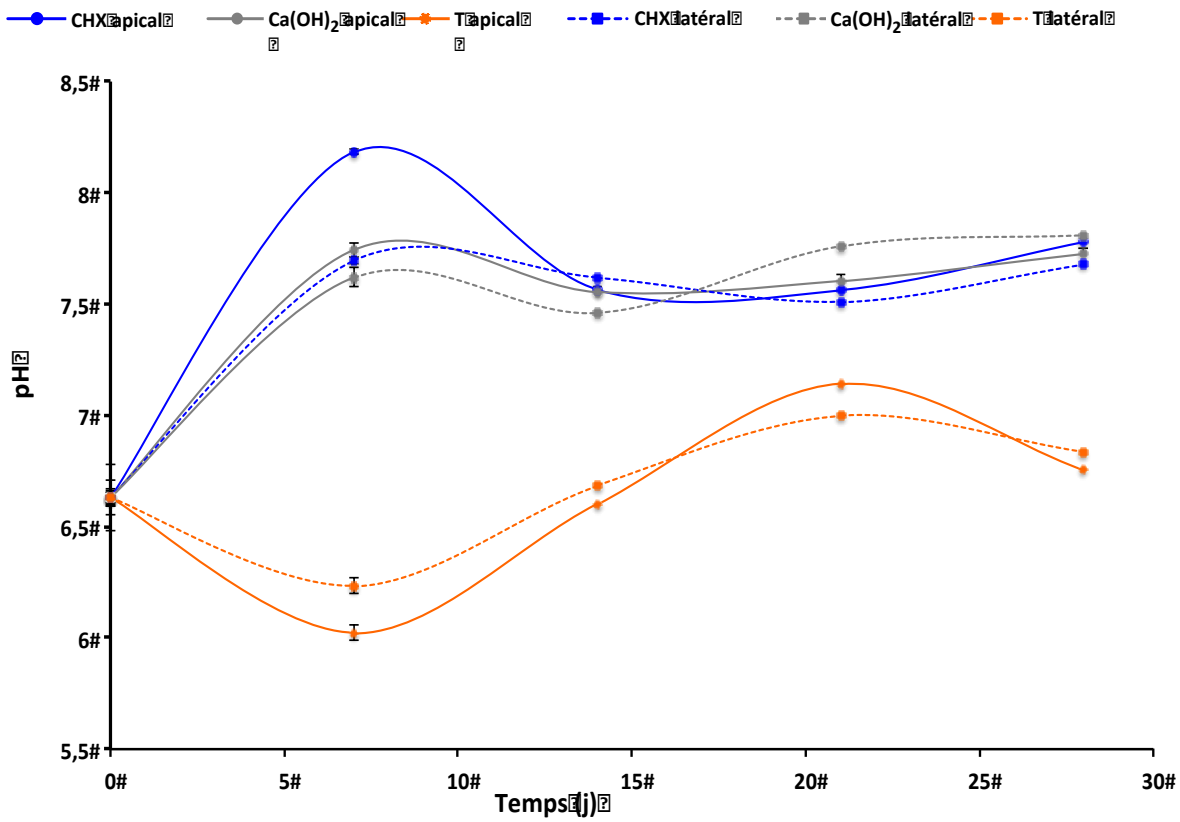


Figure 28. Évolution pendant 28 jours du pH du milieu de diffusion de dents contenant une médication intracanalaire (hydroxyde de calcium seul : $Ca[OH]_2$ ou $Ca(OH)_2$ + chlorhexidine à 1% : CHX) ou non (T) ; différence significative ($p < 0,05$) à tous les temps entre T et $Ca[OH]_2$) et entre T et CHX.

La courbe de libération de ions hydroxyles au cours du temps (figure 28) montre une augmentation importante du pH dans les premiers temps (jusqu'à J7), puis une stabilisation à un plateau les semaines suivantes (jusqu'à J28). La libération est plus importante en apical qu'en latéral et en présence de CHX. A tous les temps, la libération d'OH^- à travers les racines est significativement plus importante en présence de MIC ($1{,}08.10^{-12} < p < 1{,}42.10^{-8}$), par rapport aux racines témoins aussi bien en apical ou en latéral.

4.2.1.2. Ions calcium

La figure 29 représente les histogrammes de libération des ions calcium à deux temps (J7 et J28). En apical, cette libération est plus importante à J7 qu'à J28. Elle est également plus importante en apical qu'en latéral à J7, pour toutes les formulations. En présence de CHX, la libération des ions calcium est plus importante dans les premiers temps (jusqu'à J7), mais il y a peu de différence ensuite (à J28) entre les échantillons tests. Au contraire, la différence entre les échantillons témoins et les échantillons test est significative aux 2 temps ($p = 4{,}66.10^{-12}$ à J7 ; $p = 3{,}90.10^{-5}$ à J28).

Pour la diffusion latérale, il n'y a pas de différence entre les formulations contenant ou non de la CHX. Les quantités d'ions calcium libérées sont constantes aux deux temps.

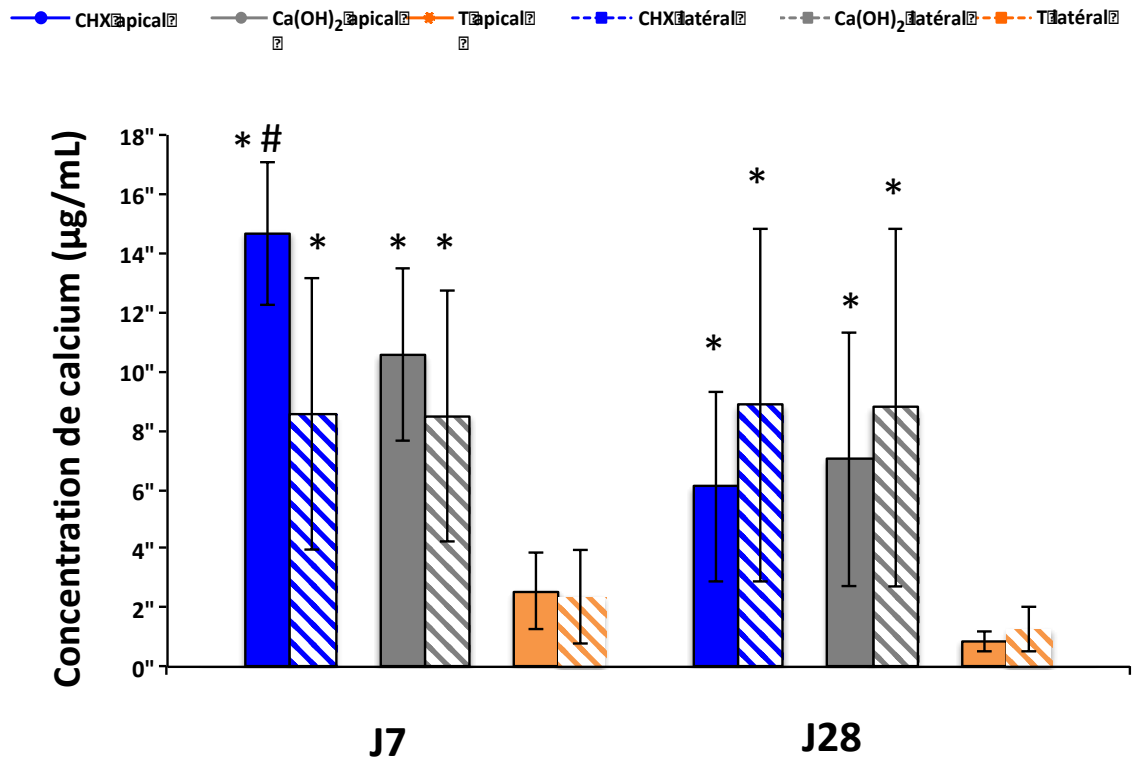


Figure 29. Évolution de la concentration d'ions calcium dans le milieu de diffusion de dents contenant une médication intracanalaire (hydroxyde de calcium seul : $Ca[OH]_2$ ou $Ca(OH)_2$ + chlorhexidine à 1% : CHX) ou non (T) ; (*) différence significative avec T ($p<0{,}05$) ; (#) différence significative avec $Ca(OH)_2$ ($p<0{,}05$).

4.2.1.3. Chlorhexidine

La figure 30 représente les histogrammes de dosage de la CHX à 4 temps (J7, J14, J21 et J28). A J7, une quantité très importante (51,28 µg/mL) de CHX est libérée en apical pour la formulation contenant de la CHX. De la CHX est également libérée en latéral mais en quantité beaucoup plus faible (3,99 µg/mL). La quantité de CHX libérée pour toutes les autres conditions est quasiment nulle au 4 temps. A J28, la libération de CHX est quasiment nulle pour toutes les formulations.

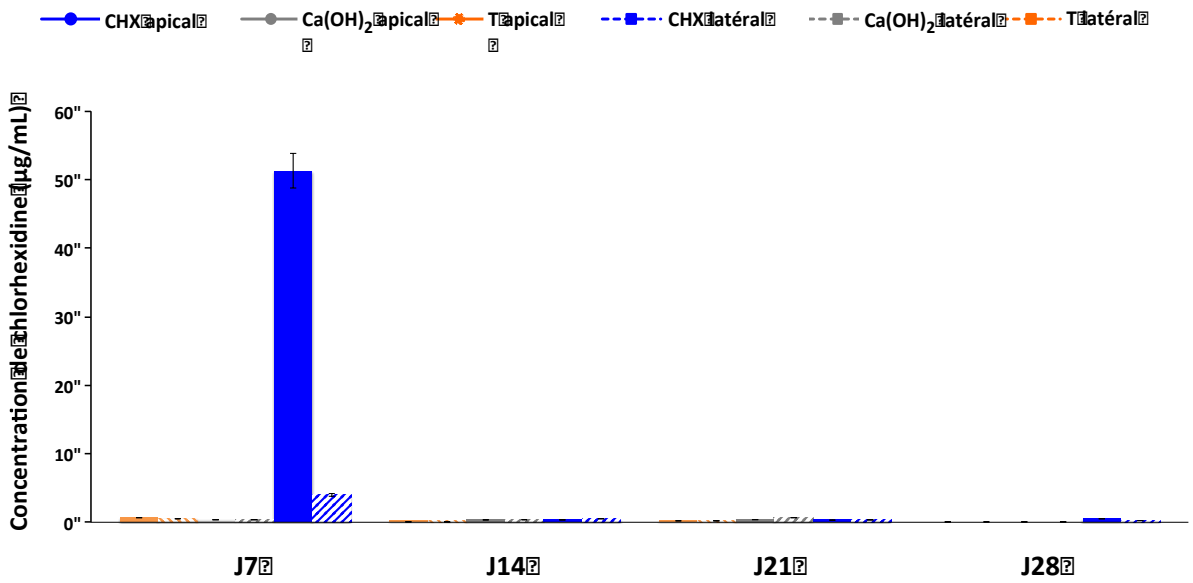


Figure 30. Évolution de la concentration de chlorhexidine dans le milieu de diffusion de dents contenant une médication intracanalaire (hydroxyde de calcium seul : $Ca[OH]_2$ ou $Ca(OH)_2$ + chlorhexidine à 1% : CHX) ou non (T); écart type = intervalle de confiance 95%.

Les ions HO^-, Ca^{2+} et la CHX ont mieux diffusés à **J7** et en **apical** des racines. Les quantités d'ions HO^- et Ca^{2+} libérées en apical étaient plus importantes pour les formulations qui contenaient de la CHX.

4.2.2. Effets d'extraits de médications intracanalaires sur la réponse de cellules parodontales

4.2.2.1. Viabilité cellulaire

Les tests de viabilités sur les PDL (figure 31), les OCM (figure 32) et les MG63 (figure 33) ont été réalisés à trois temps (J1, J3 et J7), avec 3 dilutions d'extrait.

Cellules du ligament alvéolo-dentaire

A J1, les pourcentages de viabilité sont les plus élevés pour les extraits dilués de moitié (dilution 1/2). A J3 et à J7, ce sont les dilutions 1/2 et 1/10 qui ont les pourcentages de viabilité les

plus élevés. Pour les extraits purs, le pourcentage de viabilité diminue en présence de CHX et lorsque le pourcentage de CHX augmente. Le pourcentage de viabilité de la formulation CHX 1% est supérieur à 80% au trois temps étudiés, lorsque les extraits sont dilués (dilution 1/2 et 1/10). Lorsque l'extrait contient du $Ca(OH)_2$ + CHX à 0,5% (CHX 0,5%), le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% pour l'extrait pur, à tous les temps, pour la dilution 1/2 uniquement à J3 (77,07%) et pour la dilution 1/10 uniquement à J1 (63,98%). Le pourcentage de viabilité du $Ca(OH)_2$ a été inférieur à 80% pour l'extrait pur à partir de J3, pour la dilution 1/2 uniquement à J3 et pour la dilution 1/10 uniquement à J1.

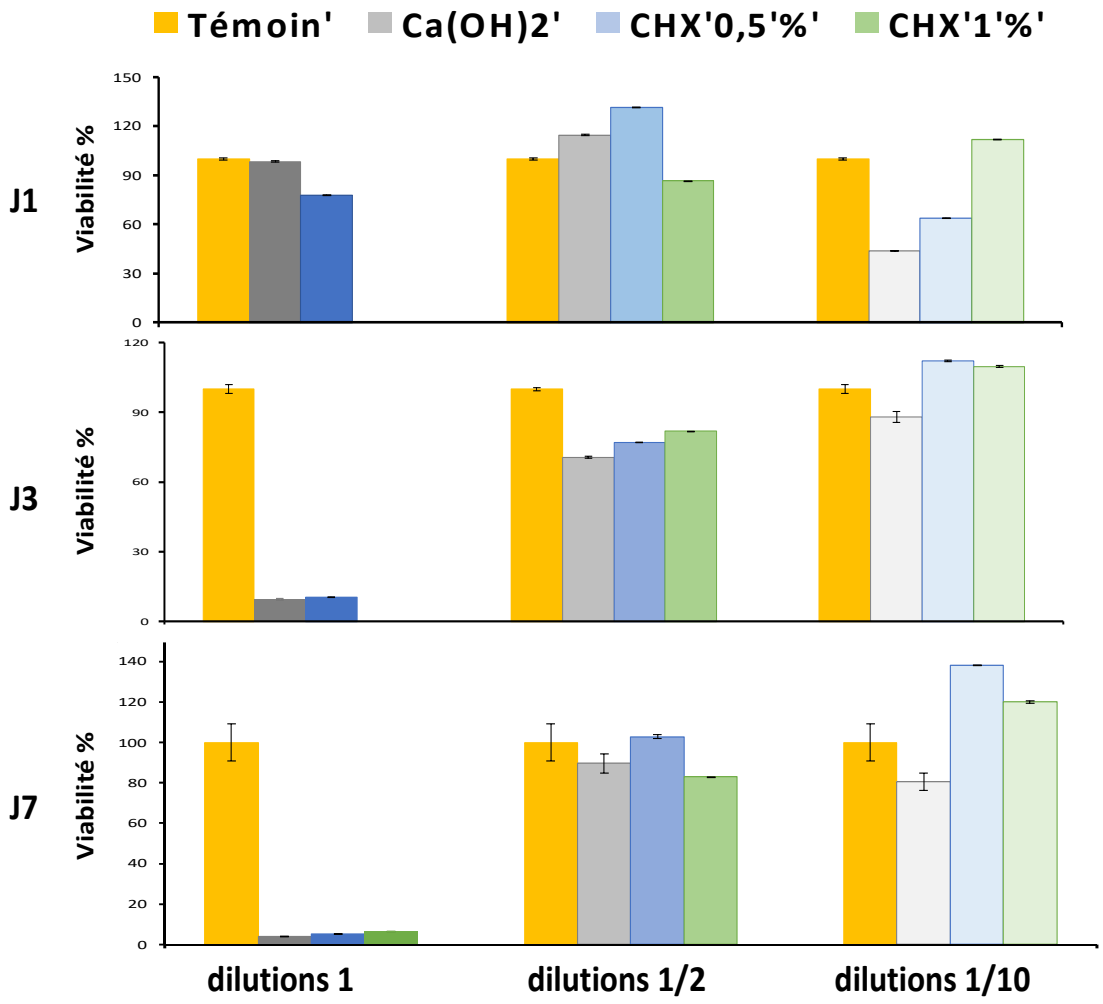


Figure 31. Prolifération des fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits +/- dilués d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine (n = 3). Les mesures ont été effectuées en utilisant le test Alamar Blue et les données sont exprimées en moyenne et écart-type : différence entre les cellules non actives métaboliquement et les cellules métaboliquement actives ; écart type = intervalle de confiance 95%.

Cémentoblastes

Pour les extraits dilués de moitié (dilution 1/2) et au dixième (dilution 1/10), le pourcentage de viabilité est élevé (≥ 80%) à J1 et J3. Pour les extraits purs, le pourcentage de viabilité diminue en présence de CHX et lorsque le pourcentage de CHX augmente. Pour la formulation CHX 1%, le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% pour l'extrait pur, à tous les temps et pour la dilution 1/2 à partir de J3. Le pourcentage de viabilité de l'extrait CHX 0,5%, n'est inférieur à 80% que pour l'extrait pur, à tous les temps. Pour le $Ca(OH)_2$, le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% pour l'extrait pur à tous les temps et pour la dilution 1/2 à J1 et à J7.

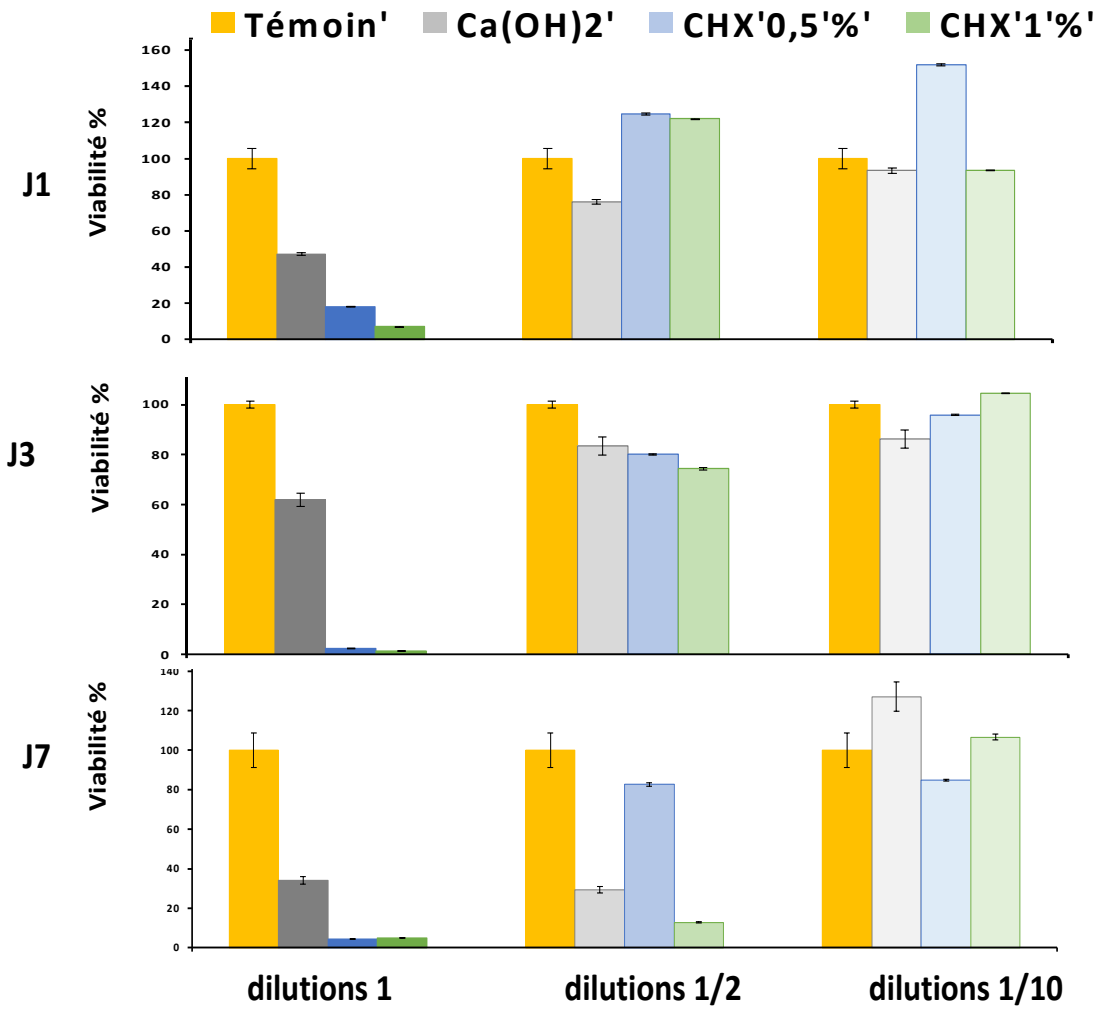


Figure 32. Prolifération des cémentoblastes après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits +/- dilués d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine (n = 3). Les mesures ont été effectuées en utilisant le test Alamar Blue et les données sont exprimées en moyenne et écart-type : différence entre les cellules non actives métaboliquement et les cellules métaboliquement actives ; écart type = intervalle de confiance 95%.

Ostéoblastes

Pour les extraits dilués de moitié (dilution 1/2) et au dixième (dilution 1/10), le pourcentage de viabilité est élevé (≥ 80%) à tous les temps. Pour la formulation CHX 1%, le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% uniquement pour l'extrait pur, à tous les temps. Pour la CHX 0,5%, le pourcentage de viabilité n'est inférieur à 80% que pour l'extrait pur à partir de J3. Pour le $Ca(OH)_2$, le pourcentage de viabilité est inférieur à 80% pour toutes les extraits purs et pour la dilution 1/10 à J1.

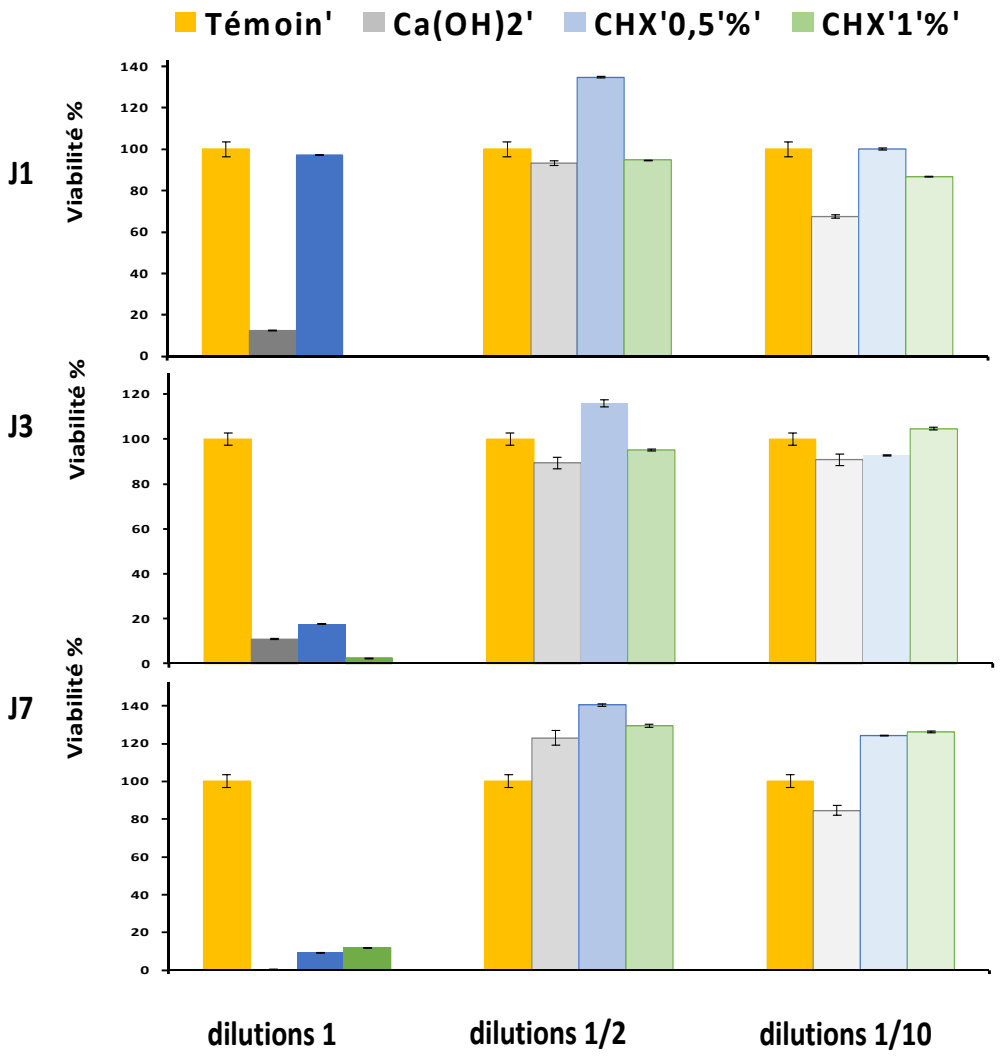


Figure 33. Prolifération des ostéoblastes après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits +/- dilués d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine (n = 3). Les mesures ont été effectuées en utilisant le test Alamar Blue et les données sont exprimées en moyenne et écart-type : différence entre les cellules non actives métaboliquement et les cellules métaboliquement actives ; écart type = intervalle de confiance 95%.

Les formulations diluées de moitié présentaient les pourcentages de viabilité cellulaire les plus élevés. Cette **dilution 1/2** a été conservée pour la suite des tests.

4.2.2.2. Potentiel de minéralisation

Les tests de minéralisation ont été effectués sur les cémentoblastes (figures 34 et 36) et les ostéoblastes (figures 35 et 37).

Potentiel de minéralisation précoce (ALP)

➢ Cémentoblastes

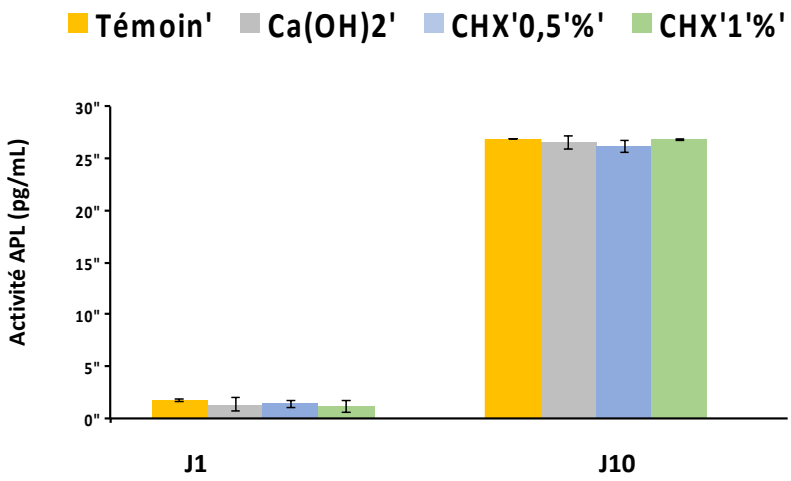


Figure 34. Activité de la phosphatase alcaline (ALP) intracellulaire de cémentoblastes stimulés avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 1 et 10 jours (n=3).

Les résultats des tests de potentiel de minéralisation précoce sont présentés sur la figure 34. L'activité de l'ALP est beaucoup plus faible à J1 (0 à 9,24 pg/mL) qu'à J10 (25,31 à 24,96 pg/mL) pour toutes les conditions. A J10, il n'y a pas de différence entre l'activité de l'ALP des cellules contrôles et celles des cellules en présences des extraits, ni entre les différentes conditions (p= 0,607 à J1 et p= 0,248 à J10). Les extraits n'ont pas potentialisé la minéralisation précoce des cémentoblastes.

➢ Ostéoblastes

Les résultats de la figure 35 montrent qu'à J1, l'activité de l'ALP des ostéoblastes était plus importante avec l'extrait de $Ca(OH)_2$ que chez les cellules témoins et les autres conditions. Cependant les différences ne sont pas significatives (p=0,072 à J1 et p= 0,186 à J10). A J10, l'activité de l'ALP des ostéoblastes est équivalente pour toutes les conditions. Les extraits n'ont pas potentialisé la minéralisation précoce des ostéoblastes.

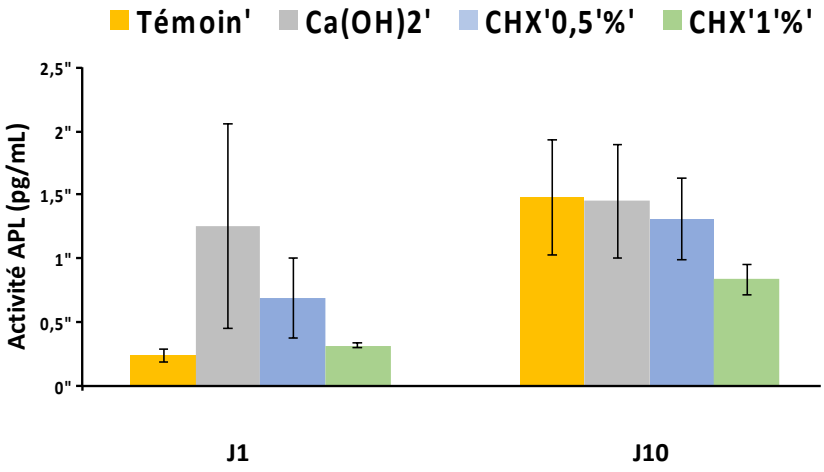


Figure 35. Activité de la phosphatase alcaline (ALP) intracellulaire d'ostéoblastes après le contact avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 1 et 10 jours (n=3).

Quantification de la minéralisation tardive

➢ Cémentoblastes

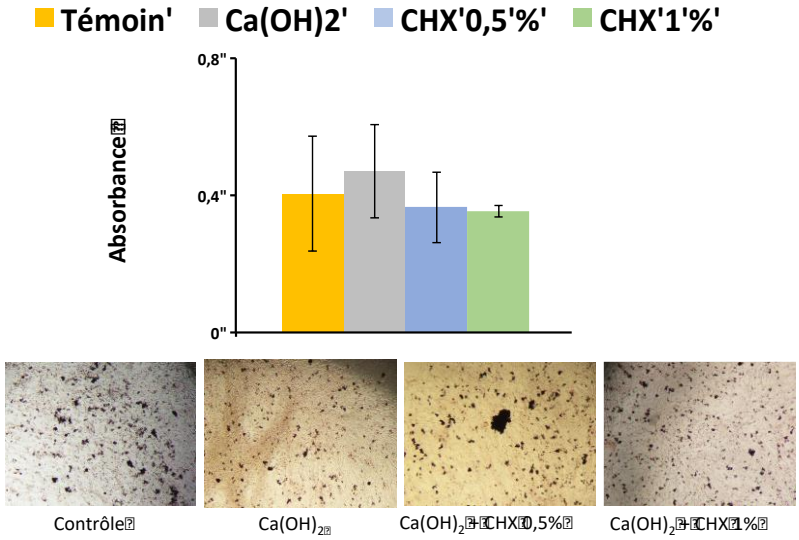


Figure 36. Semi-quantification du dépôt de calcium dans les cémentoblastes après coloration au rouge d'alizarine et leur dissolution via le chlorure de cétylpyridinium, après le contact avec les extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 14 jours (n=3) et photographie des images obtenues sous microscope optique.

Les résultats de la minéralisation tardive (figure 36) montrent qu'à J14 les absorbances des extraits sont équivalentes à celles des cellules témoins et équivalentes entre elles (témoin : 0,40 ± 0,17 ; $Ca(OH)_2$: 0,46 ± 0,17 ; $Ca(OH)_2$ + CHX 0,5% : 0,36 ± 0,15 ; $Ca(OH)_2$ + CHX 1% : 0,35 ± 0,12) ; (p = 0,648).

➢ Ostéoblastes

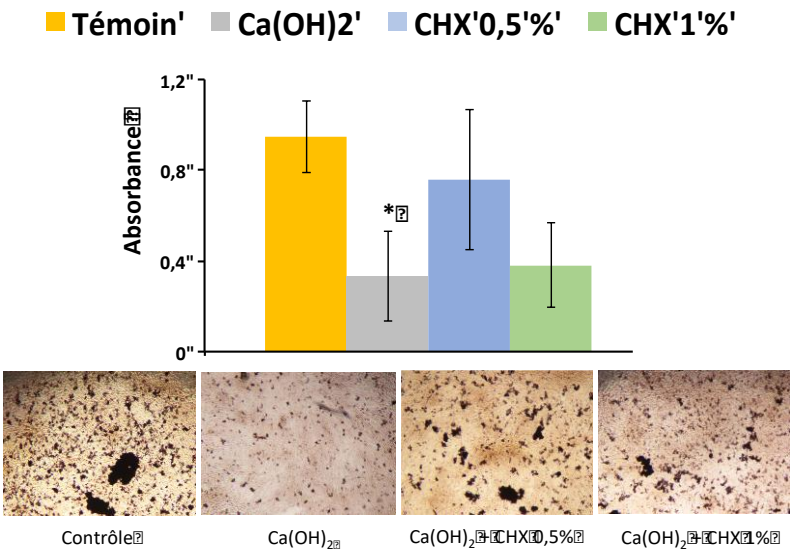


Figure 37. Semi-quantification du dépôt de calcium dans les ostéoblastes après coloration au rouge d'alizarine et leur dissolution via le chlorure de cétylpyridinium, après le contact avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 14 jours (n=3) ; (*) différence significative ($p<0,05$) et photographie des images obtenues sous microscope optique.

Les résultats de la figure 37 montrent qu'à J14 les absorbances mesurées pour les extraits issus des MIC de $Ca(OH)_2$ + CHX 0,5% (0,71 ± 0,30) et $Ca(OH)_2$ + CHX 1% (0,38 ± 0,19) ne sont pas significativement différentes de l'absorbance des cellules témoins (témoin : 0,95 ± 0,16). Il y a une différence significative entre les témoins et l'extrait issu de la MIC de $Ca(OH)_2$ (0,33 ± 0,20) ($p=0,024$).

Les formulations n'ont **pas potentialisé** la **minéralisation précoce et tardive** des **ostéoblastes** et des **cémentoblastes**.

4.2.2.3. Sécrétion de médiateurs inflammatoires

Les résultats des tests d'inflammation effectués sur les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire après contact pendant 24 h avec le LPS de *P. gingivalis* sont présentés sur les figures 38 et 39.

TNF- α

Pour le TNF-α (figure 38), l'absorbance des extraits CHX 0,5% et CHX 1% était inférieure à celle des cellules témoins et de l'extrait $Ca(OH)_2$. Toutefois, les différences n'étaient pas significatives ($p=0,161$).

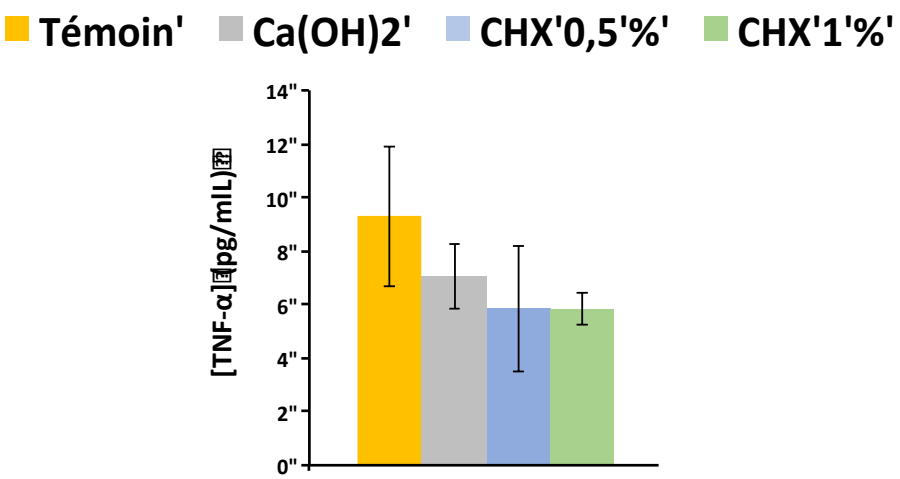


Figure 38. Expression du facteur de nécrose tumorale de type alpha (TNF-α) par les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire après une exposition pendant 24 h avec des LPS, puis traités avec les extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), (n=3) ; (* différence significative si p<0,05).

IL-6

Pour IL-6 (figure 39), l'absorbance des extraits était significativement inférieure à celle de cellules témoins (p=. 0,003). La réduction a été significativement plus importante avec les extraits contenant de la CHX (p= 0,007).

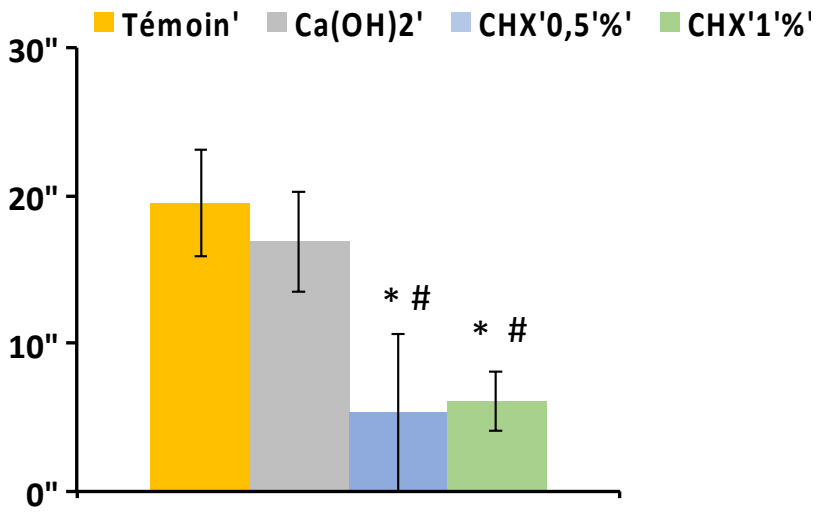


Figure 39. Expression de l'interleukine 6 (IL-6) par les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire après une exposition pendant 24 h aux LPS, puis traités avec les extraits d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), (*) différence significative avec témoin (p<0,05) ; (#) différence significative avec $Ca(OH)_2$ (p<0,05) (n=3).

En présence d'extrait contenant de la **CHX**, la sécrétion de **médiateurs** de l'inflammation de PDL a été **réduite, en particulier pour IL-6**.

5. DISCUSSION

5. DISCUSSION

5.1. Analyse critique des principaux résultats

5.1.1. Influence de la formulation sur les propriétés de médications intracanalaires à base d'hydroxyde de calcium

5.1.1.1. Effet du ratio liquide/poudre sur la consistance de la pâte

Avant d'incorporer les molécules antiseptiques dans la formulation, l'effet du ratio liquide/poudre sur la consistance de la pâte d'hydroxyde de calcium a été étudié. En effet, la texture et la cinétique de prise sont des paramètres importants en pratique pour l'opérateur (Basturk et al. 2015 ; Türker et Uzunoğlu 2016). Les études montrent que le ratio liquide/poudre modifie les propriétés physico-chimiques de ciments hydrophiles utilisés comme matériau d'obturation. Un ratio liquide/poudre élevé réduit la résistance à la compression et augmente la solubilité et la porosité du MTA, alors qu'un ratio liquide/poudre de 100 : 50 (ou 2 : 1) permet une libération maximale d'ions calcium (Basturk et al. 2015 ; Fridland et Rosado 2003 ; Türker et Uzunoğlu 2016). Un effet similaire a été observé sur le comportement mécanique d'une autre MIC à base de dérivés du calcium (Shojaee et al. 2018). Nos résultats corroborent ces observations puisque la variation du ratio liquide/poudre modifie la consistance de la pâte de $Ca(OH)_2$ et, par conséquent, son injectabilité. Plus la quantité de poudre augmente, plus la formulation devient visqueuse et jusqu'à 3 fois plus difficile à injecter. La pâte d'hydroxyde de calcium préparée avec un ratio 50 : 50 (v/w) était la plus stable en termes de masse au cours du temps, ce qui indique une prise/perte en eau limitée (figures 18). Sa prise lente durant la première heure offre un temps de travail plus long que la formulation commerciale prête à l'emploi (Calasept®) utilisée comme produit contrôle (figure 17). Ce ratio 50 : 50 offre également une viscosité adaptée à une application à l'aide d'une seringue et a déjà été utilisé dans la littérature (Lima et al. 2019 ; Ordinola-Zapata et al. 2022). C'est pourquoi, il a été retenu pour la suite des expérimentations.

5.1.1.2. Activité antimicrobienne de la MIC

L'activité antimicrobienne de la MIC à base de $Ca(OH)_2$ fait depuis très longtemps l'objet de controverses récurrentes. Kim et Kim proposent une synthèse des études *in vitro* publiées entre 1991 et 2012. Leur revue de littérature souligne la grande hétérogénéité des méthodes utilisées pour répondre à cette question. Parmi les vingt-quatre études sélectionnées, quinze (62,5%) ont montré une action bactéricide du $Ca(OH)_2$ (Kim et Kim 2014) :

- Trois études (12%) ont évalué la susceptibilité (CMI/CMB) de différentes bactéries à des solutions de $Ca(OH)_2$; deux d'entre elles ont conclu à l'inefficacité du $Ca(OH)_2$. Bien que cette méthode soit rigoureuse, elle est dépendante du choix des gammes de concentration étudiées et peu transposable à la pratique clinique puisque le $Ca(OH)_2$ est plus souvent utilisé sous forme de pâte que de solution.
- Dix études (42%) ont utilisé la diffusion sur gel d'agarose pour évaluer l'activité antimicrobienne du $Ca(OH)_2$ sous la forme de solutions ou de pâtes ; cinq ont conclu à un effet antimicrobien de $Ca(OH)_2$ et les autres à son inefficacité (Kim et Kim 2014). Bien que très répandu et facile à réaliser, la fiabilité de ce test est régulièrement critiquée à cause de facteurs comme (i) des interactions potentielles entre la gélose et l'agent antimicrobien qui pourraient influencer sa diffusion dans le milieu ; (ii) la subjectivité de l'interprétation des diamètres d'inhibition mesurée ; (iii) les variations de mesure liées aux conditions de préparation de la gélose notamment son épaisseur (Bonev et al. 2008 ; Saatchi et al. 2014). Pour cette raison, ce type de test n'a pas été retenu dans notre étude.
- Onze études (46%) ont utilisé différents tests d'exposition directe des bactéries au $Ca(OH)_2$ sous diverses formes (pointes, pâte, solution) et ont mesuré l'effet antimicrobien de différentes manières (présence/absence de turbidité ou densité optique par exemple). Neuf études ont conclu à un effet antimicrobien de $Ca(OH)_2$ et deux à son inefficacité.

Le test de « kill-time » utilisé dans notre étude est un modèle simple, fiable et reproductible d'exposition directe des bactéries à l'agent antimicrobien. Il permet un contact direct de la pâte de $Ca(OH)_2$ avec le milieu de culture dans lequel les bactéries sont en suspension et de quantifier au cours du temps son effet sur la charge bactérienne (Mogrovejo-Valdivia et al. 2019).

Le temps d'exposition à l'agent antimicrobien, qui varie selon les études entre 10 min et 7 jours, est également une source potentielle de variabilité des résultats. Il est intéressant de noter que les deux-tiers des études *in vitro* qui concluent à l'inefficacité du $Ca(OH)_2$ ont évalué son action sur une durée d'au moins deux jours. L'allongement de la période d'observation *in vitro* a l'avantage de tendre vers la durée de mise en place des MIC en pratique clinique durant au moins une semaine (Balto et al. 2020 ; Mohammadi et Dummer 2011 ; Ordinola-Zapata et al. 2022). Cependant, un délai plus long permet une recroissance bactérienne tardive qui induit un biais d'interprétation de l'effet antimicrobien de la MIC. Bien que cette réinfection du canal soit possible *in vivo* (Kim et Kim 2015), il est difficile d'établir la comparaison entre la cinétique de recontamination d'un canal instrumenté, rempli de MIC et les conditions de laboratoire. De plus, les quantités de formulation utilisées dans les tests *in vitro*, très variables selon les études et les modèles sont difficilement comparables à la quantité

de MIC qui peut être placée dans un canal dentaire (Podbielski et al. 2003). Tous ces facteurs limitent la comparabilité des résultats des études et peuvent expliquer les controverses dans la littérature.

Effets du $Ca(OH)_2$ seul

Contrairement aux conclusions d'études antérieures, nous avons observé une activité du $Ca(OH)_2$ seul (sans ajout d'antimicrobiens) sur *C. albicans* (figures 19), habituellement décrit comme peu ou non susceptible au $Ca(OH)_2$ (Carbajal Mejía 2014 ; Meto et al. 2019 ; Nair 2006 ; Waltimo et al. 1999). Le modèle expérimental utilisé pourrait expliquer ce désaccord. En effet, dans nos expérimentations, la MIC, placée au fond d'un tube, est en contact direct avec les microorganismes en suspension dans le milieu de culture liquide. Ferguson et al. ont montré qu'en contact direct avec *C. albicans*, le $Ca(OH)_2$ est fongicide (Ferguson et al. 2002), tandis que dans un modèle *ex vivo* de dentine infectée, la capacité de *C. albicans* à pénétrer profondément dans les tubules dentinaires le rend moins vulnérable à l'action de la MIC (Carbajal Mejía 2014).

Nos résultats concernant l'effet du $Ca(OH)_2$ sur *E. faecalis* corroborent ceux des études précédentes et ne montrent aucun effet du $Ca(OH)_2$ sur une culture pure de *E. faecalis* en milieu liquide (Basrani et al. 2003 ; Sukawat et Srisuwan 2002). En revanche, le $Ca(OH)_2$ apparait efficace sur un biofilm de *E. faecalis* mature ou en formation. Des résultats similaires ont été rapportés par Delgado et al. avec un modèle *ex vivo* (Delgado et al. 2010). Le biofilm d'*E. faecalis* a été réduit significativement (-75%) en présence du $Ca(OH)_2$ par rapport au groupe contrôle (sans MIC) (Delgado et al. 2010). Balto et al. ont observé la destruction de 76,14% à 91,71% du biofilm après deux et quatre semaines de contact respectivement (Balto et al. 2020). Cet effet du $Ca(OH)_2$ sur le biofilm de *E. faecalis*, en apparence plus probant qu'en culture pure doit être interprété prudemment. Il est important de noter que les ratios entre le volume de pâte et le volume du milieu de culture sont très différents entre les deux types de tests. Ce ratio est de 1 : 6 environ dans une plaque de 24 puits utilisée pour le biofilm contre 1 : 10 dans un tube Falcon utilisé pour le test de « kill-time ». La forte concentration de MIC au contact du biofilm pourrait expliquer cette performance inattendue sur le biofilm de *E. faecalis* puisque l'effet antimicrobien du $Ca(OH)_2$ est dose-dépendant (Blanscet et al. 2008). Ces différences de conditions expérimentales pourraient également expliquer, au moins en partie, les divergences entre nos observations et celles d'une autre étude en ce qui concerne l'effet du $Ca(OH)_2$ sur *P. gingivalis* (Podbielski et al. 2003).

Chlorhexidine

Les résultats indiquent que l'ajout de CHX potentialise l'action antimicrobienne du $Ca(OH)_2$, sur *E. faecalis* (figures 20) et *P. gingivalis* (figures 21), peu sensibles au $Ca(OH)_2$ seul, et que cet effet adjuvant est dose-dépendant. Les quantités de CHX incorporées dans la MIC ont été choisies dans la gamme des concentrations usuelles dans des études similaires (Basrani et al. 2003 ; Charannya et al. 2018 ; Delgado et al. 2010 ; Ercan, et al. 2006 ; Evans et al. 2003 ; Gomes et al. 2006 ; Prabhakar et al. 2012). Les dosages effectués dans le milieu de culture bactérien au contact de la MIC ont confirmé la présence de CHX, libérée à des concentrations de 2,25 mg/L à 24 h, proches de la CMI de *E. faecalis*, ce qui explique l'effet antimicrobien observé. Le $Ca(OH)_2$ combiné à la CHX était également actif sur le biofilm d'*E. faecalis* mature ou en formation (tableau 7). Ces résultats prometteurs suggèrent qu'en pratique, la MIC pourrait à la fois compléter la désinfection des zones inaccessibles à l'instrumentation, où un biofilm non désorganisé persiste, mais également ralentir la recolonisation du canal en inter-séance. Toutefois, ces résultats devront être confirmés sur des biofilms multi-espèces, plus représentatifs de la situation clinique (Tülü et al. 2021). Dans l'ensemble, ces résultats sont concordants avec les études précédentes qui ont montré l'intérêt de la combinaison $Ca(OH)_2$ + CHX et un effet antimicrobien logiquement corrélé à la dose de CHX (Sukawat et Srisuwan 2002; Turk et al. 2009), indépendamment du modèle utilisé (*in vitro* ou *ex vivo*) (Ercan et al. 2006 ; Evans et al. 2003).

Effets du $Ca(OH)_2$ combiné à des métaux antimicrobiens

Les métaux antimicrobiens sont considérés comme des alternatives possibles aux antiseptiques conventionnels (Afkhami et al. 2015 ; Ahrari et al. 2015 ; Charannya et al. 2018 ; Yousefshahi et al. 2018). Ils ont été testés en laboratoire sur un large panel de microorganismes, y compris des pathogènes buccaux tels que *P. gingivalis* (Halkai et al. 2017 ; Halkai et al. 2018b), *E. faecalis* (Halkai et al. 2017 ; Halkai et al. 2018b), *C. albicans* (Savić et al. 2018), en culture pure ou sous forme de biofilms (Rojas et al. 2021 ; Vaidya et al. 2017 ; Wu et al. 2014). Plusieurs études suggèrent que leur action serait potentialisée sous la forme de NPM (Halkai et al. 2017 ; Halkai et al. 2018b ; Wu et al. 2014) ou de NPMP (NPM polymériques) (Carapeto et al. 2017 ; Revathi et Thambidurai 2019 ; Nithya et Jothivenkatachalam 2015). Il est possible de synthétiser des NPMP en utilisant des polymères tels que le chitosan, qui possède des propriétés antimicrobiennes intrinsèques (Bano et al. 2017 ; Wei et al. 2021), ou la cyclodextrine qui améliore la stabilité, la solubilité et la délivrance du principe actif (Blanchemain et al. 2012 ; Flores et al. 2017). Cette méthode a été précédemment utilisée avec succès dans notre laboratoire (Mogrovejo-Valdivia et al. 2019). C'est pourquoi dans cette étude, les composés métalliques ont été testés sous forme d'ions en solution mais également de NPM et NPMP.

5. DISCUSSION

- Cuivre et zinc

Les tests préliminaires de susceptibilité microbienne (CMI/CMB) (tableau 6) ont clairement indiqués que les microorganismes étudiés n'étaient pas sensibles au cuivre et au zinc. Les concentrations inhibitrices ou bactéricides contre *E. faecalis* et *C. albicans* étaient trop élevées, irréalistes pour un usage clinique (≥ 3200 mg/L). Ces molécules ont donc été exclues de la suite des expérimentations. Des résultats contradictoires ont été rapportés dans la littérature concernant la sensibilité de *E. faecalis* et *C. albicans* au zinc et au cuivre. Aghatabay et al. et Martínez et al. ont rapporté des valeurs de CMI pour *C. albicans* atteignant 12,5 mg/L pour le zinc et 129,7 mg/L pour le cuivre, respectivement (Aghatabay et al. 2006 ; Martínez et al. 2021). Plus récemment, Meto et al. ont rapporté une CMI similaire pour *C. albicans,* pour le cuivre mélangé au $Ca(OH)_2$ (125 mg/L) (Meto et al. 2019). Nozari et al. ont indiqué qu'ils n'avaient observé aucun effet antimicrobien de l'oxyde de zinc sur *E. faecalis* (Nozari et al. 2019). Des résultats contradictoires ont également été rapportés avec les mêmes métaux pour d'autres bactéries buccales, notamment *Streptococcus mutans* (Almoudi et al. 2018). Pour expliquer ces contradictions, il a été suggéré que certains métaux pourraient être inactivés par des milieux de culture bactériens complexes (Bradshaw et al. 1993) ou que les divergences pourraient être liées aux types de souches microbiennes utilisées (Martínez et al. 2021; Meto et al. 2019).

- Argent

Sous toutes ses formes (Ag^+, CHT/Ag, PCD/Ag), l'argent a présenté dans notre étude un effet bactéricide ou bactériostatique sur *C. albicans* et *E. faecalis*, à des concentrations variant entre 25 mg/mL et 100 mg/mL. Ces valeurs sont cohérentes avec celles rapportées dans la littérature (Cui et al. 2020 ; Freire et al. 2016 ; Kulatunga et al. 2017). Sous forme de NP, l'argent était plus efficace (CMI/CMB plus faibles) que sous forme ionique. Pratsinis et al. ont montré que l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent (AgNP) ainsi que leur toxicité dépendent de leur taille (Pratsinis et al. 2013). Les AgNP d'une taille inférieure à 10 nm ont une plus grande activité antimicrobienne mais également une toxicité plus importante liée à une plus grande surface disponible pour les interactions avec les cellules/microorganismes et une plus grande capacité à pénétrer dans les cellules (Agnihotri et al. 2014; Chatterjee et al. 2015 ; Freire et al. 2016 ; Morones et al. 2005 ; Pratsinis et al. 2013 ; Rai et al. 2009). L'activité des AgNP dépendrait également de leur forme. Les nanoparticules de forme triangulaire seraient plus efficaces que celles de formes sphériques. Ces différences seraient liées à l'effet de la forme sur la charge des nanoparticules et, par conséquent, leur activité antimicrobienne (Freire et al. 2016). La caractérisation détaillée des nanoparticules n'a pas été réalisée dans cette étude puisque les NPs et NPMs ont été obtenues suivant une méthode de routine du laboratoire, utilisée dans d'autres travaux déjà publiés (Mogrovejo-Valdivia et al. 2019).

Pour évaluer l'effet adjuvant de l'argent sur l'activité antimicrobienne du $Ca(OH)_2$, la poudre de $Ca(OH)_2$, a été mélangée avec des solutions d'argent à des concentrations de 1/2 CMI, 1 x CMI et 2 x CMI usuelles dans la littérature (Liu et al. 2019 ; Tavares et al. 2020 ; Yang et al. 2022 ; Vestergaard et al. 2021 ; Zhang et al. 2020). Aucun bénéfice n'a pu être mis en évidence avec cette combinaison par rapport au $Ca(OH)_2$ seul. La littérature est hétérogène en ce qui concerne l'effet adjuvant d'Ag^+ + $Ca(OH)_2$ sur *E. faecalis* et *C.albicans.* Certaines études ont montré un avantage à la combinaison $Ca(OH)_2$ + AgNP, comparable à celui de $Ca(OH)_2$ + CHX 2% (Abirami et al. 2018 ; Balto et al. 2020 ; Halkai et al. 2018b ; Tülü et al. 2021), tandis que d'autres ne rapportent aucun bénéfice (Charannya et al. 2018).

Pour expliquer nos résultats, la quantité d'Ag^+ libérés par la MIC a été dosée par ICP-MS. L'analyse a révélé l'absence d'Ag^+ dans le surnageant après 24 h de contact (< 0,1 µg/L). Des interactions polymère/argent ou polymère/$Ca(OH)_2$, entrainant la formation de complexes insolubles et par conséquent inactifs, pourraient expliquer l'échec de la libération d'Ag^+. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse en utilisant des formulations contenant un plus large panel de doses d'argent sous différentes formes chimiques.

5.1.1.3. Propriétés mécaniques et rhéologiques de la MIC

Les propriétés mécaniques des matériaux d'obturation endodontiques, en particulier les MIC à base de $Ca(OH)_2$, sont peu étudiées dans la littérature (de Freitas et al. 2020 ; Kaplan et al. 2003). Pourtant, elles ont un impact évident sur la performance clinique du matériau. En effet, la manipulation et la mise en place du matériau, sa capacité à s'infiltrer dans les ramifications du canal, sa dégradation et son retrait dépendent des propriétés mécaniques de la formulation. Différentes méthodes validées dans des travaux précédents du laboratoire ont été utilisées pour caractériser en détail les MIC formulées avec l'agent antimicrobien le plus efficace (CHX). Les mesures d'injectabilité, de résistance à la pénétration et le monitorage des variations de masse effectuées, renseignent respectivement sur la facilité de mise en place, le temps de prise du matériau et la capacité d'absorption/perte en eau, qui contribue au gonflement et/ou à la désintégration du matériau (Agossa et al. 2017 ; Sy et al. 2020). L'évaluation du comportement mécanique à l'échelle macroscopique a été complété par une analyse rhéologique approfondie de la formulation la plus prometteuse ($Ca(OH)_2$ + CHX 1%), afin d'étudier l'influence des contraintes mécaniques et de la température sur les propriétés rhéologiques au cours du temps (Chang et al. 2015).

A des doses comprises entre 0,5% et 2% l'ajout de CHX n'entraîne pas de modification significative de la texture de la pâte de $Ca(OH)_2$ évaluée par le test d'injectabilité. L'analyse rhéologique montre un léger effet rhéofluidifiant (G">G') de la CHX sur la pâte de $Ca(OH)_2$, probablement trop faible pour être perceptible avec le test d'injectabilité. Dans l'ensemble, la manipulabilité de la pâte de $Ca(OH)_2$ n'est donc pas significativement modifiée par la CHX. En revanche, le durcissement de la pâte contenant de la CHX est plus lent et sa perte de masse en milieu aqueux plus rapide. Cet effet est dose-dépendant et pourrait être lié à la présence de la CHX sous la forme de sel hydrophile (digluconate) qui favorise l'hydratation du matériau (de Freitas et al. 2020 ; Mohammadi et Abbott 2009). En pratique, l'ajout de CHX pourrait allonger le temps de travail et augmenter la vitesse de dégradation de la pâte de $Ca(OH)_2$, mais *in vivo*, de nombreux autres facteurs tels que l'humidité, la température, les contraintes mécaniques, les bactéries et les enzymes peuvent également influencer la vitesse de dégradation de la MIC (Basturk et al. 2015 ; Schwartz 2006).

5.1.2. Étude *ex vivo* de la diffusion des composés actifs de la médication intracanalaire à travers la racine dentaire et de la réponse des cellules parodontales *in vitro*

5.1.2.1. Diffusion trans-radiculaire des composés actifs de la médication intracanalaire

Modèle d'étude

Les dents extraites sont un bon modèle pour étudier *ex vivo* la performance de matériaux d'obturation canalaire en prenant en compte l'anatomie radiculaire et les propriétés physico-chimiques de la dentine qui peuvent influencer les résultats *in vivo* (Signoretti et al. 2011). Avec ce type de modèle, il a été démontré que la mise en place de $Ca(OH)_2$ dans le canal augmente le pH au niveau de la surface externe de la racine (Carvalho et al. 2016 ; Chamberlain et al. 2009 ; Misra et al. 2017 ; Ximenes et Cardoso 2012). Cette alcalinisation du milieu extra radiculaire pourrait avoir un effet sur la cicatrisation des tissus péri-apicaux. Le rationnel de la combinaison $Ca(OH)_2$ + CHX est d'obtenir une synergie de l'effet antibactérien des deux molécules, qui *in fine*, favorise la cicatrisation péri-apicale. C'est pourquoi nous avons cherché à évaluer non seulement la diffusion des ions (Ca^{2+} et OH^-) issus de la dissolution du $Ca(OH)_2$, mais aussi celle de la CHX incorporée dans la MIC à travers l'apex et les tubules dentinaires. A notre connaissance, aucune étude précédente n'a comparé ces deux voies de diffusion (Aguiar et al. 2015 ; Carvalho et al. 2016).

Milieux de diffusion

D'après nos résultats, les composés actifs de la MIC peuvent diffuser via l'apex et les tubules dentinaires mais la diffusion via les tubules dentinaires est plus de 10 fois plus faible. En moyenne, pour 1 g de pâte injectée, 0,119 mg de CHX est libéré en apical et 0,014 mg en latéral, soit respectivement 1,19% et 0,14% de la quantité de CHX initiale. Il est également intéressant de noter que la diffusion est plus importante au cours des premiers jours (jusqu'à J7) qu'aux temps les plus tardifs (jusqu'à J28) et que la présence de CHX semble amplifier la diffusion d'ions calciums et hydroxyles. Après J7, les quantités d'ions HO^- libérées en apical et en latéral sont similaires, indépendamment de la présence de CHX (figure 28). La quantité de Ca^{2+} libérée, quant à elle, décroit progressivement jusqu'à J28. Dans le groupe contrôle (sans MIC), de légères variations de pH ont été observées qui seraient liées à l'effet tampon de la dentine (Ximenes et Cardoso 2012).

D'autres études ont rapporté des variations similaires des conditions physico-chimiques à la surface externe de la racine (pH et/ou concentration d'ions calcium) entre J7 et J14, liées à ce phénomène de libération rapide et massive d'ions par le $Ca(OH)_2$ (phénomène de « burst ») (Carvalho et al. 2016 ; Chamberlain et al. 2009 ; Jacinto et al. 2015 ; Krüger et al. 2021 ; Misra et al. 2017 ; Ximenes et Cardoso 2012). La CHX semble jouer un rôle important dans le contrôle de la cinétique de libération de la MIC. Carvalho et al. et Tanomaru et al. ont observé que les MIC préparées avec une solution de CHX libèrent d'avantage d'ions HO^- et Ca^{2+} (Carvalho et al. 2016 ; Guerreiro-Tanomaru et al. 2012). Ils attribuent ce phénomène à une dissociation ionique plus rapide avec l'utilisation de CHX sous forme aqueuse (Carvalho et al. 2016 ; Pacios et al. 2004 ; Tanomaru et al. 2003). A l'inverse, lorsque la CHX est utilisée sous forme de gel, le pic de libération des composés actifs est plus tardif (J30) (Duarte et al. 2009 ; Signoretti et al. 2011). Ce retard serait lié à la formation de digluconate de calcium et d'un précipité de CHX peu solubles (Lima et al. 2019 ; Signoretti et al. 2011 ; Ximenes et Cardoso 2012).

La dégradation de la CHX en dérivés potentiellement toxiques tel que la para-chloroaniline (pCA) est décrite dans la littérature (Barbin et al. 2013). Ces métabolites ont été détectés dans des solutions de CHX indépendamment des conditions et de la durée de stockage, la salive de patients après un bain de bouche, des canaux rincés au NaOCl puis à la CHX ou dans des mélanges de $Ca(OH)_2$ + CHX (Barbin et al. 2013). Dans certaines études, seuls les métabolites de la CHX ont pu être dosés à partir du mélange $Ca(OH)_2$ + CHX, suggérant une dégradation complète de la CHX au contact du $Ca(OH)_2$ (Barbin et al. 2013 ; Below et al. 2017 ; Câmara De Bem et al. 2014). Nos résultats ne valident pas cette hypothèse puisque la présence de CHX a été détectée à 7 jours dans le milieu de diffusion de racines remplies de $Ca(OH)_2$ + CHX. Il est possible que le pouvoir tampon de la dentine ait limité ou ralenti la dégradation de la CHX en limitant l'alcalinisation du milieu. Par ailleurs, une revue de littérature récente suggère que la formation de pCA serait d'avantage liée à la forte concentration de CHX qu'aux interactions chimiques avec une autre molécule (Khatib et al. 2020). Le dosage de la CHX

n'était possible que dans certains échantillons (3/10 en apical et 3/10 en latéral). Les facteurs qui expliquent cette variabilité restent à élucider et pourraient être liés aux caractéristiques radiculaire, la technique de dosage ou la dégradation de la molécule.

5.1.2.2. Réponse cellulaire des cellules parodontales aux extraits de médications intracanalaires

Viabilité cellulaire

L'effet des extraits de la MIC sur la viabilité cellulaire a été évalué *in vitro*, sur différents types cellulaires du parodonte, selon une méthode standardisée validée dans la littérature (Krüger et al. 2021 ; Mukhtar-Fayyad 2011 ; Scelza et al. 2012 ; Zhou et al. 2013). Les cellules testées (fibroblastes du LAD, ostéoblastes et cémentoblastes) forment les tissus du parodonte profond et seraient de ce fait, *in vivo,* en contact avec les composés actifs de la MIC qui diffuseraient à travers la racine (Bosshardt 2005). Le pourcentage de viabilité cellulaire précoce (J1) traduit la cytotoxicité immédiate, tandis que de J3 à J7, ce sont les effets sur l'étalement et la prolifération cellulaire qui sont évalués (Marracino et al. 2022). Par convention, un taux de viabilité cellulaire de 80% minimum traduit une bonne tolérance cellulaire au produit testé (ISO- 10993-5-2009). Les extraits de $Ca(OH)_2$ purs, avec ou sans CHX, étaient moins bien tolérés que les extraits dilués et leur toxicité tend à augmenter logiquement avec le temps de contact et la dose de CHX. L'effet des extraits dilués est plus variable selon le type de cellules et le niveau de dilution. Des observations similaires sont rapportées dans des études précédentes (Abbaszadegan et al. 2016 ; da Silva et al. 2008b ; Sirén et al. 2004 ; Yadlapati et al. 2014). L'effet de gradient lié à la dose de CHX est très inconstant. Par exemple, à J3 sur les cémentoblastes, la viabilité cellulaire tend à décroitre logiquement lorsque la quantité de CHX augmente, alors que la tendance inverse est observée sur le même type de cellule avec une dilution à 1/10^{e}. Cette variabilité est difficile à expliquer et pourrait être liée d'une part, aux aléas de la culture cellulaire (changement de pH) et à la fiabilité de la technique de mesure (tributaire de la présence de réductases dans les composants subcellulaires) (Rampersad 2012). D'autre part, il est important de mentionner que les quantités de CHX (ou d'autres composés actifs) réellement contenues dans les extraits testés sur les cellules sont inconnues. Notre hypothèse est qu'elles sont, en théorie, corrélées à la quantité de CHX incorporée dans la MIC à partir de laquelle les extraits (surnageants) ont été préparés. En réalité, elles pourraient varier selon le profil de libération propre à chaque formulation. Le dosage de la quantité réelle de CHX (ou d'autres composés) dans les extraits pourrait potentiellement apporter un éclairage complémentaire sur la variabilité de la réponse cellulaire. Toutefois, dans l'ensemble, les taux de viabilité observés avec les extraits avec ou sans CHX, dilués à 1/2 ou au 1/10^{e}, sont quasi systématiquement > 80%.

En conclusion, dans l'ensemble, les taux de viabilité cellulaire au contact d'extraits avec ou sans CHX, dilués à 1/2 ou au 1/10^{e}, sont quasi systématiquement >80% ce qui indique que de faibles doses de CHX ont un effet négligeable sur la toxicité des MIC à base de $Ca(OH)_2$.

Potentiel de minéralisation

Des observations cliniques et chez l'animal soutiennent l'effet positif du $Ca(OH)_2$ sur la cicatrisation de divers défauts osseux, y compris des LIPOE (De Rossi et al. 2005 ; Leonardo et al. 2006). Cependant, les connaissances du mode d'action du $Ca(OH)_2$ sur les cellules parodontales restent limitées. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer l'effet des extraits de MIC sur le potentiel de minéralisation de cémentoblastes et d'ostéoblastes, qui composent les tissus minéralisés du parodonte (Bosshardt 2005). Les méthodes utilisées (activité de la phosphatase alcaline et marquage/quantification des nodules de calcium) sont des méthodes traditionnelles pour étudier le potentiel de minéralisation de cellules en culture (Arceo et al. 1991 ; Groeneveld et al. 1995). Il a été démontré que l'activité de la phosphatase alcaline joue un rôle précoce dans l'initiation de la minéralisation de la matrice extracellulaire en facilitant la précipitation et la croissance des cristaux (Bonucci 2007). Plusieurs études ont également rapporté la formation de nodules de minéralisation sur des cultures d'ostéoblastes qui seraient le reflet du processus de minéralisation observé *in vivo* (Arceo et al. 1991).

Les cémentoblastes exposés aux échantillons purs ont une activité de l'ALP nulle ou très faible (cf. données complémentaires Annexes 1. page 126) qui s'explique vraisemblablement par la toxicité de l'extrait qui entraîne une réduction importante du nombre de cellules viables (figures 32). Les extraits dilués n'ont montré aucun effet sur l'activité de l'ALP des cémentoblastes par rapport au milieu de culture seul. L'expression de l'activité de l'ALP des cémentoblastes est une question controversée. Les cémentoblastes dérivés de cémentomes expriment, au même titre que d'autres tumeurs, une forte activité de l'ALP (Arzate et al. 1992 ; Hofmann et al. 1989 ; Nishimura et al. 1982), mais cette caractéristique pourrait être liée à leur origine tumorale. En effet, plusieurs autres études ont conclu à une activité de l'ALP nulle ou très faible des cémentoblastes d'origine humaine, murine ou bovine en culture et sur des coupes histologiques (Blomlöf et Lindskog 1994 ; Gao et al. 1999 ; Grzesik et al. 1998 ; Tenorio et al. 1993). Ceci pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé d'effet de la stimulation par le $Ca(OH)_2$ sur l'activité des cémentoblastes. La perte (ou la forte réduction) de certaines activités enzymatiques dans les cellules mises en culture, une origine embryologique potentiellement différente des ostéoblastes ou des mécanismes de minéralisation différents pourraient expliquer la production faible (ou nulle) d'ALP par les cémentoblastes en culture (Gao et al. 1999). Enfin, il est important d'indiquer que la production d'ALP et son expression génique (non étudiée ici) ne sont pas nécessairement corrélées (Gao et al. 1999). Des études complémentaires sont

nécessaires pour clarifier les mécanismes par lesquels le $Ca(OH)_2$ avec ou sans CHX pourrait affecter la réponse biologique des cémentoblastes.

Sur les ostéoblastes, seuls les extraits de $Ca(OH)_2$ non dilués semblent augmenter l'activité de la phosphatase alcaline (cf. données complémentaires Annexes 1. page 126) mais ces résultats sont difficilement interprétables au vu de la cytotoxicité des extraits de $Ca(OH)_2$ purs constatée sur les ostéoblastes (figure 33). Les extraits dilués n'ont eu aucun effet. Selon Narita et al., l'effet du $Ca(OH)_2$ sur la minéralisation des ostéoblastes est dose-dépendant. A faible concentration (0,025 mg/mL) la minéralisation n'a pas lieu tandis qu'à une concentration 10 fois supérieure elle est observée (Narita et al. 2010). En revanche, à 2,5 mg/mL, aucun effet pro-minéralisant n'est observé en raison de la toxicité de l'extrait. Fait intéressant, les mêmes auteurs ont rapporté que la minéralisation est plus importante à pH neutre 7,4 qu'en milieu alcalin. Ceci suggère que l'effet pro-minéralisant du $Ca(OH)_2$ sur la minéralisation serait d'avantage lié aux ions calcium qui activent différents récepteurs et voies de signalisation (CaSR [Ca^{2+}-sensing receptor] ; JNK [c-Jun N-terminal kinase] ; p38 [p38 mitogen-activated protein kinase]), qu'à la concentration d'ions hydroxyles (Narita et al. 2010 ; Yamaguchi et al. 2000 ; Yamauchi et al. 2005).

Aucun effet significatif des extraits de $Ca(OH)_2$ (avec ou sans CHX) sur la production de nodules de minéralisation *in vitro* n'a pu être mis en évidence. Ces résultats sont similaires à ceux de da Silva et al. qui n'observent aucune différence entre $Ca(OH)_2$, $Ca(OH)_2$ + 0,4% CHX et le groupe contrôle, en termes d'activité de l'ALP ou de formation du nombre de nodules osseux sur des cultures d'ostéoblastes de calvaria de rats (da Silva et al. 2008a).

En conclusion, l'effet de la combinaison $Ca(OH)_2$ + CHX à faible dose sur le potentiel de minéralisation des ostéoblastes et des cémentoblastes semble négligeable.

Réponse inflammatoire

La destruction tissulaire dans les LEP (comme dans les LIPOE ou les parodontites) est en grande partie liée à la réponse inflammatoire induite par les bactéries et leurs sous-produits (Duque et al. 2019 ; Graves et al. 2011 ; Karteva et Manchorova-Veleva 2020). Le lipopolysaccharide (LPS) est un des principaux facteurs de virulence bactérienne, dont la présence dans les poches et le canal est corrélée à l'activité et la progression des lésions endodontiques et parodontales (Cardoso et al. 2015 ; Gomes et al. 2012). C'est également un des éléments clés de l'activation de la cascade inflammatoire, de par sa capacité à induire la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, et IL-12 (Fujihara et al. 2003). Il a été démontré que la mise en place de $Ca(OH)_2$ dans le canal est associée à une réduction de la charge bactérienne et de la quantité de LPS dans les poches parodontales, probablement liée à la diffusion de composés actifs à travers la racine dentaire (Duque

et al. 2019 ; Tanomaru et al. 2003). Nos résultats montrent que : (i) les extraits de $Ca(OH)_2$ tendent à réduire la production de TNF-α et d'IL-6 par les fibroblastes du ligament parodontal, préalablement stimulés par le LPS de *P. gingivalis* (-24% pour le TNF-α et -13% pour l'IL-6) ; (ii) cette réduction est plus marquée en présence de CHX (-37% pour le TNF-α et -70% pour l'IL-6). Ces observations pourraient s'expliquer par la capacité du $Ca(OH)_2$ à réprimer en amont l'expression génique de certains médiateurs de l'inflammation (TNF-α, IL-6) (Khan et al. 2008 ; Meng et al. 2016) ou a les dénaturer une fois sécrétés (IL-1β, TNF-α), probablement par hydrolyse alcaline des liaisons amides (Voel et al. 1999). Ce dernier mécanisme est cohérent avec la réduction plus marquée en présence de CHX puisque la CHX potentialise la dissociation du $Ca(OH)_2$, ce qui augmente l'alcalinité du milieu (figure 28).

En conclusion, nos résultats soutiennent l'hypothèse que la dégradation locale des médiateurs pro-inflammatoires en milieu basique serait un des mécanismes anti-inflammatoires par lesquels le $Ca(OH)_2$ contribue à la cicatrisation des lésions inflammatoires péri-apicales.

5.2. Perspectives de la médication intracanalaire dans le traitement des lésions endo-parodontales

La MIC à base de $Ca(OH)_2$ fait partie depuis longtemps de l'arsenal thérapeutique en endodontie et son usage s'appuie sur plus d'un siècle de données probantes. Entre les années 2000 et 2010, environ deux tiers des praticiens déclaraient l'utiliser en routine (Hommez et al. 2003 ; Palmer et al. 2009). Pourtant, son utilisation est de plus en plus controversée et tend à décliner. Cette tendance est liée aux études publiées ces dernières décennies qui ont montré que les traitements canalaires en une seule séance (donc sans MIC) ou en plusieurs sessions donnaient des résultats comparables, en termes de suites opératoires ou de cicatrisation (Manfredi et al. 2016 ; Molander et al. 2007 ; Paredes-Vieyra et Enriquez 2012 ; Penesis et al. 2008 ; Sathorn et al. 2007 ; Sirén et al. 2004 ; Trope et al. 1999). Certains y voient le retour de concepts anciens selon lesquels « le succès du traitement endodontique dépend davantage de ce que l'on retire du canal, que de ce que l'on y met » (Ordinola-Zapata et al. 2022). D'autres l'interprètent comme le résultat des progrès de ces dernières décennies, en matière d'instrumentation chimio-mécanique et d'aides optiques, qui permettent désormais de réaliser des traitements performants en une seule séance, même dans des cas complexes (Ordinola-Zapata et al. 2022). Dans ce contexte, s'interroger sur les perspectives de la MIC dans le traitement endodontique et *a fortiori* endo-parodontal semble pertinent. Pour justifier l'intérêt des MIC, des études futures devront :

(i) Clarifier les indications de la MIC et mieux comprendre son effet biologique

(ii) Optimiser les MIC existantes et/ou développer des MIC de nouvelle génération

Clarifier les indications de la MIC et mieux comprendre ses effets biologiques

Le manque de bénéfice perçu des MIC dans les études cliniques est potentiellement lié, au moins en partie, à un système de diagnostic inapproprié, basé uniquement sur la présence ou l'absence d'une lésion apicale (ou endo-parodontale).

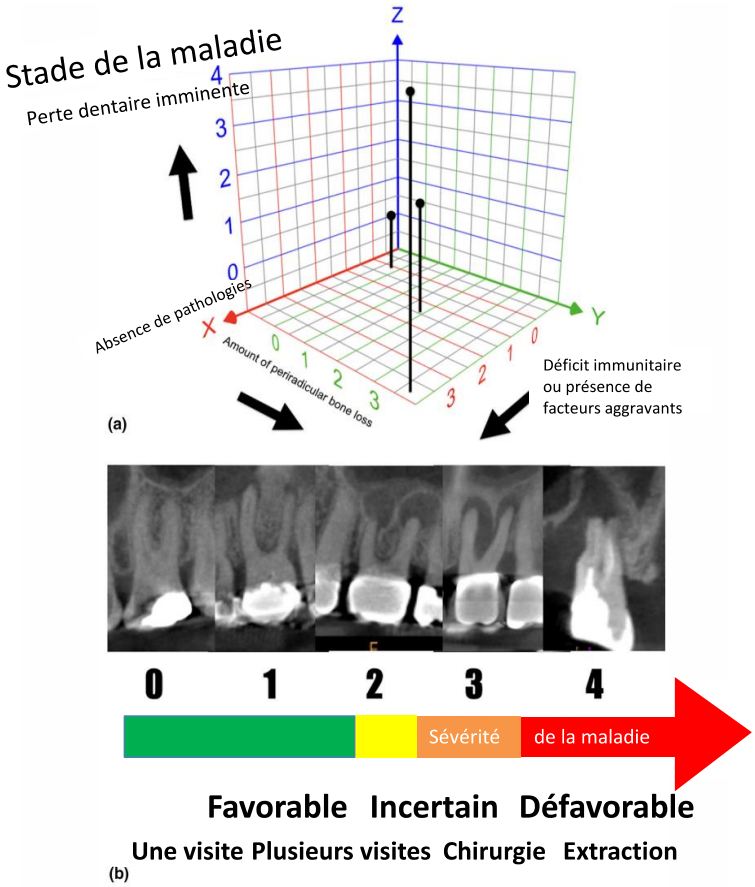


Figure 40. Pré-stadification de la sévérité de la lésion endo-parodontale : (a) mesure de la gravité de l'état d'un patient à un moment donné ; (b) la gravité de la perte osseuse péri-radiculaire (Ordinola-Zapata et al. 2022).

Malgré les tentatives multiples de classification, aucun système n'intègre véritablement les facteurs pronostiques de succès du traitement, pourtant déterminants pour guider le choix thérapeutique. La récente classification des LEP proposée par la fédération européenne de parodontologie (EFP) et l'académie américaine de parodontologie (AAP), qui intègre notamment l'étendue de la lésion et l'intégrité radiculaire, est certainement une avancée intéressante à ce titre (Herrera et al. 2018 ; Papapanou et al. 2018). Cependant, des critères comme l'état médical, les facteurs de risque ou la symptomatologie du patient n'y figurent pas. Ces éléments pourraient contribuer à distinguer une lésion isolée « simple » d'une situation complexe qui peut justifier une stratégie anti infectieuse plus intensive (figure 40). En effet, certains critères généraux (âge, tabac,

comorbidités, médications) ou locaux (taille de la lésion, présence d'une communication parodontale) ont été identifiés comme des facteurs pronostiques du succès du traitement canalaire (Ordinola-Zapata et al. 2022). Des études cliniques basées sur des classifications qui intègrent ces critères pourraient permettre de mieux cibler les situations et les profils pour lesquels des médications endodontiques adjuvantes telles que les MIC sont pertinentes.

Par ailleurs, il est clair que les mécanismes biologiques qui expliquent les effets tissulaires des MIC sont encore mal compris. Les limites des modèles de culture cellulaire traditionnels utilisés jusqu'ici sont évidentes et d'autres approches sont nécessaires. Récemment, des systèmes ont été proposés qui combinent un modèle de diffusion à travers la racine (ou un cône en plastique) à la culture cellulaire, ce qui permet de stimuler les cellules dans des conditions plus proches de la réalité *in vivo* (figure 41) (De-Deus et al. 2009 ; Pintor et al. 2021). Les modèles animaux sont largement répandus pour étudier la parodontite mais à notre connaissance, une seule étude décrit un modèle murin de LEP, obtenu en combinant l'infection du canal avec un défaut parodontal créé chirurgicalement. Des modèles animaux adaptés, associant par exemple infections canalaire et parodontale, seraient très utiles pour comprendre la physiopathologie des LEP et la réponse des tissus parodontaux en présence de MIC.

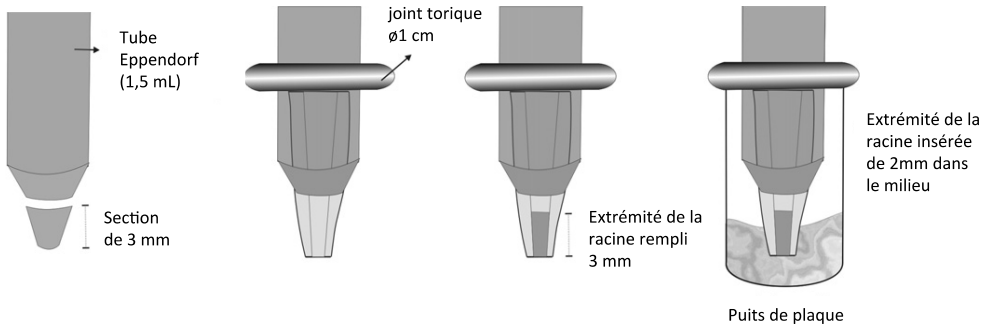


Figure 41. Exemple de modèle expérimental de diffusion, dans lequel le matériau d'obturation de l'extrémité de la racine testée est en suspension dans un milieu de culture sur une plaque de 48 puits (D'après De-Deus et al. 2009).

Optimiser les MIC existantes et/ou développer des MIC de nouvelle génération

La possibilité de faire diffuser des composés actifs placés dans le canal radiculaire vers l'extérieur de la dent offre l'opportunité de faire évoluer la médication intra-canalaire du statut de thérapeutique endodontique, vers celui de médication trans-dentinaire qui trouve logiquement un intérêt dans le traitement des lésions endo-parodontales. Pour cela, il est nécessaire d'optimiser la performance de ces médications comme vecteur de libération prolongée de principes actifs. Cette perspective implique d'une part, un meilleur contrôle de la cinétique de libération des composés actifs

et des interactions chimiques au sein du matériau qui pourraient dégrader les composés actifs ou freiner leur libération. Par exemple, le $Ca(OH)_2$ pourrait entraîner la dégradation de la CHX (Barbin et al. 2013). La forme galénique de la CHX (gel, huile, solution aqueuse) pourrait également limiter la dissociation du $Ca(OH)_2$ en ions Ca^{2+} et OH^- et altérer potentiellement son efficacité (Duarte et al. 2014 ; Lima et al. 2019 ; Signoretti et al. 2011 ; Ximenes et Cardoso 2012). Des recherches complémentaires sont attendues pour aboutir à des systèmes performants de libération prolongée de principes actifs à l'interface endo-parodontale. Par ailleurs, la complexité de la physiopathologie des pathologies endodontiques et parodontales offre un large panel de cibles moléculaires potentielles pour moduler la réponse inflammatoire et la destruction tissulaire. Certaines molécules innovantes ont déjà montré des résultats prometteurs pour une application endo-parodontale. Parmi elles, les peptides antimicrobiens ont récemment montré un effet antimicrobien supérieur à celui du $Ca(OH)_2$ sur *E. faecalis* (Hirt et al. 2018 ; Lee et Baek 2012 ; Lee et al. 2013 ; Winfred et al. 2014). Une étude très récente montre également l'effet positif des amélogénines, utilisées comme médication intracanalaires, sur la cicatrisation apicale et la régénération pulpaire (Mounir et al. 2022). La combinaison de plusieurs agents antimicrobiens entre eux ou avec des molécules pro-régénératrices (facteurs de croissance, amélogénines etc.) au sein d'une MIC est une piste prometteuse pour de futures recherches.

6. CONCLUSION

6. CONCLUSION

Le but de cette étude expérimentale était de contribuer à la compréhension des mécanismes par lesquels une médication intracanalaire (MIC) peut avoir un effet à l'extérieur de la racine dentaire, afin d'étayer le rationnel de leur utilisation dans le traitement des lésions endo parodontales.

Dans un premier temps nous avons optimisé une MIC à base d'hydroxyde de calcium en y ajoutant différents agents antimicrobiens dans le but de potentialiser son action antimicrobienne. Nous avons ainsi montré que parmi les antimicrobiens testés, seule la chlorhexidine améliore significativement l'activité de la pâte d'hydroxyde de calcium sur les microorganismes cibles (*E. faecalis*, *C. albicans*, et *P. gingivalis)*, fréquemment retrouvés dans les LEP, sans modifier globalement les propriétés mécaniques de la formulation. Nos résultats ne soutiennent pas l'utilisation de métaux antimicrobiens ou de nanoparticules métalliques fabriquées à partir de polymères (CHT ou PCD) comme adjuvants antimicrobiens dans la formulation de MIC à base de $Ca(OH)_2$.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la capacité de la MIC de $Ca(OH)_2$ + CHX à libérer des composés actifs à travers la racine dentaire et son effet sur la réponse de cellules parodontales. D'une part, nos résultats montrent que les MIC à base de $Ca(OH)_2$ modifient effectivement les conditions physico-chimiques à l'extérieur de la racine par diffusion d'ions (Ca^{2+}, OH^-) et de CHX via l'apex et, dans une moindre mesure, les tubules dentinaires. La diffusion trans-radiculaire de composés actifs par la MIC est rapide et atteint son pic à 7 jours avec des variations de profils de libération qui dépendent de la dose de CHX. D'autre part, les extraits de $Ca(OH)_2$ dilués (avec ou sans CHX) sont bien tolérées par les cellules parodontales *in vitro* et semblent réduire la production de médiateurs inflammatoires. En revanche, aucun effet significatif sur le potentiel de minéralisation précoce ou tardif n'a pu être mis en évidence. Dans l'ensemble, les résultats de cette étude soutiennent la faisabilité de l'utilisation de MIC comme vecteur pour la libérer des composés bioactifs à travers la racine et ouvrent des perspectives prometteuses pour le traitement des LEP.

L'originalité de ce travail de recherche expérimentale à visée clinique réside dans la caractérisation des effets à la fois microbiologiques, physico-chimiques et biocellulaires de différentes thérapeutiques pharmacologiques à l'aide de modèles complémentaires. Par ailleurs, l'étude de systèmes sans antibiotiques se veut une contribution à la gestion de la question de l'antibiorésistance. Des études complémentaires sur des modèles animaux sont nécessaires pour approfondir la compréhension de l'effet biologique des MIC sur le parodonte et optimiser la performance de ces médications comme système innovant de libération de principes actifs pour le traitement des lésions endo-parodontales.

7. BIBLIOGRAPHIE

7. BIBLIOGRAPHIE

Aars H, Brodin P, Andersen E. 1993. « A Study of Cholinergic and Beta-Adrenergic Components in the Regulation of Blood Flow in the Tooth Pulp and Gingiva in Man ». *Acta Physiologica Scandinavica.*148 (4): 441-47. https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1993.tb09580.x.

Abbaszadegan A, Dadolahi S, Gholami A, Moein MR, Hamedani S, Ghasemi Y, et al. 2016. « Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Cinnamomum Zeylanicum, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Material ». *The Journal of Contemporary Dental Practice* 17 (2): 105-13. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1811.

Abbott PV. 1998. « Endodontic Management of Combined Endodontic-Periodontal Lesions ». *Journal of the New Zealand Society of Periodontology* 83: 15-28.

Abbott PV, Salgado JC. 2009. « Strategies for the Endodontic Management of Concurrent Endodontic and Periodontal Diseases ». *Australian Dental Journal* 54 Suppl 1: S70-85. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01145.x.

Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Gohari A, Farimani MM, Rivière C, et al. 2014. « Antimicrobial Activity of Selected Iranian Medicinal Plants against a Broad Spectrum of Pathogenic and Drug Multiresistant Micro-Organisms ». *Letters in Applied Microbiology* 59 (4): 412-21. https://doi.org/10.1111/lam.12294.

Abirami V, A. SA, Bhavani S, Rajaraman G. 2018. « Comparative evaluation of anti-bacterial efficacy of silver nanoparticle, nanoparticle calcium hydroxide and calcium hydroxide against enterococcus faecalis biofilm- An In vitro study ». *International Journal of Dental Research* 6(2): 57. https://doi.org/10.14419/ijdr.v6i2.13743.

Abou ElReash A, Hamama H, Comisi JC, Zaeneldin A, Xiaoli X. 2021. « The Effect of Retrograde Material Type and Surgical Techniques on the Success Rate of Surgical Endodontic Retreatment: Systematic Review of Prospective Randomized Clinical Trials ». *BMC Oral Health* 21 (1): 375. https://doi.org/10.1186/s12903-021-01731-9.

Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJ. 2015. « Antibiofilm Efficacy of Silver Nanoparticles as a Vehicle for Calcium Hydroxide Medicament against Enterococcus Faecalis ». *Journal of Dentistry* 43 (12): 1573-79. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.08.01.

Aghatabay NM, Neshat A, Karabiyik T, Somer M, Haciu D, et Dülger B. 2007. « Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Fe(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II) Complexes with 2,6-Bis(Benzimidazol-2-Yl) Pyridine Ligand ». European Journal of Medicinal Chemistry 42 (2): 205-13. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.09.023.

Agnihotri S, Soumyo M, Suparna M. 2014. « Size-Controlled Silver Nanoparticles Synthesized over the Range 5–100 Nm Using the Same Protocol and Their Antibacterial Efficacy ». *RSC Advances* 4 (8): 3974-83. https://doi.org/10.1039/C3RA44507K.

Agossa K, Lizambard M, Rongthong T, Delcourt-Debruyne E, Siepmann J, Siepmann F. 2017. « Physical Key Properties of Antibiotic-Free, PLGA/HPMC-Based in-Situ Forming Implants for Local Periodontitis Treatment ». *International Journal of Pharmaceutics* 521 (1-2): 282-93. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.02.039.

Agossa K, Roman L, Gosset M, Yzet C, Mathurin Fumery. 2021. « Periodontal and Dental Health in Inflammatory Bowel Diseases: A Systematic Review ». *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 1-15. https://doi.org/10.1080/17474124.2021.1952866.

7. BIBLIOGRAPHIE

Aguiar AS, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria G, Leonardo RT, Tanomaru-Filho M. 2015. « Antimicrobial Activity and PH of Calcium Hydroxide and Zinc Oxide Nanoparticles Intracanal Medication and Association with Chlorhexidine ». *The Journal of Contemporary Dental Practice* 16 (8): 624-29. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1732.

Ahmed HMA. 2012. « Different perspectives in understanding the pulp and periodontal intercommunications with a new proposed classification for endo-perio lesions ». *ENDO (Lond Engl)* 6 (2): 87-104.

Ahrari F, Eslami N, Rajabi O, Ghazvini K, Barati S. 2015. « The Antimicrobial Sensitivity of Streptococcus Mutans and Streptococcus Sangius to Colloidal Solutions of Different Nanoparticles Applied as Mouthwashes ». *Dental Research Journal* 12 (1): 44-49. https://doi.org/10.4103/1735-3327.150330.

Aksel H, Serper A. 2014. « A Case Series Associated with Different Kinds of Endo-Perio Lesions ». *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 6 (1): e91-95. https://doi.org/10.4317/jced.51219.

Al-Fouzan KS. 2014. « A New Classification of Endodontic-Periodontal Lesions ». *International Journal of Dentistry* 2014: 919173. https://doi.org/10.1155/2014/919173.

Alhadainy HA. 1994. « Root Perforations. A Review of Literature ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 78 (3): 368-74. https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90070-1.

AlJasser R, Bukhary S, AlSarhan M, Alotaibi D, AlOraini S, Habib SR. 2021. « Regenerative Therapy Modality for Treatment of True Combined Endodontic-Periodontal Lesions: A Randomized Controlled Clinical Trial ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18 (12): 6220. https://doi.org/10.3390/ijerph18126220.

Almoudi MM, Hussein AS, Abu Hassan MI, Mohamad Zain N. 2018. « A Systematic Review on Antibacterial Activity of Zinc against Streptococcus Mutans ». *The Saudi Dental Journal* 30 (4): 283-91. https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.06.003.

Almutairi W, Aminoshariae A, Williams K, Mickel A. 2021. « The Validity of Pulp Tests on Crowned Teeth: A Clinical Study ». *European Endodontic Journal*. 22;6(2):151–4. https://doi.org/10.14744/eej.2020.94840.

Alquthami H, Almalik AM, Alzahrani FF, Badawi L. 2018. « Successful Management of Teeth with Different Types of Endodontic-Periodontal Lesions ». *Case Reports in Dentistry* 2018: 7084245. https://doi.org/10.1155/2018/7084245.

Altaf A, Jeelani M, Basher A. 2019. « Assessment of Prevalence of Endo-Perio Lesions among Patients of Known Population: An Observational Study ». *International Journal of Applied Dental Sciences* 5 (3): 111-13.

Alves MJ, Grenho L, Lopes C, Borges J, Vaz F, Vaz IP, et al. 2018. « Antibacterial Effect and Biocompatibility of a Novel Nanostructured ZnO-Coated Gutta-Percha Cone for Improved Endodontic Treatment ». *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications* 92: 840-48. https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.045.

Anand V, Govila V, Gulati M. 2012. « Endo-Perio Lesion: Part II (The Treatment) – A Review ». Archives of Dental Sciences, 3(1): 10-16.

Anton Paar. https://www.anton-paar.com/fr-fr/. Consulté le 25 septembre 2021.

7. BIBLIOGRAPHIE

Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ. 1991. « Human Periodontal Cells Initiate Mineral-like Nodules in Vitro ». *Journal of Periodontology* 62 (8): 499-503. https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.8.499.

Arruda MEF, Neves MAS, Diogenes A, Mdala I, Guilherme BPS, Siqueira JF Jr, et al. 2018. « Infection Control in Teeth with Apical Periodontitis Using a Triple Antibiotic Solution or Calcium Hydroxide with Chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial ». *Journal of Endodontics* 44 (10): 1474-79. https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.07.001.

Arzate, H., Olson SW, Page RC, Narayanan AS. 1992. « Isolation of Human Tumor Cells That Produce Cementum Proteins in Culture ». *Bone and Mineral* 18 (1): 15-30. https://doi.org/10.1016/0169-6009(92)90796-g. https://doi.org/10.1016/0169-6009(92)90796-g.

Attarilar S, Yang J, Ebrahimi M, Wang Q, Liu J, Tang Y, et al. 2020. « The Toxicity Phenomenon and the Related Occurrence in Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Brief Review From the Biomedical Perspective ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 17;8: 822.

Bago Jurič I, Plečko V, Anić I, Pleško S, Jakovljević S, Rocca JP, et al. 2016. « Antimicrobial Efficacy of Photodynamic Therapy, Nd:YAG Laser and QMiX Solution against Enterococcus Faecalis Biofilm ». *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 13: 238-43. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.07.176.

Bahrami G, Vaeth M, Kirkevang LL, Wenzel A, Isidor F. 2008. « Risk Factors for Tooth Loss in an Adult Population: A Radiographic Study ». *Journal of Clinical Periodontology* 35 (12): 1059-65. https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01328.x.

Balto H, Bukhary S, Al-Omran O, BaHammam A, Al-Mutairi B. 2020. « Combined Effect of a Mixture of Silver Nanoparticles and Calcium Hydroxide against Enterococcus Faecalis Biofilm ». *Journal of Endodontics*, 46(11):1689-1694. https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.07.001.

Bano I, Arshad M, Yasin T, Ghauri MA, Younus M. 2017. « Chitosan: A Potential Biopolymer for Wound Management ». *International Journal of Biological Macromolecules* 102: 380-83. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.047.

Barbin LE, Estrela C, Guedes DF, Spanó JC, Sousa-Neto MD, Pécora JD. 2013. « Detection of Para-Chloroaniline, Reactive Oxygen Species, and 1-Chloro-4-Nitrobenzene in High Concentrations of Chlorhexidine and in a Mixture of Chlorhexidine and Calcium Hydroxide ». *Journal of Endodontics* 39 (5): 664-68. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.10.018.

Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. 2003. « Efficacy of Chlorhexidine- and Calcium Hydroxide-Containing Medicaments against Enterococcus Faecalis in Vitro ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 96 (5): 618-24. https://doi.org/10.1016/s1079-2104(03)00166-5.

Basturk FB, Nekoofar MH, Gunday M, Dummer PM. 2015. « Effect of Varying Water-to-Powder Ratios and Ultrasonic Placement on the Compressive Strength of Mineral Trioxide Aggregate ». *Journal of Endodontics* 41 (4): 531-34. https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.022. https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.022.

Below, H, Assadian O, Baguhl R, Hildebrandt U, Jäger B, Meissner K, et al. 2017. « Measurements of Chlorhexidine, p-Chloroaniline, and p-Chloronitrobenzene in Saliva after Mouth Wash before and after Operation with 0.2% Chlorhexidine Digluconate in Maxillofacial Surgery: A Randomised Controlled Trial ». The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 55 (2): 150-55.

https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2016.10.007.

Bender IB, Seltzer S. 1972. « The Effect of Periodontal Disease on the Pulp ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 33 (3): 458-74. doi.org/10.1016/0030-4220(72)90476-8.

Bergenholtz G, Nyman S. 1984. « Endodontic Complications Following Periodontal and Prosthetic Treatment of Patients with Advanced Periodontal Disease ». *Journal of Periodontology* 55 (2): 63-68. https://doi.org/10.1902/jop.1984.55.2.63.

Blanchemain N, Karrout Y, Tabary N, Bria M, Neut C, Hildebrand HF, et al. 2012. « Comparative Study of Vascular Prostheses Coated with Polycyclodextrins for Controlled Ciprofloxacin Release ». *Carbohydrate Polymers* 90 (4): 1695-1703. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.052.

Blanscet ML, Tordik PA, Goodell GG. 2008. « An Agar Diffusion Comparison of the Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide at Five Different Concentrations with Three Different Vehicles ». *Journal of Endodontics* 34 (10): 1246-48. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.012.

Blomlöf L, Lengheden A, Lindskog S. 1992. « Endodontic infection and calcium hydroxide-treatment. effects on periodontal healing in mature and immature replanted monkey teeth ». *Journal of Clinical Periodontology* 19 (9 Pt 1): 652-58. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1992.tb01714.x.

Bonaccorso. 2014. « Endo-perio lesion: diagnosis, prognosis and decision-making. » *Endod (Lond Eng)* 8(2): 105-127. Consulté le 14 juillet 2022.

Bonev B, Hooper J, Parisot J. 2008. « Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61 (6): 1295-1301. https://doi.org/10.1093/jac/dkn090.

Bonucci E, éd. 2007. « Main suggested calcification mechanisms: cells ». In *Biological Calcification: Normal and Pathological Processes in the Early Stages*, 491-506. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-36013-1_17.

Bosshardt DD. 2005. « Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? » *Journal of Dental Research* 84 (5): 390-406. https://doi.org/10.1177/154405910508400501.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Cummins D. 1993. « The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro ». *Journal of Dental Research* 72 (1): 25-30. https://doi.org/10.1177/00220345930720010301.

Bravard M, Agossa K. 2021 « Repousser les limites du traitement des lésions infra-osseuses sévères en combinant techniques régénératives et greffe conjonctive : preuve de concept ». L'Information Dentaire. Consulté le 7 août 2022. https://www.information-dentaire.fr/formations/repousser-les-limites-du-traitement-des-lsions-infra-osseuses-svres-en-combinant-techniques-rgnratives-et-greffe-conjonctive-preuve-de-conce/.

Britain SK, Arx Tv, Schenk RK, Buser D, Nummikoski P, Cochran DL, et al. 2005. « The use of guided tissue regeneration principles in endodontic surgery for induced chronic periodontic-endodontic lesions: a clinical, radiographic, and histologic evaluation ». *Journal of Periodontology* 76 (3): 450-60. https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.3.450.

Cabanillas-Balsera D, Segura-Egea JJ, Bermudo-Fuenmayor M, Martín-González J, Jiménez-Sánchez MC, Areal-Quecuty V, et al. 2020. « Smoking and radiolucent periapical lesions in root filled teeth:

systematic review and meta-analysis ». *Journal of Clinical Medicine* 9 (11): E3506. https://doi.org/10.3390/jcm9113506.

Câmara De Bem, Samuel Henrique, Carlos Estrela, Débora Fernandes Costa Guedes, Manoel Damião Sousa-Neto, et Jesus Djalma Pécora. 2014. « Determination of Chemical Components Derived from 2% Chlorhexidine Gel Degradation Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry ». *Acta Odontologica Scandinavica* 72 (8): 630-38. https://doi.org/10.3109/00016357.2014.880941.

Carapeto AP, Ferraria AM, do Rego AMB. 2017. « Unraveling the reaction mechanism of silver ions reduction by chitosan from so far neglected spectroscopic features ». *Carbohydrate Polymers* 174 : 601-9. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.100.

Carbajal Mejía JB. 2014. « Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on enterococcus faecalis and candida albicans ». *Journal of Investigative and Clinical Dentistry* 5 (3): 194-200. https://doi.org/10.1111/jicd.12041.

Cardoso FG, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LR Jr, Rocco MA, et al. 2015. « Correlation between volume of apical periodontitis determined by cone-beam computed tomography analysis and endotoxin levels found in primary root canal infection ». *Journal of Endodontics* 41 (7): 1015-19. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.005.

Carvalho CN, Freire LG, Carvalho AP, Duarte MA, Bauer J, Gavini G. 2016. « Ions release and ph of calcium hydroxide-, chlorhexidine- and bioactive glass-based endodontic medicaments ». *Brazilian Dental Journal* 27 : 325-31. https://doi.org/10.1590/0103-6440201600602.

Chamberlain TM, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. 2009. « PH changes in external root surface cavities after calcium hydroxide is placed at 1, 3 and 5 mm short of the radiographic apex ». *Dental Traumatology: Official Publication of International Association for Dental Traumatology* 25 (5): 470-74. https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2009.00806.x.

Chang SW, Lee YK, Zhu Q, Shon WJ, Lee WC, Kum KY, et al. 2015. « Comparison of the Rheological Properties of Four Root Canal Sealers ». *International Journal of Oral Science* 7 (1): 56-61. https://doi.org/10.1038/ijos.2014.33.

Charannya S, Duraivel D, Padminee K, Poorni S, Nishanthine C, Srinivasan MR. 2018. « Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles and 2% Chlorhexidine Gluconate When Used Alone and in Combination Assessed Using Agar Diffusion Method: An In Vitro Study ». *Contemporary Clinical Dentistry* 9 (Suppl 2): S204-9. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_869_17.

Chatterjee T, Chatterjee BK, Majumdar D, Chakrabarti P. 2015. « Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles and the Modeling of Bacterial Growth Kinetics Using a Modified Gompertz Model ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1850 (2): 299-306. https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.022.

Cho MI, Garant PR. 2000. « Development and General Structure of the Periodontium ». *Periodontology 2000* 24: 9-27. https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240102.x.

Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Stea S, Savioli F, Gori A, Pizzoferrato A. 1998. « False Positive Results in Cytotoxicity Testing Due to Unexpectedly Volatile Compounds ». *Journal of Biomedical Materials Research* 39 (2): 286-91. https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199802)39:2<286::aid-jbm16>3.0.co;2-b.

Citterio F, Gualini G, Chang M, Piccoli GM, Giraudi M, Manavella V, et al. 2022. « Pocket Closure and

Residual Pockets after Non-Surgical Periodontal Therapy: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Clinical Periodontology* 49 (1): 2-14. https://doi.org/10.1111/jcpe.13547.

Corbet EF, Ho DK, Lai SM. 2009. « Radiographs in Periodontal Disease Diagnosis and Management ». *Australian Dental Journal* 54 Suppl 1: S27-43. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01141.x.

Cortellini P, Tonetti MS. 2015. « Clinical Concepts for Regenerative Therapy in Intrabony Defects ». *Periodontology 2000* 68 (1): 282-307. https://doi.org/10.1111/prd.12048.

Cucolo FCC, Bonvalente MC, Barroso EM, de Toledo BEC, GACG Camargo GACG, Souza AA, et al. 2021. « Endo-perio lesions prevalence in non-molar and molar teeth: a pilot study ». *Revista de Odontologia da UNESP* 50: e20210037. https://revodontolunesp.com.br/article/doi/10.1590/1807-2577.03721.

Cui J, Sun Q, Duan M, Liu D, Fan W. 2020. « Establishment and Characterization of Silver-Resistant Enterococcus Faecalis ». *Folia Microbiologica* 65 (4): 721-33. https://doi.org/10.1007/s12223-020-00778-5.

Czarnecki RT, Schilder H. 1979. « A Histological Evaluation of the Human Pulp in Teeth with Varying Degrees of Periodontal Disease ». *Journal of Endodontics* 5 (8): 242-53. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(79)80018-7.

Dakó T, Lazăr AP, Bică CI, et Lazăr L. 2020. « Endo-Perio Lesions: Diagnosis and Interdisciplinary Treatment Options ». *Acta Stomatologica Marisiensis Journal* 3 (1): 257-61. https://doi.org/10.2478/asmj-2020-0002.

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. 2008a. « Effects of the Association between a Calcium Hydroxide Paste and 0.4% Chlorhexidine on the Development of the Osteogenic Phenotype in Vitro ». *Journal of Endodontics* 34 (12): 1485-89. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.031.

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI. 2008b. « Effect of a Calcium Hydroxide-Based Paste Associated to Chlorhexidine on RAW 264.7 Macrophage Cell Line Culture ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 106 (5): e44-51. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.06.027.

De Deus QD. 1975. « Frequency, Location, and Direction of the Lateral, Secondary, and Accessory Canals ». *Journal of Endodontics* 1 (11): 361-66. https://doi.org/10.1016/s0099-2399(75)80211-1.

De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. 2009. « Optimal Cytocompatibility of a Bioceramic Nanoparticulate Cement in Primary Human Mesenchymal Cells ». *Journal of Endodontics* 35 (10): 1387-90. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.022.

de Freitas JV, Ebert J, Mazzi-Chaves JF, de Sousa-Neto MD, Lohbauer U, Baratto-Filho F. 2020. « Do Contaminating Substances Influence the Rheological Properties of Root Canal Sealers? » *Journal of Endodontics* 46 (2): 258-63. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.10.030.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. 2005. « Effect of Rotary or Manual Instrumentation, with or without a Calcium Hydroxide/1% Chlorhexidine Intracanal Dressing, on the Healing of Experimentally Induced Chronic Periapical Lesions ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 99 (5): 628-36. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.07.018.

7. BIBLIOGRAPHIE

Del Fabbro M, Corbella S, Sequeira-Byron P, Tsesis I, Rosen E, Lolato A, et al. 2016. « Endodontic Procedures for Retreatment of Periapical Lesions ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10: CD005511. https://doi.org/10.1002/14651858.CD005511.pub3.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. 2010. « Antimicrobial Effects of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on Enterococcus Faecalis ». *Journal of Endodontics* 36 (8): 1389-93. https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.04.013.

Dembowska E, Jaroń A, Homik-Rodzińska A, Gabrysz-Trybek E, Bladowska J, Trybek G. 2022. « Comparison of the Treatment Efficacy of Endo-Perio Lesions Using a Standard Treatment Protocol and Extended by Using a Diode Laser (940 Nm) ». *Journal of Clinical Medicine* 11 (3): 811. https://doi.org/10.3390/jcm11030811.

Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. 2016. « Antibiofilm Efficacy of Photoactivated Curcumin, Triple and Double Antibiotic Paste, 2% Chlorhexidine and Calcium Hydroxide against Enterococcus Fecalis in Vitro ». *Scientific Reports* 6: 24797. https://doi.org/10.1038/srep24797.

Dhiman M, Kumar S, Duhan J, Sangwan P, Tewari S. 2015. « Effect of Platelet-Rich Fibrin on Healing of Apicomarginal Defects: A Randomized Controlled Trial ». *Journal of Endodontics* 41 (7): 985-91. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.04.004.

Didilescu AC, Rusu D, Anghel A, Nica L, Iliescu A, Greabu M, et al. 2012. « Investigation of Six Selected Bacterial Species in Endo-Periodontal Lesions ». *International Endodontic Journal* 45 (3): 282-93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01974.x.

Dietrich T, Zunker P, Dietrich D, Bernimoulin JP. 2003. « Periapical and Periodontal Healing after Osseous Grafting and Guided Tissue Regeneration Treatment of Apicomarginal Defects in Periradicular Surgery: Results after 12 Months ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 95 (4): 474-82. https://doi.org/10.1067/moe.2003.39.

Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, et al. 2019. « Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions ». *Dentistry Journal* 7 (2). https://doi.org/10.3390/dj7020047.

Duarte MA, Midena RZ, Zeferino MA, Vivan RR, Weckwerth PH, Dos Santos F, et al. 2009. « Evaluation of PH and Calcium Ion Release of Calcium Hydroxide Pastes Containing Different Substances ». *Journal of Endodontics* 35 (9): 1274-77. https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.05.009.

Duarte PM, Bezerra JP, Miranda TS, Feres M, Chambrone L, Shaddox LM. 2014. « Local Levels of Inflammatory Mediators in Uncontrolled Type 2 Diabetic Subjects with Chronic Periodontitis ». *Journal of Clinical Periodontology* 41 (1): 11-18. https://doi.org/10.1111/jcpe.12179.

Duncan HF, Pitt Ford TR. 2006. « The Potential Association between Smoking and Endodontic Disease ». *International Endodontic Journal* 39 (11): 843-54. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01141.x.

Duque TM, Prado M, Herrera DR, Gomes BPFA. 2019. « Periodontal and Endodontic Infectious/Inflammatory Profile in Primary Periodontal Lesions with Secondary Endodontic Involvement after a Calcium Hydroxide-Based Intracanal Medication ». *Clinical Oral Investigations* 23 (1): 53-63. https://doi.org/10.1007/s00784-018-2401-6.

Eftekhar B, Moghimipour E, Eini E, Jafarzadeh M, Behrooz N. 2014. « Evaluation of Hydroxyl Ion Diffusion in Dentin and Injectable Forms and a Simple Powder-Water Calcium Hydroxide Paste: An in

Vitro Study ». *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 9 (3): e14029. https://doi.org/10.17795/jjnpp-14029.

Ehnevid H, Jansson LE, Lindskog SF, Blomlöf LB. 1993a. « Periodontal Healing in Relation to Radiographic Attachment and Endodontic Infection ». *Journal of Periodontology* 64 (12): 1199-1204. https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.12.1199.

Ehnevid H, Jansson L, Lindskog S, Blomlöf L. 1993b. « Periodontal Healing in Teeth with Periapical Lesions. A Clinical Retrospective Study ». *Journal of Clinical Periodontology* 20 (4): 254-58. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1993.tb00354.x.

El-Labban NG. 1979. « Electron Microscopic Investigation of Hyaline Bodies in Odontogenic Cysts ». *Journal of Oral Pathology* 8 (2): 81-93. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1979.tb01627.x.

Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. 2006. « In Vitro Assessment of the Effectiveness of Chlorhexidine Gel and Calcium Hydroxide Paste with Chlorhexidine against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 102 (2): e27-31. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.02.022.

Esberard RM, Carnes DL Jr, del Rio CE. 1996. « Changes in PH at the Dentin Surface in Roots Obturated with Calcium Hydroxide Pastes ». *Journal of Endodontics* 22 (8): 402-5. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(96)80239-1.

European Society of Endodontology. 2006. « Quality Guidelines for Endodontic Treatment: Consensus Report of the European Society of Endodontology ». *International Endodontic Journal* 39 (12): 921-30. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01180.x.

Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia. 2003. « Efficacy of Calcium Hydroxide: Chlorhexidine Paste as an Intracanal Medication in Bovine Dentin ». *Journal of Endodontics* 29 (5): 338-39. https://doi.org/10.1097/00004770-200305000-00005.

Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Möller. 2006. « Influence of Residual Bacteria on Periapical Tissue Healing after Chemomechanical Treatment and Root Filling of Experimentally Infected Monkey Teeth ». *European Journal of Oral Sciences* 114 (4): 278-85. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x.

Falabella MEV, Souza RJS, Dornelas AHC, Vieira ADD, Soares L.G. 2021. « Root Resection in Molars: Clinical Evaluation for 10 Years ». *International Journal of Odontostomatology*n 15(2):492-498. http://ijodontostomatology.com/en/articulo/root-resection-in-molars-clinical-evaluation-for-10-years/.

Fan X, Xu X, Yu S, Liu P, Chen C, Pan Y, et al. 2020. « Prognostic Factors of Grade 2-3 Endo-Periodontal Lesions Treated Nonsurgically in Patients with Periodontitis: A Retrospective Case -Control Study ». *BioMed Research International* 8;2020:1592910. https://doi.org/10.1155/2020/1592910.

Farmakis ETR, Konstandinidis C, Damaskos S. 2012. « Cone beam computed tomography imaging as a diagnostic tool in determining root fracture in endodontically treated teeth ». *Saudi Endodontic Journal* 2 (1): 22-28. https://doi.org/10.4103/1658-5984.104418.

Farughi A, Rouhani A, Shahmohammadi R, Jafarzadeh H. 2021. « Clinical Comparison of Sensitivity and Specificity between Sensibility and Vitality Tests in Determining the Pulp Vitality of Mandibular Premolars ». *Australian Endodontic Journal: The Journal of the Australian Society of Endodontology Inc*

47 (3): 474-79. https://doi.org/10.1111/aej.12506.

Fava LR, Saunders WP. 1999. « Calcium Hydroxide Pastes: Classification and Clinical Indications ». *International Endodontic Journal* 32 (4): 257-82. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00232.x.

Ferguson JW, Hatton JF, Gillespie MJ. 2002. « Effectiveness of Intracanal Irrigants and Medications against the Yeast Candida Albicans ». *Journal of Endodontics* 28 (2): 68-71. https://doi.org/10.1097/00004770-200202000-00004.

Flores C, Lopez M, Tabary N, Neut C, Chai F, Betbeder D, et al. 2017. « Preparation and Characterization of Novel Chitosan and β-Cyclodextrin Polymer Sponges for Wound Dressing Applications ». *Carbohydrate Polymers* 173: 535-46. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.06.026.

Fonzi, L, Belli M, Gasparoni A, Capezzuo L, Carboncini S. 1992. « Les perles d émail : aspects ultrastructuraux ». *Bulletin du Groupement International pour la Recherche Scentifique en Stomatologie et Odontologie* 35(3-4): 85-92. https://docplayer.fr/199262385-Les-perles-d-email-aspects-ultrastructuraux.html.

Forghani M, Mashhoor H, Rouhani A, Jafarzadeh H. 2014. « Comparison of PH Changes Induced by Calcium Enriched Mixture and Those of Calcium Hydroxide in Simulated Root Resorption Defects ». *Journal of Endodontics* 40 (12): 2070-73. https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.09.006.

Freire PL, Albuquerque AJ, Farias IA, da Silva TG, Aguiar JS, Galembeck A, Flores MA, Sampaio FC, Stamford TC, Rosenblatt A. 2016. « Antimicrobial and Cytotoxicity Evaluation of Colloidal Chitosan - Silver Nanoparticles - Fluoride Nanocomposites ». *International Journal of Biological Macromolecules* 93 (Pt A): 896-903. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.052.

Fridland M, Rosado R. 2003. « Mineral Trioxide Aggregate (MTA) Solubility and Porosity with Different Water-to-Powder Ratios ». *Journal of Endodontics* 29 (12): 814-17. https://doi.org/10.1097/00004770-200312000-00007.

Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. 2003. « Molecular Mechanisms of Macrophage Activation and Deactivation by Lipopolysaccharide: Roles of the Receptor Complex ». *Pharmacology & Therapeutics* 100 (2): 171-94. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.08.003.

Fuss Z, Trope M. 1996. « Root Perforations: Classification and Treatment Choices Based on Prognostic Factors ». *Endodontics & Dental Traumatology* 12 (6): 255-64. https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1996.tb00524.x.

G K, Singh N, Yadav R, Duhan J, Tewari S, Gupta A, et al. 2021. « Comparative Analysis of the Accuracy of Periapical Radiography and Cone-Beam Computed Tomography for Diagnosing Complex Endodontic Pathoses Using a Gold Standard Reference - A Prospective Clinical Study ». *International Endodontic Journal* 54 (9): 1448-61. https://doi.org/10.1111/iej.13535.

Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. 2021. « Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1480. https://doi.org/10.3390/ijms22031480.

Gambin DJ, Vitali FC, De Carli JP, Mazzon RR, Gomes BPFA, Duque TM, et al. 2021. « Prevalence of Red and Orange Microbial Complexes in Endodontic-Periodontal Lesions: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Clinical Oral Investigations* 25 (12): 6533-46. https://doi.org/10.1007/s00784-021-04164-4.

Gao J, Symons AL, Haase H, Bartold PM. 1999. « Should Cementoblasts Express Alkaline Phosphatase

Activity? Preliminary Study of Rat Cementoblasts in Vitro ». *Journal of Periodontology* 70 (9): 951-59. https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.9.951.

Gbadebo SO, Akinyamoju AO, Sulaiman AO. 2014. « Periapical Pathology: Comparison of Clinical Diagnosis and Histopathological Findings ». *Journal of the West African College of Surgeons* 4 (3): 74-88.

Glick M, Trope M, Pliskin ME. 1989. « Detection of HIV in the Dental Pulp of a Patient with AIDS ». *Journal of the American Dental Association (1939)* 119 (5): 649-50. https://doi.org/10.1016/s0002-8177(89)95019-8.

Gold SI, Moskow BS. 1987. « Periodontal Repair of Periapical Lesions: The Borderland between Pulpal and Periodontal Disease ». *Journal of Clinical Periodontology* 14 (5): 251-56. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1987.tb01528.x.

Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. 2006. « In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine Gel Used as Intracanal Medicament ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 102 (4): 544-50. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.04.010.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. 2009. « Antimicrobial Action of Intracanal Medicaments on the External Root Surface ». *Journal of Dentistry* 37 (1): 76-81. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.09.009.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. 2012. « Comparison of Endotoxin Levels Found in Primary and Secondary Endodontic Infections ». *Journal of Endodontics* 38 (8): 1082-86. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.021.

Gomes BPFA, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CCR. 2013. « Chlorhexidine in Endodontics ». *Brazilian Dental Journal* 24 (2): 89-102. https://doi.org/10.1590/0103-6440201302188.

Gomes BP, Berber VB, Kokaras AS, Chen T, Paster BJ. 2015. « Microbiomes of Endodontic-Periodontal Lesions before and after Chemomechanical Preparation ». *Journal of Endodontics* 41 (12): 1975-84. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.08.022.

Gomes BPFA, Herrera DR. 2018. « Etiologic Role of Root Canal Infection in Apical Periodontitis and Its Relationship with Clinical Symptomatology ». *Brazilian Oral Research* 32 (suppl 1): e69. https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0069.

Gomes CC, Guimarães LS, Pinto LCC, Camargo GADCG, Valente MIB, Sarquis MIM. 2017. « Investigations of the prevalence and virulence of Candida albicans in periodontal and endodontic lesions in diabetic and normoglycemic patients ». *Journal of Applied Oral Science* 25 (3): 274-81. https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0432.

Goyal B, Tewari S, Duhan J, Sehgal PK. 2011. « Comparative Evaluation of Platelet-Rich Plasma and Guided Tissue Regeneration Membrane in the Healing of Apicomarginal Defects: A Clinical Study ». *Journal of Endodontics* 37 (6): 773-80. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.03.003.

Graetz C, Plaumann A, Schlattmann P, Kahl M, Springer C, Sälzer S, et al. 2017. « Long-Term Tooth Retention in Chronic Periodontitis – Results after 18 Years of a Conservative Periodontal Treatment Regimen in a University Setting ». *Journal of Clinical Periodontology* 44 (2): 169-77. https://doi.org/10.1111/jcpe.12680.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. 2011. « Review of Osteoimmunology and the Host Response in Endodontic and Periodontal Lesions ». *Journal of Oral Microbiology* 17;3. https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5304.

Groeneveld MC, Everts V, Beertsen W. 1995. « Alkaline Phosphatase Activity in the Periodontal Ligament and Gingiva of the Rat Molar: Its Relation to Cementum Formation ». *Journal of Dental Research* 74 (7): 1374-81. https://doi.org/10.1177/00220345950740070901.

Grzesik WJ, Ivanov B, Robey FA, Southerland J, Yamauchi M. 1998. « Synthetic Integrin-Binding Peptides Promote Adhesion and Proliferation of Human Periodontal Ligament Cells in Vitro ». *Journal of Dental Research* 77 (8): 1606-12. https://doi.org/10.1177/00220345980770080801.

Guerreiro JCM, Ochoa-Rodrígez VM, Rodrigues EM, Chavez-Andrade GM, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, et al. 2021. « Antibacterial Activity, Cytocompatibility and Effect of Bio-C Temp Bioceramic Intracanal Medicament on Osteoblast Biology ». *International Endodontic Journal* 54 (7): 1155-65. https://doi.org/10.1111/iej.13502.

Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. 2012. « Release and Diffusion of Hydroxyl Ion from Calcium Hydroxide-Based Medicaments ». *Dental Traumatology: Official Publication of International Association for Dental Traumatology* 28 (4): 320-23. https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01112.x.

Guglielmi D. 2021. « Interactions Between Endodontics and Periodontics: Part I - Style Italiano Endodontics ». http://endodontics.styleitaliano.org/interactions-between-endodontics-and-periodontics-part-i/. Consulté le 11 août 2022.

Gupta S, Tewari S, Tewari S, Mittal S. 2015. « Effect of Time Lapse between Endodontic and Periodontal Therapies on the Healing of Concurrent Endodontic-Periodontal Lesions without Communication: A Prospective Randomized Clinical Trial ». *Journal of Endodontics* 41 (6): 785-90. https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.02.015.

Gutmann JL. 2016. « Grossman's Endodontic Practice – 13th Edition ». *Journal of Conservative Dentistry : JCD* 19 (5): 494. https://doi.org/10.4103/0972-0707.190011.

Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V, Halkai RS. 2017. « Evaluation of Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles Derived from Fungi against Endo-Perio Pathogens Porphyromonas Gingivalis, Bacillus Pumilus, and Enterococcus Faecalis ». *Journal of Conservative Dentistry: JCD* 20 (6): 398-404. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_173_17.

Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V, Halkai R. 2018a. « Evaluation of Antibacterial Efficacy of Fungal-Derived Silver Nanoparticles against Enterococcus Faecalis ». *Contemporary Clinical Dentistry* 9 (1): 45-48. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_703_17.

Halkai KR, Halkai R, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V. 2018b. « Antibiofilm Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against Endodontic-Periodontal Pathogens: An in Vitro Study ». *Journal of Conservative Dentistry: JCD* 21 (6): 662-66. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_203_18.

Halme L, Meurman JH, Laine P, von Smitten K, Syrjänen S, Lindqvist C, et al. 1993. « Oral Findings in Patients with Active or Inactive Crohn's Disease ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 76 (2): 175-81. https://doi.org/10.1016/0030-4220(93)90200-n.

Harrington GW. 1979. « The Perio-Endo Question: Differential Diagnosis ». *Dental Clinics of North*

America 23 (4): 673-90.

Harrington GW, Steiner DR, Ammons WF. 2002. « The Periodontal-Endodontic Controversy ». *Periodontology 2000* 30: 123-30. https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.03012.x.

Hassan G, Mahmoud M, Ayoub A. 1986. « Enhanced Re-Attachment Following Root Demineralization in Periodontic Endodontic Problems ». *Egyptian Dental Journal* 32 (2): 109-20.

Haueisen H, Ratka-Krüger P, Heidemann D. 2000. « Knochenregeneration induziert durch endodontische Behandlung bei endodontal-par- odontalen Läsionen unterer Molaren ». Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 55, 192–196.

Henehan M, Montuno M, De Benedetto A. 2017. « Doxycycline as an Anti-Inflammatory Agent: Updates in Dermatology ». *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV* 31 (11): 1800-1808. https://doi.org/10.1111/jdv.14345.

Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. 2018. « Acute Periodontal Lesions (Periodontal Abscesses and Necrotizing Periodontal Diseases) and Endo-Periodontal Lesions ». *Journal of Periodontology* 89 Suppl 1: S85-102. https://doi.org/10.1002/JPER.16-0642.

Hiatt WH. 1977. « Pulpal Periodontal Disease ». *Journal of Periodontology* 48 (9): 598-609. https://doi.org/10.1902/jop.1977.48.9.598.

Hirt H, Hall JW, Larson E, Gorr SU. 2018. « A D-Enantiomer of the Antimicrobial Peptide GL13K Evades Antimicrobial Resistance in the Gram Positive Bacteria Enterococcus Faecalis and Streptococcus Gordonii ». *PloS One* 13 (3): e0194900. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194900.

Hofmann MC, Jeltsch W, Brecher J, Walt H. 1989. « Alkaline Phosphatase Isozymes in Human Testicular Germ Cell Tumors, Their Precancerous Stage, and Three Related Cell Lines ». *Cancer Research* 49 (17): 4696-4700.

Holland R, De Souza V, Nery MJ, de Mello W, Bernabé PF, Otoboni Filho JA. 1980. « Tissue Reactions Following Apical Plugging of the Root Canal with Infected Dentin Chips. A Histologic Study in Dogs' Teeth ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 49 (4): 366-69. https://doi.org/10.1016/0030-4220(80)90149-8.

Holland R, Gomes JE Filho, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. 2017. « Factors Affecting the Periapical Healing Process of Endodontically Treated Teeth ». *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB* 25 (5): 465-76. https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0464.

Hommez GM, Braem M, De Moor RJ. De Moor. 2003. « Root Canal Treatment Performed by Flemish Dentists. Part 1. Cleaning and Shaping ». *International Endodontic Journal* 36 (3): 166-73. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00633.x.

Imura N, Pinheiro ET, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. 2007. « The Outcome of Endodontic Treatment: A Retrospective Study of 2000 Cases Performed by a Specialist ». *Journal of Endodontics* 33 (11): 1278-82. https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.018.

Jacinto RC, Linhares-Farina G, Sposito Oda S, Zanchi CH, Cenci MS. 2015. « Influence of 2% Chlorhexidine on PH, Calcium Release and Setting Time of a Resinous MTA-Based Root-End Filling Material ». *Brazilian Oral Research* 29: S1806-83242015000100240. https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2015.vol29.0036.

Jansson LE, Ehnevid H, Lindskog SF, Blomlöf LB. 1993a. « Radiographic Attachment in Periodontitis-Prone Teeth with Endodontic Infection ». *Journal of Periodontology* 64 (10): 947-53. https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.10.947.

Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomlöf L. 1993b. « Relationship between Periapical and Periodontal Status. A Clinical Retrospective Study ». *Journal of Clinical Periodontology* 20 (2): 117-23. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1993.tb00325.x.

Jansson L, Ehnevid H, Lindskog S, Blomlöf L. 1995. « The Influence of Endodontic Infection on Progression of Marginal Bone Loss in Periodontitis ». *Journal of Clinical Periodontology* 22 (10): 729-34. https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1995.tb00254.x.

Jaoui L, Machtou P, Ouhayoun JP. 1995. « Long-Term Evaluation of Endodontic and Periodontal Treatment ». *International Endodontic Journal* 28 (5): 249-54. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1995.tb00309.x.

Jeanneau C, Giraud T, Laurent P, About I. 2019. « BioRoot RCS Extracts Modulate the Early Mechanisms of Periodontal Inflammation and Regeneration ». *Journal of Endodontics* 45 (8): 1016-23. https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.04.003.

Jew RC, Weine FS, Keene JJ Jr, Smulson MH. 1982. « A Histologic Evaluation of Periodontal Tissues Adjacent to Root Perforations Filled with Cavit ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 54 (1): 124-35. https://doi.org/10.1016/0030-4220(82)90427-3.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald JR. 1965. « The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-free and Conventional Laboratory Rats ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 20: 340-49. https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90166-0.

Kaplan AE, Ormaechea MF, Picca M, Canzobre MC, Ubios AM. 2003. « Rheological Properties and Biocompatibility of Endodontic Sealers ». *International Endodontic Journal* 36 (8): 527-32. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00683.x.

Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. 2020. « Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities ». *European Endodontic Journal* 5 (2): 54-67. https://doi.org/10.14744/eej.2020.42714.

Karteva T, Manchorova-Veleva N. 2020. « The Role of the Immune Response in Chronic Marginal and Apical Periodontitis ». *Folia Medica* 62 (2): 238-43. https://doi.org/10.3897/folmed.62.e39599.

Kato T, Fujiwara N, Kuraji R, Numabe Y. 2020. « Relationship between Periodontal Parameters and Non-Vital Pulp in Dental Clinic Patients: A Cross-Sectional Study ». *BMC Oral Health* 20 (1): 109. https://doi.org/10.1186/s12903-020-01103-9.

Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. 2008. « Effect of Calcium Hydroxide on Proinflammatory Cytokines and Neuropeptides ». *Journal of Endodontics* 34 (11): 1360-63. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.020.

Khandelwal A, Billore J, Gupta B, Jaroli S, Agrawal N. 2020. « Knowledge, attitude and perception on endo-perio lesions in practicing dentists- A qualitative research study ». J*ournal of Advanced Medical and Dental Sciences Research* 8(11): 31-34. https://www.proquest.com/openview/c7cbbc0f7de4827938414707d33154fe/1?pq-

origsite=gscholar&cbl=2040251.

Khatib MS, Ameer B, Ajit Mannur N, Ramalingaiahsetty AM, Peerzade SM, Bambawale A. 2020. « Decoding the Perplexing Mystery of Para-Chloroaniline Formation: A Systematic Review ». *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry* 10 (2): 142-47. https://doi.org/10.4103/jispcd.JISPCD_488_19.

Kim D, Kim E. 2014. « Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide as an Intracanal Medicament in Root Canal Treatment: A Literature Review - Part I. In Vitro Studies ». *Restorative Dentistry & Endodontics* 39 (4): 241-52. https://doi.org/10.5395/rde.2014.39.4.241.

Kim D, Kim E. 2015. « Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide as an Intracanal Medicament in Root Canal Treatment: A Literature Review - Part II. in Vivo Studies ». *Restorative Dentistry & Endodontics* 40 (2): 97-103. https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.2.97.

Kim E, Song JS, Jung IY, Lee SJ, Kim S. 2008. « Prospective Clinical Study Evaluating Endodontic Microsurgery Outcomes for Cases with Lesions of Endodontic Origin Compared with Cases with Lesions of Combined Periodontal-Endodontic Origin ». *Journal of Endodontics* 34 (5): 546-51. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.01.023.

Kirkevang LL, Hörsted-Bindslev P, Ørstavik D, Wenzel A. 2001. « Frequency and Distribution of Endodontically Treated Teeth and Apical Periodontitis in an Urban Danish Population ». *International Endodontic Journal* 34 (3): 198-205. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2001.00370.x.

Kirkevang LL, Ørstavik D, Bahrami G, Wenzel A, Vaeth M. 2017. « Prediction of Periapical Status and Tooth Extraction ». *International Endodontic Journal* 50 (1): 5-14. https://doi.org/10.1111/iej.12581.

Kirkham DB. 1975. « The Location and Incidence of Accessory Pulpal Canals in Periodontal Pockets ». *Journal of the American Dental Association (1939)* 91 (2): 353-56. https://doi.org/10.14219/jada.archive.1975.0345.

Koppang HS, Koppang R, Solheim T, Aarnes H, Stølen SO. 1989. « Cellulose Fibers from Endodontic Paper Points as an Etiological Factor in Postendodontic Periapical Granulomas and Cysts ». *Journal of Endodontics* 15 (8): 369-72. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(89)80075-5.

Kreth J, Kim D, Nguyen M, Hsiao G, Mito R, Kang MK, et al. 2008. « The Antimicrobial Effect of Silver Ion Impregnation into Endodontic Sealer against Streptococcus Mutans ». *The Open Dentistry Journal* 2: 18-23. https://doi.org/10.2174/1874210600802010018.

Krüger HC, Francio J, Silva ASD, Oliveira GSN, Brancher JA, Dantas LR, et al. 2021. « Antimicrobial Action, Cytotoxicity, Calcium Ion Release, and PH Variation of a Calcium Hydroxide-Based Paste Associated with Myracrodruon Urundeuva Allemão Extract ». *Australian Endodontic Journal: The Journal of the Australian Society of Endodontology Inc* 48(1): 170-178. https://doi.org/10.1111/aej.12557.

Kudo K, Ikeda N, Kiyoshima A, Hino Y, Nishida N, Inoue N. 2002. « Toxicological Analysis of Chlorhexidine in Human Serum Using HPLC on a Polymer-Coated ODS Column ». *Journal of Analytical Toxicology* 26 (2): 119-22. https://doi.org/10.1093/jat/26.2.119.

Kulatunga D, Dananjaya S, Godahewa GI, Lee J, De Zoysa M. 2017. « Chitosan silver nanocomposite (CAgNC) as an antifungal agent against Candida albicans ». *Medical Mycology* 55 (2): 213-22. https://doi.org/10.1093/mmy/myw053.

Kumar S. 2019. « Evidence-Based Update on Diagnosis and Management of Gingivitis and Periodontitis ». *Dental Clinics of North America* 63 (1): 69-81. https://doi.org/10.1016/j.cden.2018.08.005.

Kuoch P, Bonte E. 2020. « Endoperiodontal Lesions and Chicago's New Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions ». *The Journal of Contemporary Dental Practice* 21 (7): 798-802.

Kwon EY, Cho Y, Lee JY, Kim SJ, Choi J. 2013. « Endodontic Treatment Enhances the Regenerative Potential of Teeth with Advanced Periodontal Disease with Secondary Endodontic Involvement ». *Journal of Periodontal & Implant Science* 43 (3): 136-40. https://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.3.136.

Lakhani AA, Sekhar KS, Gupta P, Tejolatha B, Gupta A, Kashyap S, et al. 2017. « Efficacy of Triple Antibiotic Paste, Moxifloxacin, Calcium Hydroxide And 2% Chlorhexidine Gel In Elimination of E. Faecalis: An In Vitro Study ». *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 11 (1): ZC06-9. https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22394.9132.

Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. 1974. « Periodontal Disease, Bacteria, and Pulpal Histopathology ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 37 (2): 257-70. https://doi.org/10.1016/0030-4220(74)90421-6.

Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW, Kaufman B, et al. 2013. « Antimicrobial Efficacy of a Human β-Defensin-3 Peptide Using an Enterococcus Faecalis Dentine Infection Model ». *International Endodontic Journal* 46 (5): 406-12. https://doi.org/10.1111/iej.12002.

Lee SH, Baek DH. 2012. « Antibacterial and Neutralizing Effect of Human β-Defensins on Enterococcus Faecalis and Enterococcus Faecalis Lipoteichoic Acid ». *Journal of Endodontics* 38 (3): 351-56. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.12.026.

Leite FRM, Nascimento GG, Scheutz F, López R. 2018. « Effect of Smoking on Periodontitis: A Systematic Review and Meta-Regression ». *American Journal of Preventive Medicine* 54 (6): 831-41. https://doi.org/10.1016/j.amepre.2018.02.014.

Lemire JA, Harrison JJ, Turner RJ. 2013. « Antimicrobial Activity of Metals: Mechanisms, Molecular Targets and Applications ». *Nature Reviews. Microbiology* 11 (6): 371-84. https://doi.org/10.1038/nrmicro3028.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. 2006. « Effect of a Calcium Hydroxide-Based Root Canal Dressing on Periapical Repair in Dogs: A Histological Study ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 102 (5): 680-85. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.03.021.

Li H, Guan R, Sun J, Hou B. 2014. « Bacteria Community Study of Combined Periodontal-Endodontic Lesions Using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Sequencing Analysis ». *Journal of Periodontology* 85 (10): 1442-49. https://doi.org/10.1902/jop.2014.130572.

Li M, Yang Y, Lin C, Zhang Q, Gong L, Wang Y, Zhang X. 2021. « Antibacterial Properties of Small-Size Peptide Derived from Penetratin against Oral Streptococci ». *Materials (Basel, Switzerland)* 14 (11): 2730. https://doi.org/10.3390/ma14112730.

Li Y, Wang X, Xu J, Zhou X, Xie K. 2012. « [The clinical study on the use of diode laser irradiation in the treatment of periodontal-endodontic combined lesions] ». *West China Journal of Stomatology* 30 (2):

161-64, 168.

Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. 2019. « Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6): E1414. https://doi.org/10.3390/ijms20061414.

Lima TFR, Ascendino JF, Cavalcante IO, D Assunção FLC, Salazar-Silva JR, Silva EJNLD, et al. 2019. « Influence of Chlorhexidine and Zinc Oxide in Calcium Hydroxide Pastes on PH Changes in External Root Surface ». *Brazilian Oral Research* 33: e005. https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0005.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. 2008. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5th ed. Oxford: Blackwell Munksgaard. Endodontics and periodontics. Copenhagen: Munksgaard 1997;318-351.

Liu W, Cao Y, Dong L, Zhu Y, Wu Y, Lv Z, et al. 2019. « Periodontal Therapy for Primary or Secondary Prevention of Cardiovascular Disease in People with Periodontitis ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 12: CD009197. https://doi.org/10.1002/14651858.CD009197.pub4.

Lizambard M, Menu T, Fossart M, Bassand C, Agossa K, Huck O, et al. 2019. « In-Situ Forming Implants for the Treatment of Periodontal Diseases: Simultaneous Controlled Release of an Antiseptic and an Anti-Inflammatory Drug ». *International Journal of Pharmaceutics* 572: 118833. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118833.

Lizzi F, Goutaudier C, Attik N, Jackson P, Campbell I, Mokbel I, et al. 2020. « Ion Release Characterization in Phase Separated Borosilicate Glass Powders ». *Journal of Non-Crystalline Solids* 534: 119934.

Lofthag-Hansen S, Huumonen S, Gröndahl K, Gröndahl HG. 2007. « Limited Cone-Beam CT and Intraoral Radiography for the Diagnosis of Periapical Pathology ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 103 (1): 114-19. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2006.01.001.

Lopes EM, Passini MRZ, Kishi LT, Chen T, Paster BJ, Gomes BPFA. 2021. « Interrelationship between the Microbial Communities of the Root Canals and Periodontal Pockets in Combined Endodontic-Periodontal Diseases ». *Microorganisms* 9 (9): 1925. https://doi.org/10.3390/microorganisms9091925.

Low KM, Dula K, Bürgin W, von Arx T. 2008. « Comparison of Periapical Radiography and Limited Cone-Beam Tomography in Posterior Maxillary Teeth Referred for Apical Surgery ». *Journal of Endodontics* 34 (5): 557-62. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.02.022.

Lynch RJ. 2011. « Zinc in the Mouth, Its Interactions with Dental Enamel and Possible Effects on Caries; a Review of the Literature ». *International Dental Journal* 61 Suppl 3: 46-54. https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00049.x.

Ma HY, Zhou Z, Wu S, Wan YL, Tsui PH. 2016. « A Computer-Aided Diagnosis Scheme For Detection Of Fatty Liver In Vivo Based On Ultrasound Kurtosis Imaging ». *Journal of Medical Systems* 40 (1): 33. https://doi.org/10.1007/s10916-015-0395-z.

Manfredi M, Figini L, Gagliani M, Lodi G. 2016. « Single versus Multiple Visits for Endodontic Treatment of Permanent Teeth ». *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 12: CD005296. https://doi.org/10.1002/14651858.CD005296.pub3.

7. BIBLIOGRAPHIE

Marín-Botero ML, Domínguez-Mejía JS, Arismendi-Echavarría JA, Mesa-Jaramillo AL, Flórez-Moreno GA, Tobón-Arroyave SI. 2006. « Healing Response of Apicomarginal Defects to Two Guided Tissue Regeneration Techniques in Periradicular Surgery: A Double-Blind, Randomized-Clinical Trial ». *International Endodontic Journal* 39 (5): 368-77. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01081.x.

Marracino L, Punzo A, Severi P, Nganwouo Tchoutang R, Vargas-De-la-Cruz C, Fortini F, et al. 2022. « Fermentation of Vaccinium Floribundum Berries with Lactiplantibacillus Plantarum Reduces Oxidative Stress in Endothelial Cells and Modulates Macrophages Function ». *Nutrients* 14 (8): 1560. https://doi.org/10.3390/nu14081560.

Martínez A, Apip C, Meléndrez MF, Domínguez M, Sánchez-Sanhueza G, Marzialetti T, et al. 2021. « Dual Antifungal Activity against Candida Albicans of Copper Metallic Nanostructures and Hierarchical Copper Oxide Marigold-like Nanostructures Grown in Situ in the Culture Medium ». *Journal of Applied Microbiology* 130 (6): 1883-92. https://doi.org/10.1111/jam.14859.

Matsuo M, Takahashi K. 2002. « Scanning Electron Microscopic Observation of Microvasculature in Periodontium ». *Microscopy Research and Technique* 56 (1): 3-14. https://doi.org/10.1002/jemt.10008.

McGuire MK, Nunn ME. Nunn. 1996. « Prognosis versus Actual Outcome. II. The Effectiveness of Clinical Parameters in Developing an Accurate Prognosis ». *Journal of Periodontology* 67 (7): 658-65. https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.7.658.

Meng LJ, Qiu LH, Yu YQ, Zhan FL, Zhang L, Zhang XF. 2016. « [The effect of calcium hydroxide on IL-6 and TNF-α expression of osteoblast in periapical tissues] ». *Shanghai Journal of Stomatology* 25 (1): 32-37.

Meto A, Colombari B, Sala A, Pericolini E, Meto A, Peppoloni S, et al. 2019. « Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of a Copper/Calcium Hydroxide-Based Endodontic Paste against Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa and Candida Albicans ». *Dental Materials Journal* 38 (4): 591-603. https://doi.org/10.4012/dmj.2018-252.

Miñana M, Carnes DL Jr, Walker WA 3rd. 2001. « PH Changes at the Surface of Root Dentin after Intracanal Dressing with Calcium Oxide and Calcium Hydroxide ». *Journal of Endodontics* 27 (1): 43-45. https://doi.org/10.1097/00004770-200101000-00015.

Misra P, Bains R, Loomba K, Singh A, Sharma VP, Murthy RC, et al. 2017. « Measurement of PH and Calcium Ions Release from Different Calcium Hydroxide Pastes at Different Intervals of Time: Atomic Spectrophotometric Analysis ». *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 7 (1): 36-41. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2016.04.001.

Mogrovejo-Valdivia A, Rahmouni O, Tabary N, Maton M, Neut C, Martel B, Blanchemain N. 2019. « In Vitro Evaluation of Drug Release and Antibacterial Activity of a Silver-Loaded Wound Dressing Coated with a Multilayer System ». *International Journal of Pharmaceutics* 556: 301-10. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.12.018.

Mohammadi Z, Abbott PV. 2009. « On the Local Applications of Antibiotics and Antibiotic-Based Agents in Endodontics and Dental Traumatology ». *International Endodontic Journal* 42 (7): 555-67. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2009.01564.x.

Mohammadi Z, Dummer PMH. 2011. « Properties and Applications of Calcium Hydroxide in Endodontics and Dental Traumatology ». *International Endodontic Journal* 44 (8): 697-730.

https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01886.x.

Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Sahebalam R, Kinoshita JI. 2017. « Additive and Reducing Effects between Calcium Hydroxide and Current Irrigation Solutions ». *The Journal of Contemporary Dental Practice* 18 (3): 246-49.

Molander A, Warfvinge J, Reit C, Kvist T. 2007. « Clinical and Radiographic Evaluation of One- and Two-Visit Endodontic Treatment of Asymptomatic Necrotic Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Clinical Trial ». *Journal of Endodontics* 33 (10): 1145-48. https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.07.005.

Morand DN, Huck O, Keller L, Jessel N, Tenenbaum H, Davideau JL. 2015. « Active Nanofibrous Membrane Effects on Gingival Cell Inflammatory Response ». *Materials (Basel, Switzerland)* 8 (10): 7217-29. https://doi.org/10.3390/ma8105376.

Moreinos D, Front E, Lin S. 2021. « Perio-endo interaction: A review ». 2021. *Oral Health and Care* 6(1-8). https://doi: 10.15761/OHC.1000200.

Morfis A, Sylaras SN, Georgopoulou M, Kernani M, Prountzos F. 1994. « Study of the Apices of Human Permanent Teeth with the Use of a Scanning Electron Microscope ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 77 (2): 172-76. https://doi.org/10.1016/0030-4220(94)90281-x.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. 2005. « The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles ». *Nanotechnology* 16 (10): 2346-53. https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059.

Mounir MMF, Rashed FM, Bukhary SM. 2022. « Amelogenin as a Regenerative Endodontic Molecule for Immature Teeth with Apical Periodontitis. An Experimental Study ». Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 12 (5): 721-26. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2022.08.008.

Mukhtar-Fayyad D. 2011. « Cytocompatibility of New Bioceramic-Based Materials on Human Fibroblast Cells (MRC-5) ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 112 (6): e137-142. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.05.042.

Nair PN. 2006. « On the Causes of Persistent Apical Periodontitis: A Review ». *International Endodontic Journal* 39 (4): 249-81. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01099.x.

Nanci A, Bosshardt DD. 2006. « Structure of Periodontal Tissues in Health and Disease ». *Periodontology 2000* 40: 11-28. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00141.x.

Narita H, Itoh S, Imazato S, Yoshitake F, Ebisu S. 2010. « An Explanation of the Mineralization Mechanism in Osteoblasts Induced by Calcium Hydroxide ». *Acta Biomaterialia* 6 (2): 586-90. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.005.

Neves VCQ, Toledo BEC, Camargo GACG, Souza AA, Zuza EP. 2017. « Determination of the Influence of Chronic Periodontitis on Pulp Sensibility by Means of Electric and Thermal Cold Testing ». *Journal of Endodontics* 43 (11): 1802-5. https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.006.

Nibali L, Sultan D, Arena C, Pelekos G, Lin GH, Tonetti M. 2021. « Periodontal Infrabony Defects: Systematic Review of Healing by Defect Morphology Following Regenerative Surgery ». *Journal of Clinical Periodontology* 48 (1): 100-113. https://doi.org/10.1111/jcpe.13381.

Nishimura H, Harada T, Nawata J, Hayakawa M, Nishioka M, Takemoto T, et al. 1982. « Relation of

Serum Alkaline Phosphatase to Liver Scintigram in Patients with Hepatocellular Carcinoma ». *Hepato-Gastroenterology* 29 (6): 249-51.

Nithya A, Jothivenkatachalam K. 2015. « Chitosan Assisted Synthesis of ZnO Nanoparticles: An Efficient Solar Light Driven Photocatalyst and Evaluation of Antibacterial Activity ». *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 26 (12): 10207-16. https://doi.org/10.1007/s10854-015-3710-z.

Nozari A, Karimkhani A, Motamedifar M, Arasteh P. 2019. « The Antimicrobial Effects of Zinc Oxide-Calcium Hydroxide Mixture Fillers: Determining the Ideal Mixture Ratio ». *Iranian Journal of Microbiology* 11 (3): 239-45.

Nunn ME, Fan J, Su X, Levine RA, Lee HJ, McGuire MK. 2012. « Development of Prognostic Indicators Using Classification and Regression Trees for Survival ». *Periodontology 2000* 58 (1): 134-42. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00421.x.

Nyman S, Lindhe J. 1979. « A Longitudinal Study of Combined Periodontal and Prosthetic Treatment of Patients with Advanced Periodontal Disease ». *Journal of Periodontology* 50 (4): 163-69. https://doi.org/10.1902/jop.1979.50.4.163.

Oh S, Chung SH, Han JY. 2019. « Periodontal Regenerative Therapy in Endo-Periodontal Lesions: A Retrospective Study over 5 Years ». *Journal of Periodontal & Implant Science* 49 (2): 90-104. https://doi.org/10.5051/jpis.2019.49.2.90.

Ohshima H. 2008. « Overview : Developmental Biology of Hertwig's Epithelial Root Sheath (HERS) and Tooth Root Formation ». *Journal of Oral Biosciences* 50 (3): 147-53. https://doi.org/10.1016/S1349-0079(08)80001-1.

Oktawati S, Siswanto H, Mardiana A, Supiaty, Neormansyah I, Basir I. 2020. « Endodontic–Periodontic Lesion Management: A Systematic Review ». *Medicina Clínica Práctica*, 1st International WOSQUAL-2019 Conference (selected medicine proceedings), 3: 100098. https://doi.org/10.1016/j.mcpsp.2020.100098.

Oliveira RR, Fermiano D, Feres M, Figueiredo LC, Teles FR, Soares GM, et al. 2016. « Levels of Candidate Periodontal Pathogens in Subgingival Biofilm ». *Journal of Dental Research* 95 (6): 711-18. https://doi.org/10.1177/0022034516634619.

Ordinola-Zapata R, Noblett WC, Perez-Ron A, Ye Z, Vera J. 2022. « Present Status and Future Directions of Intracanal Medicaments ». *International Endodontic Journal* 55 Suppl 3: 613-36. https://doi.org/10.1111/iej.13731.

Pacios MG, de la Casa ML, de Bulacio Ml, López ME. 2004. « Influence of Different Vehicles on the PH of Calcium Hydroxide Pastes ». *Journal of Oral Science* 46 (2): 107-11. https://doi.org/10.2334/josnusd.46.107.

Page RC, Schroeder HE. 1976. « Pathogenesis of Inflammatory Periodontal Disease. A Summary of Current Work ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 34 (3): 235-49.

Palmer NO, Ahmed M, Grieveson B. 2009. « An Investigation of Current Endodontic Practice and Training Needs in Primary Care in the North West of England ». *British Dental Journal* 206 (11): E22; discussion 584-585. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2009.473.

Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. 2018. « Periodontitis: Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions ». *Journal of Periodontology* 89 Suppl 1: S173-82. https://doi.org/10.1002/JPER.17-0721.

Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ. 2012. « Success Rate of Single- versus Two-Visit Root Canal Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Controlled Trial ». *Journal of Endodontics* 38 (9): 1164-69. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.05.021.

Parikh M, Kishan KV, Solanki NP, Parikh M, Savaliya K, Bindu VH, et al. 2019. « Efficacy of Removal of Calcium Hydroxide Medicament from Root Canals by Endoactivator and Endovac Irrigation Techniques: A Systematic Review of In Vitro Studies ». *Contemporary Clinical Dentistry* 10 (1): 135-42. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_335_18.

Parolia A, Gait TC, Isabel C. C. M. Porto ICCM, Mala K. 2013. « Endo-Perio Lesion: A Dilemma from 19 Th until 21 St Century ». *Journal of Interdisciplinary Dentistry* 3 (1): 2. https://doi.org/10.4103/2229-5194.120514.

Peeran S, Ramalingam K. 2021. « Essentials of Periodontics and Oral Implantology ». Saranraj JPS Publication, Mylapore, Chennai, Tamil Nadu, India.

Penesis VA, Fitzgerald PI, Fayad MI, Wenckus CS, BeGole EA, Johnson BR. 2008. « Outcome of One-Visit and Two-Visit Endodontic Treatment of Necrotic Teeth with Apical Periodontitis: A Randomized Controlled Trial with One-Year Evaluation ». *Journal of Endodontics* 34 (3): 251-57. https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.12.015.

Peng W, Huan Z, Pei G, Li J, Cao Y, Jiang L, et al. 2022. « Silicate Bioceramics Elicit Proliferation and Odonto-Genic Differentiation of Human Dental Pulp Cells ». *Dental Materials Journal* 41 (1): 27-36. https://doi.org/10.4012/dmj.2021-042.

Pérez-Chaparro PJ, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N, et al. 2014. « Newly Identified Pathogens Associated with Periodontitis: A Systematic Review ». *Journal of Dental Research* 93 (9): 846-58. https://doi.org/10.1177/0022034514542468.

Philipsen HP, Reichart PA. 2010. « Pulse or Hyaline Ring Granuloma. Review of the Literature on Etiopathogenesis of Oral and Extraoral Lesions ». *Clinical Oral Investigations* 14 (2): 121-28. https://doi.org/10.1007/s00784-009-0322-0.

Pintor AVB, Queiroz LD, Sancas MC, Brochado ACB, Spoladore J, Fonseca-Gonçalves A, et al. 2021. « Cytocompatibility of Filling Pastes by Primary Teeth Root Simulating Model ». Odontology 109 (1): 174-83. https://doi.org/10.1007/s10266-020-00541-9.

Piras V, Usai P, Mezzena S, Susnik M, Ideo F, Schirru E, et al. 2017. « Prevalence of Apical Periodontitis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases: A Retrospective Clinical Study ». *Journal of Endodontics* 43 (3): 389-94. https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.11.004.

Podbielski A, Spahr A, Haller B. 2003. « Additive Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on Common Endodontic Bacterial Pathogens ». *Journal of Endodontics* 29 (5): 340-45. https://doi.org/10.1097/00004770-200305000-00006.

Potarnichie O, Solomon, S, Teslaru S, Pasarin L, Martu S. 2012. « Study on the Incidence of External Root Resorption in Current Practice – Romanian Journal of Oral Rehabilitation ». 2012.

https://www.rjor.ro/study-on-the-incidence-of-external-root-resorption-in-current-practice/.

Poyato-Borrego M, Segura-Sampedro JJ, Martín-González J, Torres-Domínguez Y, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. 2020. « High Prevalence of Apical Periodontitis in Patients With Inflammatory Bowel Disease: An Age- and Gender- Matched Case-Control Study ». *Inflammatory Bowel Diseases* 26 (2): 273-79. https://doi.org/10.1093/ibd/izz128.

Prabhakar AR, Hadakar SG, Raju OS. 2012. « Comparative Evaluation of PH and Antibacterial Effect of Various Calcium Hydroxide Combinations on E. Faecalis and Its Effect on Root Strength: An in Vitro Study ». *Contemporary Clinical Dentistry* 3 (1): 42-47. https://doi.org/10.4103/0976-237X.94545.

Prashaanthi N, Rajasekar A, Shantha Sundari KK. 2021. « Prevalence of endo perio lesion-an institutional study ». *International Journal of Dentistry and Oral Science* 8(6):2858-2862.

Pratsinis A, Hervella P, Leroux JC, Pratsinis SE, Sotiriou GA. 2013. « Toxicity of Silver Nanoparticles in Macrophages ». *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* 9 (15): 2576-84. https://doi.org/10.1002/smll.201202120.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K et al. 2012. « Periodontitis and Diabetes: A Two-Way Relationship ». *Diabetologia* 55 (1): 21-31. https://doi.org/10.1007/s00125-011-2342-y.

Puri K, Puri N. 2013. « Local Drug Delivery Agents as Adjuncts to Endodontic and Periodontal Therapy ». *Journal of Medicine and Life* 6 (4): 414-19.

Raheja J, Tewari S, Tewari S, Duhan J. 2014. « Evaluation of Efficacy of Chlorhexidine Intracanal Medicament on the Periodontal Healing of Concomitant Endodontic-Periodontal Lesions without Communication: An Interventional Study ». *Journal of Periodontology* 85 (8): 1019-26. https://doi.org/10.1902/jop.2014.130430.

Rai M, Yadav A, Gade A. 2009. « Silver Nanoparticles as a New Generation of Antimicrobials ». *Biotechnology Advances* 27 (1): 76-83. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002.

Rajasekaran M, Nainar D, Alamelu S, KV A. 2016. « Microbiological Profile in Endodontic-periodontal Lesion ». *Journal of Operative Dentistry & Endodontics* 1: 25-29. https://doi.org/10.5005/jp-journals-10047-0007.

Rampersad SN. 2012. « Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays ». *Sensors (Basel, Switzerland)* 12 (9): 12347-60. https://doi.org/10.3390/s120912347.

Rangé H. 2007. « Les relations complexes entre parodonte et endodonte ». 2007. *Revue Odonto Stomatologie* 36:161-178.

Raoof M, Khaleghi M, Siasar N, Mohannadalizadeh S, Haghani J, Amanpour S. 2019. « Antimicrobial Activity of Methanolic Extracts of Myrtus Communis L. and Eucalyptus Galbie and Their Combination with Calcium Hydroxide Powder against Enterococcus Faecalis ». *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)* 20 (3): 195-202. https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2019.44898.

Ray HA, Trope M. 1995. « Periapical Status of Endodontically Treated Teeth in Relation to the Technical Quality of the Root Filling and the Coronal Restoration ». *International Endodontic Journal* 28 (1): 12-18. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.1995.tb00150.x.

Revathi T, Thambidurai S. 2019. « Cytotoxic, Antioxidant and Antibacterial Activities of Copper Oxide Incorporated Chitosan-Neem Seed Biocomposites ». *International Journal of Biological Macromolecules* 139: 867-78. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.214.

Riaz A, Maxood A, Abdullah S, Saba K, Din SU, Zahid S. 2018. « Comparison Of Two Intracanal Medicaments In Resolution Of Apical Radiolucency ». *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad: JAMC* 30 (3): 320-24.

Ricucci D, Lin LM, Spångberg LS. 2009. « Wound Healing of Apical Tissues after Root Canal Therapy: A Long-Term Clinical, Radiographic, and Histopathologic Observation Study ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 108 (4): 609-21. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.05.028.

Ricucci D, Siqueira JF Jr, Rôças IN. 2021. « Pulp Response to Periodontal Disease: Novel Observations Help Clarify the Processes of Tissue Breakdown and Infection ». *Journal of Endodontics* 47 (5): 740-54. https://doi.org/10.1016/j.joen.2021.02.005.

Rojas B, Soto N, Villalba M, Bello-Toledo H, Meléndrez-Castro M, Sánchez-Sanhueza G. 2021. « Antibacterial Activity of Copper Nanoparticles (CuNPs) against a Resistant Calcium Hydroxide Multispecies Endodontic Biofilm ». *Nanomaterials (Basel, Switzerland)* 11 (9): 2254. https://doi.org/10.3390/nano11092254.

Rotstein I. 2017. « Interaction between Endodontics and Periodontics ». *Periodontology 2000* 74 (1): 11-39. https://doi.org/10.1111/prd.12188.

Rotstein I, Simon JH. 2004. « Diagnosis, Prognosis and Decision-Making in the Treatment of Combined Periodontal-Endodontic Lesions ». *Periodontology 2000* 34: 165-203. https://doi.org/10.1046/j.0906-6713.2003.003431.x.

Rovai EDS, Matos FS, Kerbauy WD, Cardoso FGDR, Martinho FC, Oliveira LD et al. 2019. « Microbial Profile and Endotoxin Levels in Primary Periodontal Lesions with Secondary Endodontic Involvement ». *Brazilian Dental Journal* 30 (4): 356-62. https://doi.org/10.1590/0103-6440201902471.

Roy E, Alliot-Licht B, Dajean-Trutaud S, Fraysse C, Jean A, Armengol V. 2008. « Evaluation of the Ability of Laser Doppler Flowmetry for the Assessment of Pulp Vitality in General Dental Practice ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 106 (4): 615-20. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2008.05.035.

Ruetters M, Gehrig H, Kronsteiner D, Schuessler DL, Kim TS. 2022. « Prevalence of Endo-Perio Lesions According to the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Disease in a University Hospital ». *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)* 53 (2): 134-42. https://doi.org/10.3290/j.qi.b2091245.

Ruetters M, Kim TS, Krisam J, El-Sayed S, ElSayed N. 2021. « Effect of Endodontic Treatment on Periodontal Healing of Grade 3 Endo-Periodontal Lesions without Root Damage in Periodontally Compromised Patients-a Retrospective Pilot Study ». *Clinical Oral Investigations* 25 (4): 2373-80. https://doi.org/10.1007/s00784-020-03560-6.

Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. 2014. « Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine on Enterococcus Faecalis: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB* 22 (5): 356-65. https://doi.org/10.1590/1678-775720140032.

Sánchez-Torres A, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C. 2014. « Materials and Prognostic Factors of Bone Regeneration in Periapical Surgery: A Systematic Review ». *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal* 19 (4): e419-425. https://doi.org/10.4317/medoral.19453.

Sanders JJ, Sepe WW, Bowers GM, Koch RW, Williams JE, Lekas JS, et al. 1983. « Clinical Evaluation of Freeze-Dried Bone Allografts in Periodontal Osseous Defects. Part III. Composite Freeze-Dried Bone Allografts with and without Autogenous Bone Grafts ». *Journal of Periodontology* 54 (1): 1-8. https://doi.org/10.1902/jop.1983.54.1.1.

Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Beglundh T, et al. 2020. « Treatment of Stage I-III Periodontitis-The EFP S3 Level Clinical Practice Guideline ». *Journal of Clinical Periodontology* 47 Suppl 22: 4-60. https://doi.org/10.1111/jcpe.13290.

Sardi JC, Almeida AM, Mendes Giannini MJ. 2011. « New Antimicrobial Therapies Used against Fungi Present in Subgingival Sites--a Brief Review ». *Archives of Oral Biology* 56 (10): 951-59. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.03.007.

Sathorn C, Parashos P, Messer H. 2007. « Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide Intracanal Dressing: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *International Endodontic Journal* 40 (1): 2-10. https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01197.x.

Savić ND, Vojnovic S, Glišić BĐ, Crochet A, Pavic A, Janjić GV, et al. 2018. « Mononuclear Silver(I) Complexes with 1,7-Phenanthroline as Potent Inhibitors of Candida Growth ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 156: 760-73. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.049.

Sayin TC, Cehreli ZC, Deniz D, Akcay A, Tuncel B, Dagli F. 2009. « Time-Dependent Decalcifying Effects of Endodontic Irrigants with Antibacterial Properties ». *Journal of Endodontics* 35 (2): 280-83. https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.016.

Scelza MZ, Coil J, Alves GG. 2012. « Effect of Time of Extraction on the Biocompatibility of Endodontic Sealers with Primary Human Fibroblasts ». *Brazilian Oral Research* 26 (5): 424-30. https://doi.org/10.1590/s1806-83242012000500008.

Schilder H. 1965. « Endodontic-Periodontal Therapy. I ». *Philadelphia: Lea and Febiger*, Grossman L, Endodontic Practice (6th ed.).

Schilder H. 1974. « Cleaning and Shaping the Root Canal ». *Dental Clinics of North America* 18 (2): 269-96.

Schmidt JC, Walter C, Amato M, Weiger R. 2014. « Treatment of Periodontal-Endodontic Lesions--a Systematic Review ». *Journal of Clinical Periodontology* 41 (8): 779-90. https://doi.org/10.1111/jcpe.12265.

Schwartz RS. 2006. « Adhesive Dentistry and Endodontics. Part 2: Bonding in the Root Canal System-the Promise and the Problems: A Review ». *Journal of Endodontics* 32 (12): 1125-34. https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.08.003.

Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Dummer. 2017. « Antibiotics in Endodontics: A Review ». *International Endodontic Journal* 50 (12): 1169-84. https://doi.org/10.1111/iej.12741.

Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. 2015. « Endodontic Medicine: Connections

between Apical Periodontitis and Systemic Diseases ». *International Endodontic Journal* 48 (10): 933-51. https://doi.org/10.1111/iej.12507.

Seltzer S, Soltanoff W, Bender IB. 1969. « Epithelial Proliferation in Periapical Lesions ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 27 (1): 111-21. https://doi.org/10.1016/0030-4220(69)90038-3.

Sepolia S, Verma P, Koyalada S. 2021. « Prevalence and awareness of endo-perio lesions among dentists: A questionnaire based study ». 2021. Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research 9 (1):123-127. https://doi: 10.21276/jamdsr

Shao W, Xiao F, Xu ZX, Ren RH, Wang Y, Wu YQ. 2018. « Treatment of Severe Periodontic-Endodontic Combined Lesions with Minocycline Hydrochloride Ointment Combined with Mineral Trioxide Aggregate ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 16 (2): 1389-96. https://doi.org/10.3892/etm.2018.6341.

Shetty S, Manjunath MK, Tejaswi S. 2014. « An In-Vitro Evaluation of the PH Change Through Root Dentin Using Different Calcium Hydroxide Preparations as an Intracanal Medicament ». *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 8 (10): ZC13-16. https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/9374.4950.

Shojaee NS, Adl A, Jafarpur D, Sobhnamayan F. 2018. « Effect of Different Water-to-Powder Ratios on the Compressive Strength of Calcium-Enriched Mixture Cement ». *Iranian Endodontic Journal* 13 (3): 395-97. https://doi.org/10.22037/iej.v13i3.20568.

Siew KL, Goh V, Goo CL, Corbet E, Leung WK. 2019. « The Periodontal-Endodontic Relationship, What Do We Know? » *Periodontology and Dental Implantology*. https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.78664.

Signoretti FG, Gomes BP, Montagner F, Barrichello Tosello F, Jacinto RC. 2011. « Influence of 2% Chlorhexidine Gel on Calcium Hydroxide Ionic Dissociation and Its Ability of Reducing Endotoxin ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 111 (5): 653-58. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.11.016.

Silva AR, Santos EB, Pinto SC, Gomes JC, Vaz IP, Carvalho MF. 2014. « Antimicrobial Effect and Transdentinal Diffusion of New Intracanal Formulations Containing Nitrofurantoin or Doxycycline ». *Brazilian Dental Journal* 25 (5): 425-29. https://doi.org/10.1590/0103-6440201302338.

Simon JH, Glick DH, Frank AL. 1972. « The Relationship of Endodontic-Periodontic Lesions ». *Journal of Periodontology* 43 (4): 202-8. https://doi.org/10.1902/jop.1972.43.4.202.

Singh P. 2011. « Endo-Perio Dilemma: A Brief Review ». *Dental Research Journal* 8 (1): 39-47.

Siqueira JF, Lopes HP. 1999. « Mechanisms of Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide: A Critical Review ». *International Endodontic Journal* 32 (5): 361-69. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00275.x.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. 2013. « Microbiology and Treatment of Acute Apical Abscesses ». *Clinical Microbiology Reviews* 26 (2): 255-73. https://doi.org/10.1128/CMR.00082-12.

Sirén EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Ørstavik D. 2004. « In Vitro Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine or Iodine Potassium Iodide on Enterococcus Faecalis ». *European Journal of Oral Sciences* 112 (4): 326-31. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00144.x.

Slots J. 2017. « Periodontitis: Facts, Fallacies and the Future ». *Periodontology 2000* 75 (1): 7-23. https://doi.org/10.1111/prd.12221.

Socransky SS, Haffajee AD. 1992. « The Bacterial Etiology of Destructive Periodontal Disease: Current Concepts ». *Journal of Periodontology* 63 (4 Suppl): 322-31. https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.4s.322.

Solomon C, Chalfin H, Kellert M, Weseley P. 1995. « The Endodontic-Periodontal Lesion: A Rational Approach to Treatment ». *Journal of the American Dental Association (1939)* 126 (4): 473-79. https://doi.org/10.14219/jada.archive.1995.0210.

Sonde N, et Edwards M. 2020. « Perio-Endo Lesions: A Guide to Diagnosis and Clinical Management ». *Primary Dental Journal* 9 (4): 45-51. https://doi.org/10.1177/2050168420963305.

Sukawat C, Srisuwan T. 2002. « A Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Three Calcium Hydroxide Formulations on Human Dentin Infected with Enterococcus Faecalis ». *Journal of Endodontics* 28 (2): 102-4. https://doi.org/10.1097/00004770-200202000-00013.

Suvan J, Leira Y, Moreno Sancho FM, Graziani F, Derks J, Tomasi C. 2020. « Subgingival Instrumentation for Treatment of Periodontitis. A Systematic Review ». *Journal of Clinical Periodontology* 47 Suppl 22: 155-75. https://doi.org/10.1111/jcpe.13245.

Sy K, Flamme J, Maquet H, Chai F, Neut C, Siepmann F, et al. 2020. « Antimicrobial Effect and Physical Properties of an Injectable "Active Oxygen" Gel for the Treatment of Periodontitis ». *American Journal of Dentistry* 33 (6): 305-9.

Takahashi K, Kishi Y, Kim S. 1982. « A Scanning Electron Microscope Study of the Blood Vessels of Dog Pulp Using Corrosion Resin Casts ». *Journal of Endodontics* 8 (3): 131-35. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(82)80249-5.

Tamse A, Fuss Z, Lustig J, Kaplavi J. 1999. « An Evaluation of Endodontically Treated Vertically Fractured Teeth ». *Journal of Endodontics* 25 (7): 506-8. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80292-1.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. 2003. « Effect of Different Irrigation Solutions and Calcium Hydroxide on Bacterial LPS ». *International Endodontic Journal* 36 (11): 733-39. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.2003.00717.x.

Tavares TD, Antunes JC, Padrão J, Ribeiro AI, Zille A, Amorim MTP et al. 2020. « Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria ». *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 9 (6): E314. https://doi.org/10.3390/antibiotics9060314.

Tenorio D, Cruchley A, Hughes FJ. 1993. « Immunocytochemical Investigation of the Rat Cementoblast Phenotype ». *Journal of Periodontal Research* 28 (6 Pt 1): 411-19.

Tewari S, Sharma G, Tewari S, Mittal S, Bansal S. 2018. « Effect of Immediate Periodontal Surgical Treatment on Periodontal Healing in Combined Endodontic-Periodontal Lesions with Communication-A Randomized Clinical Trial ». *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 8 (2): 105-12. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.04.002.

Torabinejad, M, Kiger RD. 1985. « A Histologic Evaluation of Dental Pulp Tissue of a Patient with Periodontal Disease ». *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* 59 (2): 198-200. https://doi.org/10.1016/0030-4220(85)90018-0.

Trombelli L, Heitz-Mayfield LJ, Needleman I, Moles D, Scabbia A. 2002. « A Systematic Review of Graft Materials and Biological Agents for Periodontal Intraosseous Defects ». *Journal of Clinical Periodontology* 29 Suppl 3: 117-35; discussion 160-162. https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.29.s3.7.x.

Trope M, Delano EO, Orstavik D. 1999. « Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: Single vs. Multivisit Treatment ». *Journal of Endodontics* 25 (5): 345-50. https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81169-6.

Trulsson M. 2005. « Sensory and Motor Function of Teeth and Dental Implants: A Basis for Osseoperception ». *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 32 (1-2): 119-22. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2005.04139.x.

Tülü G, Kaya BÜ, Çetin ES, Köle M. 2021. « Antibacterial Effect of Silver Nanoparticles Mixed with Calcium Hydroxide or Chlorhexidine on Multispecies Biofilms ». *Odontology* 109(4):802-811. https://doi.org/10.1007/s10266-021-00601-8.

Turk BT, Sen BH, Ozturk T. 2009. « In Vitro Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide Mixed with Different Vehicles against Enterococcus Faecalis and Candida Albicans ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 108 (2): 297-301. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.03.029.

Türker SA, Uzunoğlu E. 2016. « Effect of Powder-to-Water Ratio on the Push-out Bond Strength of White Mineral Trioxide Aggregate ». *Dental Traumatology: Official Publication of International Association for Dental Traumatology* 32 (2): 153-55. https://doi.org/10.1111/edt.12194.

Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA. 2017. « Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against Enterococcus Faecium, Klebsiella Pneumoniae and Acinetobacter Baumannii in Planktonic and Biofilm Phenotypes ». *Scientific Reports* 7 (1): 5911. https://doi.org/10.1038/s41598-017-05976-9.

Venturi M, Prati C, Capelli G, Falconi M, Breschi L. 2003. « A Preliminary Analysis of the Morphology of Lateral Canals after Root Canal Filling Using a Tooth-Clearing Technique ». *International Endodontic Journal* 36 (1): 54-63. https://doi.org/10.1046/j.0143-2885.2003.00613.x.

Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. 2012. « One- versus Two-Visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histobacteriologic Study ». *Journal of Endodontics* 38 (8): 1040-52. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.04.010.

Vestergaard M, Skive B, Domraceva I, Ingmer H, Franzyk H. 2021. « Peptide/β-Peptoid Hybrids with Activity against Vancomycin-Resistant Enterococci: Influence of Hydrophobicity and Structural Features on Antibacterial and Hemolytic Properties ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (11): 5617. https://doi.org/10.3390/ijms22115617.

Visinescu D, Hussien MD, Moreno JC, Negrea R, Birjega R, Somacescu S, et al. 2018. « Zinc Oxide Spherical-Shaped Nanostructures: Investigation of Surface Reactivity and Interactions with Microbial and Mammalian Cells ». *Langmuir: The ACS Journal of Surfaces and Colloids* 34 (45): 13638-51. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02528.

Voel D, Voel JG, Pratt CW. 1999. « Fundamentals Of Biochemistry ». 1st ed. Hobokken, NJ: John Wiley and Sons, 93-123 ».

Von Arx T, Bosshardt D. 2018. « The Use of Enamel Matrix Derivative (Emd) for Treatment of Combined Apicomarginal Lesions in Apical Surgery: A Retrospective Analysis ». *European Endodontic Journal* 3 (3): 146-52. https://doi.org/10.14744/eej.2018.97269.

von Arx T, Alsaeed M. 2011. « The Use of Regenerative Techniques in Apical Surgery: A Literature Review ». *The Saudi Dental Journal* 23 (3): 113-27.

Waltimo TM, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. 1999. « Susceptibility of Oral Candida Species to Calcium Hydroxide in Vitro ». *International Endodontic Journal* 32 (2): 94-98. https://doi.org/10.1046/j.1365-2591.1999.00195.x.

Wan L, Lu HB, Xuan DY, Yan YX, Zhang JC. 2015. « Histological Changes within Dental Pulps in Teeth with Moderate-to-Severe Chronic Periodontitis ». *International Endodontic Journal* 48 (1): 95-102. https://doi.org/10.1111/iej.12282.

Wei Y, Deng Y, Ma S, Ran M, Jia Y, Meng J, et al. 2021. « Local Drug Delivery Systems as Therapeutic Strategies against Periodontitis: A Systematic Review ». *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 333: 269-82. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.03.041.

Winfred SB, Meiyazagan G, Panda JJ, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan VS, et al. 2014. « Antimicrobial Activity of Cationic Peptides in Endodontic Procedures ». *European Journal of Dentistry* 8 (2): 254-60. https://doi.org/10.4103/1305-7456.130626.

Winkler B, Margerison JK. 2012. « Mechanical Properties of the Bovine Claw Horn during Lactation ». *Journal of Dairy Science* 95 (4): 1714-28. https://doi.org/10.3168/jds.2011-4489.

Wolf HF, Rateitschak, EM, Rateitschak KH et al. 2012. Parodontologie. 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Thieme Verlag. https://doi.org/10.1055/b-002-41852.

Wong R, Hirsch RS, Clarke N. 1989. « Endodontic Effects of Root Planing in Humans ». *Endodontics & Dental Traumatology* 5 (4): 193-96. https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1989.tb00359.x.

Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. 2014. « Evaluation of the Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles against Enterococcus Faecalis Biofilm ». *Journal of Endodontics* 40 (2): 285-90. https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.08.022.

Xia M, Qi Q. 2013. « Bacterial Analysis of Combined Periodontal-Endodontic Lesions by Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ». *Journal of Oral Science* 55 (4): 287-91. https://doi.org/10.2334/josnusd.55.287.

Xie C, Wang L, Yang P, Ge S. 2017. « Cemental Tears: A Report of Four Cases and Literature Review ». *Oral Health & Preventive Dentistry* 15 (4): 337-45. https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a38745.

Ximenes M, Cardoso M. 2012. « Assessment of Diffusion of Hydroxyl and Calcium Ions of Root Canal Filling Materials in Primary Teeth ». *Pediatric Dentistry* 34 (2): 122-26.

Xue Y, Tang M, Hieda Y, Fujihara J, Takayama K, Takatsuka H, et al. 2009. « High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Chlorhexidine in Whole Blood by Solid-Phase Extraction and Kinetics Following an Intravenous Infusion in Rats ». *Journal of Analytical Toxicology* 33 (2): 85-91. https://doi.org/10.1093/jat/33.2.85.

Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM. 2014. « Deleterious Effect of Triple Antibiotic Paste on Human Periodontal Ligament Fibroblasts ». *International Endodontic Journal* 47 (8): 769-75. https://doi.org/10.1111/iej.12216.

Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Sanders JL, Brown EM. 2000. « Activation of P42/44 and P38 Mitogen-Activated Protein Kinases by Extracellular Calcium-Sensing Receptor Agonists Induces Mitogenic Responses in the Mouse Osteoblastic MC3T3-E1 Cell Line ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279 (2): 363-68. https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3955.

Yamauchi M, Yamaguchi T, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K. 2005. « Involvement of Calcium-Sensing Receptor in Osteoblastic Differentiation of Mouse MC3T3-E1 Cells ». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 288 (3): E608-616. https://doi.org/10.1152/ajpendo.00229.2004.

Yang X, Lan W, Xie J. 2022. « Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of Chlorogenic Acid Grafted Chitosan against Staphylococcus Aureus ». *Microbial Pathogenesis* 2:105748. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105748.

Yazdanpanahi N, Behzadi A, Zare Jahromi M. 2021. « Long-Term PH Alterations in the Periradicular Area Following the Application of Calcium Hydroxide and MTA ». *Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)* 22 (2): 90-95. https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2020.86534.1195.

Yousefshahi H, Aminsobhani M, Shokri M, Shahbazi R. 2018. « Anti-Bacterial Properties of Calcium Hydroxide in Combination with Silver, Copper, Zinc Oxide or Magnesium Oxide ». *European Journal of Translational Myology* 28 (3): 7545. https://doi.org/10.4081/ejtm.2018.7545.

Zaharescu A, Mârțu I, Luchian AI, Mârțu MA, Șufaru IG, Mârțu C, et al. 2021. « Role of Adjunctive Therapy with Subantimicrobial Doses of Doxycycline in Glycemic Control (HbA1c) in Patients with Diabetes and Endo-Periodontal Lesions to Prevent Sinus Complications ». *Experimental and Therapeutic Medicine* 21 (3): 277. https://doi.org/10.3892/etm.2021.9708.

Zehnder M. 2001. « Endodontic Infection Caused by Localized Aggressive Periodontitis: A Case Report and Bacteriologic Evaluation ». *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* 92 (4): 440-45. https://doi.org/10.1067/moe.2001.117270.

Zehnder M, Gold SI, Hasselgren G. 2002. « Pathologic Interactions in Pulpal and Periodontal Tissues ». *Journal of Clinical Periodontology* 29 (8): 663-71. https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290801.x.

Zhang S, Tang H, Wang Y, Nie B, Yang H, Yuan W et al. 2020. « Antibacterial and Antibiofilm Effects of Flufenamic Acid against Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus ». *Pharmacological Research* 160: 105067. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105067.

Zhou HM, Shen Y, Wang ZJ, Li L, Zheng YF, Häkkinen L, et al. 2013. « In Vitro Cytotoxicity Evaluation of a Novel Root Repair Material ». *Journal of Endodontics* 39 (4): 478-83. https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.026.

Zhou YH, Xie Q. 2021. « Total Glycosides from Eucommia Ulmoides Seed Promoted Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Formation in Ovariectomized Rats through Regulating Notch Signaling Pathway ». *Journal of Orthopaedic Surgery and Research* 16 (1): 660. https://doi.org/10.1186/s13018-021-02797-5.

8. ANNEXES

Annexe 1. Figures

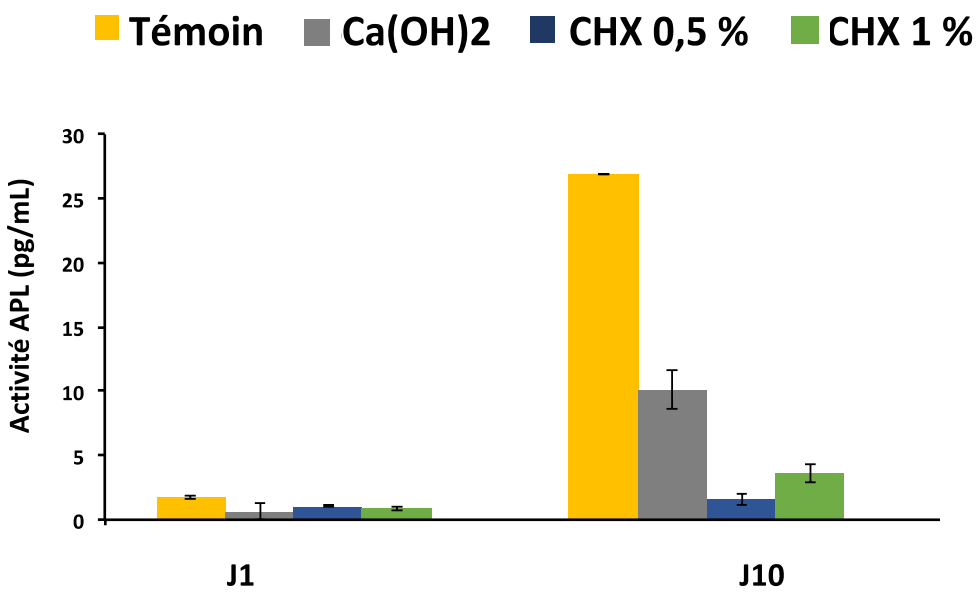


Figure 1. Activité de la phosphatase alcaline (ALP) intracellulaire des cémentoblastes après le contact avec les extraits purs (dilution 1) d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 1 et 10 jours (n=3).

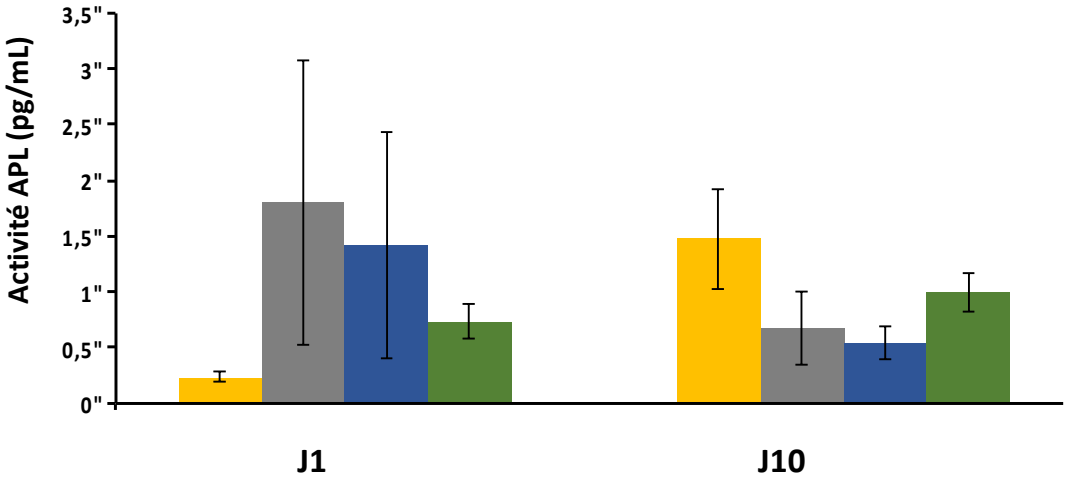


Figure 2. Activité de la phosphatase alcaline (ALP) intracellulaire des ostéoblastes après le contact avec les extraits purs (dilution 1) d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 1 et 10 jours (n=3).

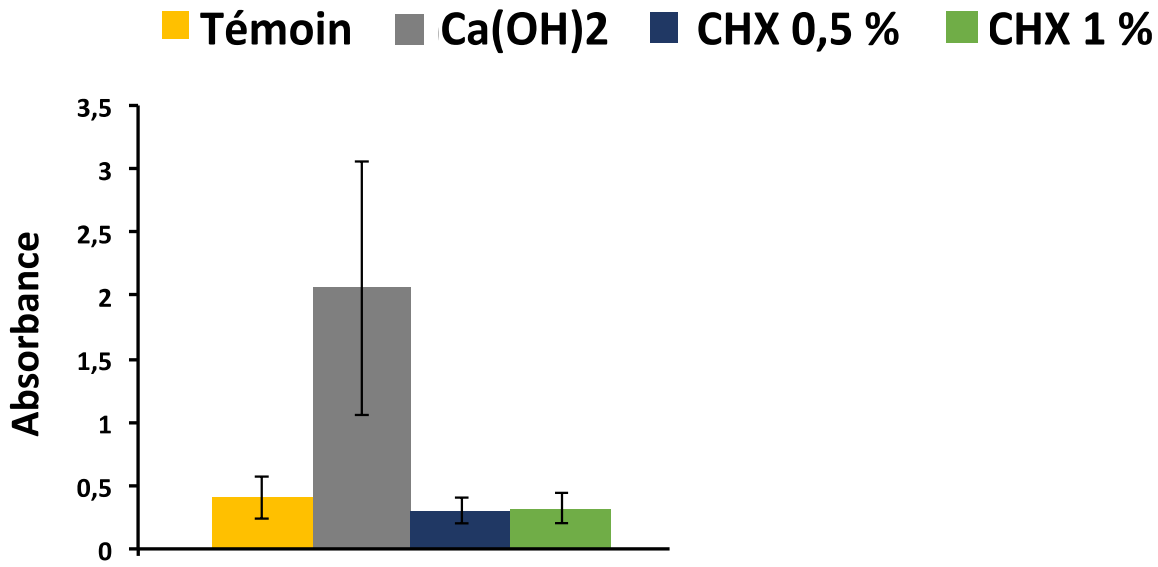


Figure 3. Semi-quantification du dépôt de calcium dans les cémentoblastes après coloration au rouge d'alizarine et leur dissolution via le chlorure de cétylpyridinium, après le contact avec les extraits purs (dilution 1), d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 14 jours, (n=3).

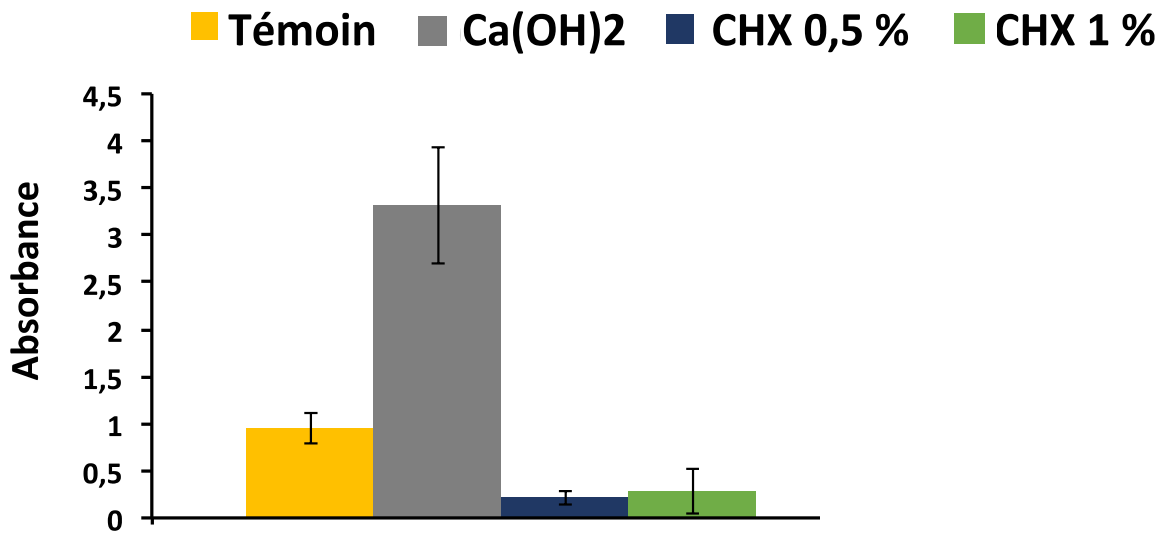


Figure 4. Semi-quantification du dépôt de calcium dans les ostéoblastes après coloration au rouge d'alizarine et leur dissolution via le chlorure de cétylpyridinium, après le contact avec les extraits purs (dilution 1), d'hydroxyde de calcium avec (chlorhexidine à 0,5% [CHX 0,5%] et à 1% [CHX 1%]) ou sans chlorhexidine ($Ca[OH]_2$), pendant 14 jours (n=3).

Article

How Adding Chlorhexidine or Metallic Nanoparticles Affects the Antimicrobial Performance of Calcium Hydroxide Paste as an Intracanal Medication: An In Vitro Study

Kadiatou Sy [1,*,†], Kevimy Agossa [1,†], Mickaël Maton [1], Henry Chijcheapaza-Flores [1], Bernard Martel[2], Florence Siepmann [1], Etienne Deveaux [1], Nicolas Blanchemain [1] and Christel Neut [3]

Citation: Sy, K.; Agossa, K.; Maton, M.; Chijcheapaza-Flores, H.; Martel, B.; Siepmann, F.; Deveaux, E.; Blanchemain, N.; Neut, C. How Adding Chlorhexidine or Metallic Nanoparticles Affects the Antimicrobial Performance of Calcium Hydroxide Paste as an Intracanal Medication: An In Vitro Study. *Antibiotics* **2021**, *10*, x. https://doi.org/10.3390/xxxxx

Academic Editor: Andreas Braun and Felix Krause

Received: 09 October 2021
Accepted: 02 November 2021
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

[1] U1008—Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials, Inserm, CHU Lille, University of Lille, 59000 Lille, France; kevimy.agossa@univ-lille.fr (K.A.); mickael.maton@univ-lille.fr (M.M.); henry.chijcheapazaflores.etu@univ-lille.fr (H.C.-F.); florence.siepmann@univ-lille.fr (F.S.); etienne.deveaux@univ-lille.fr (E.D.); nicolas.blanchemain@univ-lille.fr (N.B.)
[2] UMET—Unité Matériaux et Transformations, CNRS—Centre National de la Recherche Scientifique, INRA—Institut National de la Recherche Agronomique, ENSCL—Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille, UMR—Unité Matériaux et Transformations 8207, University of Lille 59655 Lille, France; bernard.martel@univ-lille.fr
[3] U1286 Infinite—Institute for Translational Research in Inflammation, Inserm, CHU Lille, University of Lille, 59000 Lille, France; christelneut@nordnet.fr
* Correspondence: kadia2sy@gmail.com
† These authors contributed equally to this work.

Abstract: The aim of our study was to explore the potential value of metallic (Ag, Cu, and Zn) salts, polymer/metallic nanoparticles, and chlorhexidine (CHX) for improving the antimicrobial activity of calcium hydroxide (CH) against *E. faecalis* and *C. albicans*, associated with persistent endodontic infections. A first screening was performed by determining minimum inhibitory/bactericidal concentrations (MIC/MBC). Antimicrobial activity of the CH paste mixed with metallic salts, chitosan or cyclodextrin polymer metallic nanoparticles was compared to the antimicrobial activity of CH paste alone and CH+ CHX using a time-kill kinetics assay. The effect of the antimicrobials on the rheological and the key mechanical properties were also examined. Copper and zinc were discarded because of their MIC/MBC values and silver because of its kill time curve profile. Except for a slower setting time after 24 h and a higher weight loss after 1 week of incubation, the mechanical behavior of the CH paste was unaffected by the addition of CHX. Polymeric/metallic nanoparticles failed to potentiate the antimicrobial effect of CH. By contrast, CHX increased this effect and thus could help eradicate *E. faecalis* associated with persistent root canal infections without altering the desired key physical properties of the CH paste.

Keywords: endodontic infections; calcium hydroxide; chlorhexidine; copper; silver; zinc; nanoparticle; antimicrobial properties; mechanical properties; rheological properties

1. Introduction

Apical periodontitis is an inflammatory disorder of peri radicular tissues caused by persistent microbial infection within the root canal system [1]. The effective elimination of these microorganisms and the prevention of recontamination of the root

canal system is the basis of root canal therapy [2]. Even when the most stringent procedures of chemomechanical cleaning and shaping are followed, in some cases, apical periodontitis may persist due to the anatomical complexities of the root canal system [2–4]. This is why the complementary application of intracanal antimicrobial medications between sessions has been proposed to significantly reduce the bacterial count [5–7]. Calcium hydroxide (CH) paste is the most widely used intracanal medication [8,9]. Its antimicrobial effect has been attributed to the release of hydroxyl ions, which produce a highly alkaline environment (pH 12.5) in which most microorganisms cannot survive [10]. However, it has been suggested that the effectiveness of CH paste may be limited, especially in cases of persistent endodontic infections, due to the presence of resistant microbial species [3,10]. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), a facultative anaerobic Gram-positive bacterium, and *Candida albicans* (*C. albicans*), the most common yeast in the oral cavity, are the species most frequently associated with root canal treatment failure and refractory apical periodontitis [3]. They have been detected in 22–77% [3,7] to 1–17% [11] of samples taken from infected root canals. They share characteristics such as dentin penetration ability and high pH tolerance, which may explain their resistance to CH-based intracanal medications [3,10,11].

Various antimicrobial substances have been tested as adjuvants for CH paste in an attempt to increase its antimicrobial activity [12]. Chlorhexidine (CHX) is the reference antiseptic molecule in dentistry and displays a broad spectrum of activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungi [13–15]. It is biocompatible and adsorbs to dental tissues, allowing for prolonged, gradual release at therapeutic levels [13–16]. The benefit of mixing CH with CHX has been extensively studied [13,15,17–19]. Although a number of in vitro and clinical studies have reported that CH + CHX is more effective in eliminating bacteria than CH alone [13,15,18–20], other studies have failed to replicate this effect [9,21–23]. Differences in drug concentrations, solubility related to the form of the vehicle (aqueous, viscous, or oil), and antimicrobial testing methods may have contributed to this discrepancy [11,13,16]. Metallic nanoparticles (MNPs) have also proven to be effective in controlling oral infections when coated on or incorporated into various materials [24–26]. They have been proposed as promising alternatives to traditional antimicrobial agents [27–29]. Silver (Ag), copper (Cu), and zinc (Zn) MNPs have received the most attention for their antimicrobial properties [24–27,30].

Polymeric nanoparticles (PNPs) have been recently developed as sophisticated carriers for drug delivery [31–34]. They are comprised of active pharmaceutical ingredients that are adsorbed to or entrapped in a polymeric structure [34]. The advantages of PNPs as drug carriers include their improved stability and drug release profiles and their biocompatibility, biodegradability, and ease of production [34]. Metallic nanoparticles have been successfully synthesized in aqueous solutions using chitosan (CHT) or cyclodextrin polymers (CDP) as reducing and stabilizing agents [35,36]. CHT is a biocompatible and biodegradable polysaccharide produced by the deacetylation of chitin extracted from crustaceans, yeasts, and algae [31]. CHT is biodegradable, biocompatible, hemostatic, antimicrobial, and analgesic [31]. These properties are related to its cationic character and the size of the polymer chain [37].

Cyclodextrins (CDs) are cyclic oligosaccharides with glucopyranose units joined by α-1, 4 glycosidic bonds. CDs have a truncated cone-shaped 3D structure. They have a hydrophobic cavity that can form inclusion complexes with a large variety of lipophilic molecules and that can work as a drug carrier in sustained release drug delivery systems [38–44]. Promising results have been reported with CHT/CDP/metallic nanoparticles. We recently developed a wound dressing with a protective cover composed of CHT and CDP for the sustained release of silver [33]. To date, no studies have investigated the addition of CHT or CDP metallic nanoparticles to CH-based intracanal medications in order to enhance the antimicrobial activity of CH against CH-resistant microorganisms.

The present study compared the in vitro antimicrobial activities of CH paste mixed with different metallic salts or polymer/metallic nanoparticles (PMNPs): CHT/CDP metallic nanoparticles (Ag, Cu, or Zn). CH alone was used as a negative control, and CH + CHX was used as a positive control. The aim was to determine the best intracanal medication candidate to help eradicate *E. faecalis* and *C. albicans* from infected root canals. Since ultimate clinical efficacy also depends on the ability of the material to be easily handled and spread into narrow anatomical spaces [45,46], the key mechanical properties and flowability of the best candidate formulations were also investigated.

2. Results

2.1. Microbiological Tests

2.1.1. Minimum Inhibitory Concentration (MICs) and Minimum Bactericidal Concentration (MBCs)

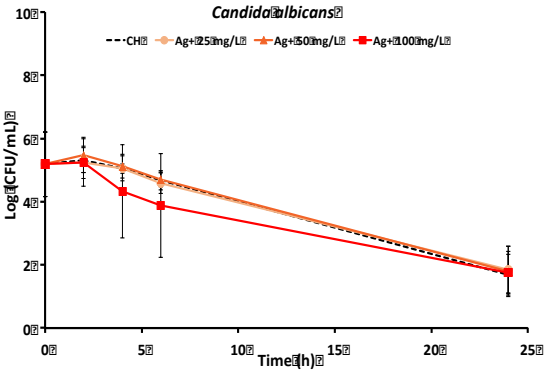
Table 1 shows the MICs results for all the antimicrobial agents tested on *E. faecalis* and *C. albicans*. The MICs/MBCs of copper (>3200 mg/L) and zinc (≥3200 mg/L) in free form or as PMNPs reached or exceeded 3200 mg/L, the upper limit of the concentration range studied, meaning that the microbial strains studied were not susceptible to these molecules. This is why the copper- and zinc-based formulations were excluded from further experiments. The MICs (25 to 50 mg/L) and MBCs (50 to >100 mg/L) of silver in free form or as PMNPs and the MICs/MBCs of chlorhexidine (2 to 16 mg/L) indicated that these molecules were bactericidal and bacteriostatic at low concentrations and that the microbial strains studied were susceptible to them. Silver and CHX were thus selected for the next experiments.

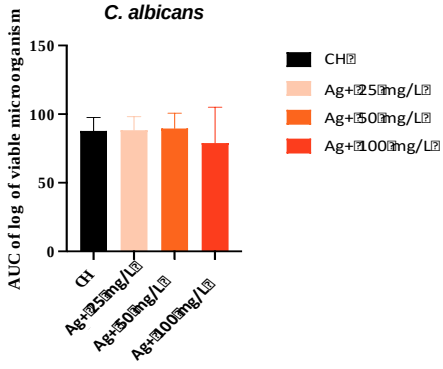
Table 1. Minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) (mg/L) of copper (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), silver (Ag^{+}), and chlorhexidine (CHX) solutions, chitosan metallic nanoparticles (CHT/Cu, CHT/Zn, CHT/Ag), and cyclodextrin polymer metallic nanoparticles (CDP/Cu, CDP/Zn, CDP/Ag) against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* ($n = 3$).

Antimicrobials Agents	*Enterococcus faecalis* MIC/MBC (mg/L)	*Candida albicans* MIC/MBC (mg/L)
Cu2+	>3200	>3200
CHT/Cu	>3200	>3200
CDP/Cu	>3200	>3200
Zn2+	3200	3200
CHT/Zn	3200/>3200	3200/>3200
CDP/Zn	3200	3200
Ag+	50/>200	50
CHT/Ag	50/>100	25/50
CDP/Ag	25/>100	25/50
CHX	2/16	4

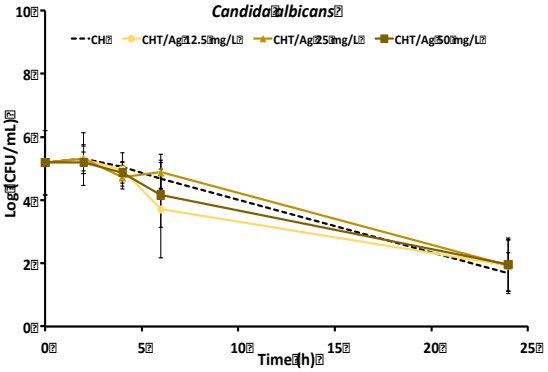
2.1.2. Time-Kill Kinetics Assay

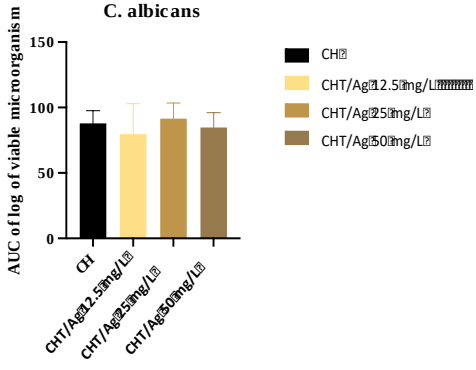
The time-kill curve profiles of the CH formulations with silver (Ag^{+}, CHT/Ag, CDP/Ag) and CHX against *C. albicans* and *E. faecalis* are presented in Figure 1. Silver was tested at concentrations ranging from 12.5 mg/L to 100 mg/L (Figure 1a–c,e–g), while CHX was tested using four different concentrations ranging from 0.5% (5×10^3 mg/L) to 4% (40×10^3 mg/L) (Figure 1d,h). Similar concentrations have been reported in the literature and correspond to 0.5×, 1×, and 2× MIC for silver and 0.25×, 0.5×, 1×, and 2× the most common concentration used in studies for CHX (2%) [7,24,30,31,47,48]. The time-kill kinetics profile of the drug-free CH paste (dotted line) indicated that there was a reduction in viable *C. albicans* cells but not of *E. faecalis* cells. Silver-loaded CH pastes had similar time-kill kinetics profiles than CH, for all forms (Ag^{+}, CHT/Ag, and CDP/Ag) and all concentrations. The time-kill kinetics profile of CHX against *C. albicans* was similar to the control (drug-free CH paste). On the other hand, the time-kill kinetics profile of the CHX-loaded CH paste against *E. faecalis* showed a reduction in the number of viable cells. The antimicrobial effect was dose-dependent. The difference was significant ($p < 0.05$) for the 1% and 2% CHX pastes and was highly significant ($p < 0.01$) for the 4% CHX paste compared to the control (drug-free CH paste). CHX at 1% and 2% displayed the best efficacy at the lowest concentrations against *E. faecalis* and *C. albicans* and were selected for the CHX release tests.


Candida albicans
CH
Ag+ 25 mg/L
Ag+ 50 mg/L
Ag+ 100 mg/L
Log (CFU/mL)
Time (h)

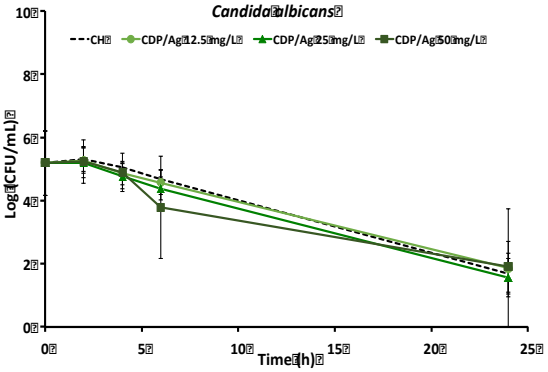

C. albicans
AUC of log of viable microorganism
CH
Ag+ 25 mg/L
Ag+ 50 mg/L
Ag+ 100 mg/L

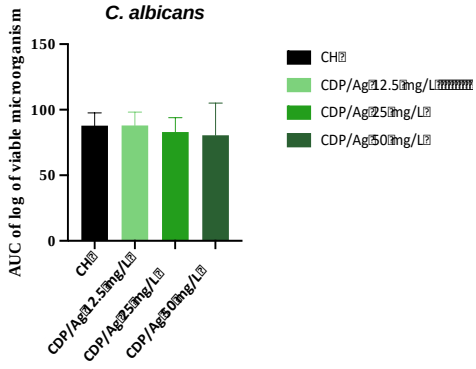
(a)


Candida albicans
CH
CHT/Ag 12.5 mg/L
CHT/Ag 25 mg/L
CHT/Ag 50 mg/L
Log (CFU/mL)
Time (h)

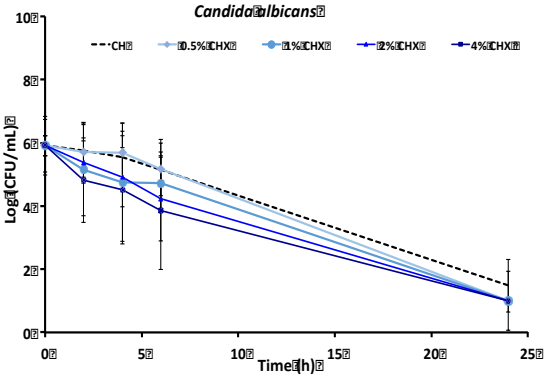

C. albicans
AUC of log of viable microorganism
CH
CHT/Ag 12.5 mg/L
CHT/Ag 25 mg/L
CHT/Ag 50 mg/L

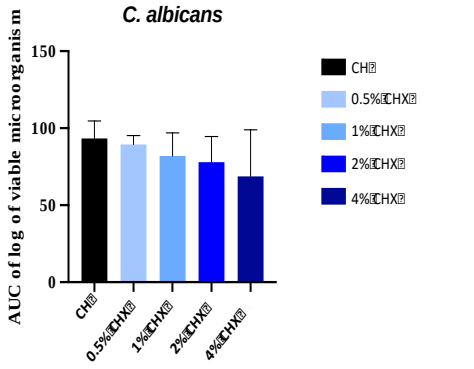
(b)


Candida albicans
CH
CDP/Ag 12.5 mg/L
CDP/Ag 25 mg/L
CDP/Ag 50 mg/L
Log (CFU/mL)
Time (h)


C. albicans
AUC of log of viable microorganism
CH
CDP/Ag 12.5 mg/L
CDP/Ag 25 mg/L
CDP/Ag 50 mg/L

(c)


Candida albicans
CH
0.5% CHX
1% CHX
2% CHX
4% CHX
Log (CFU/mL)
Time (h)


C. albicans
AUC of log of viable microorganism
CH
0.5% CHX
1% CHX
2% CHX
4% CHX

(d)

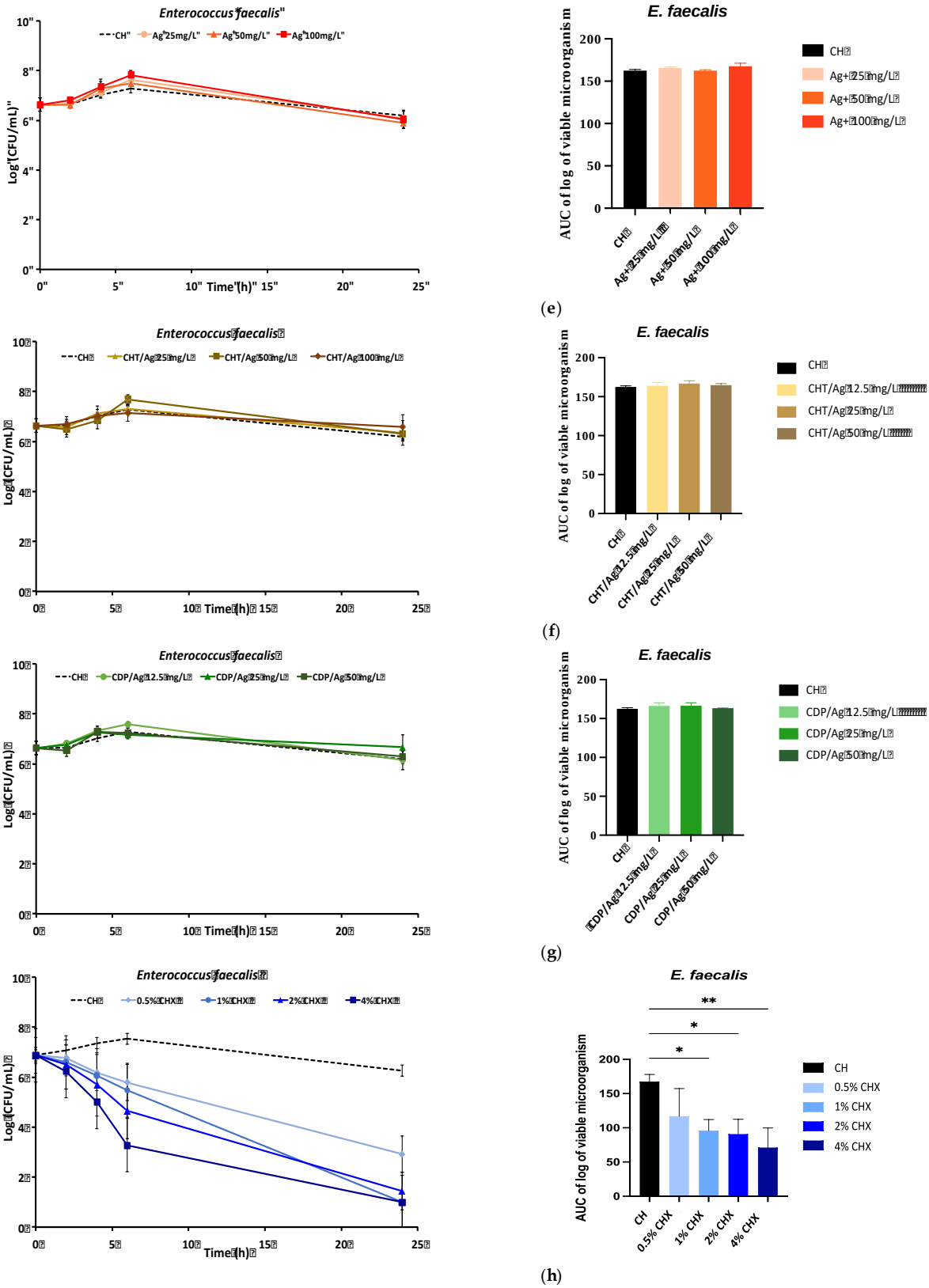


Figure 1. Time-kill kinetics curves and air under the curves (AUC) of the time-kill kinetics for *Candida albicans* (**a**–**d**) and *Enterococcus faecalis* (**e**–**h**) with calcium hydroxide (CH) alone (dotted line) compared to the mixtures (**a**,**e**): CH + silver solution (Ag+) 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L; (**b**,**f**) CH + silver as chitosan silver nanoparticles (CHT/Ag) 12.5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L; (**c**,**g**) CH + silver as cyclodextrin polymer silver nanoparticles (CDP/Ag) 12.5 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L, and (**d**,**h**) CH + CHX solution 0.5% (5×10^3 mg/L), 1% (10×10^3 mg/L), 2% (20×10^3 mg/L), 4% (40×10^3 mg/L). (*): significant difference ($p < 0.05$) and (**): significant difference ($p < 0.01$) between the CH formulation and the test formulations (ANOVA test).

2.1.3. Drug Release Measurements

Chlorhexidine and silver release were determined by HPLC-UV and ICP-MS, respectively, in order to assess the performance of a CH paste as a drug release system. Figure 2 shows the amount of CHX released (mg/L) as a function of time at four time points (4 h, 24 h, 28 h, 48 h) for 1% CHX and 2% CHX. These two dosages displayed comparable antimicrobial activities to 4% CHX (the highest dosage studied) and were thus selected given the risk of dose-dependent CHX toxicity [49]. The 1% CHX/CH paste released 2.350 ± 0.008 mg/L of CHX after 4 h, slightly less than the 2% CHX/CH paste (2.630 ± 0.011 mg/L) ($p < 0.01$), which represent release rates of 0.024% and 0.013% of the initial dosage, respectively. Comparable amounts of CHX were released at 24 h (2.690 ± 0.013 mg/L and 2.600 ± 0.021 mg/L), 28 h (1.790 ± 0.001 mg/L and 1.850 ± 0.009 mg/L), and 48 h (1.760 ± 0.007 mg/L and 1.870 ± 0.005 mg/L) by the 1% CHX/CH and 2% CHX/CH pastes, respectively.

As the time-kill assay indicated that there was no difference in antimicrobial activity between CH alone and Ag-supplemented CH paste, we measured the amounts of silver released in the form of an Ag solution and a PMNP solution to explore a possible correlation between the release profile of the active ingredient and the antimicrobial effect observed. The values for silver after centrifugation as determined by ICP-MS were below the limit of quantification (<0.1 µg/L).

In terms of CHX release, 1% CHX displayed the best efficacy at the lowest concentration and had a better release rate than 2% CHX (0.024% vs. 0.013% at 4 h) and was thus selected for the mechanical tests.

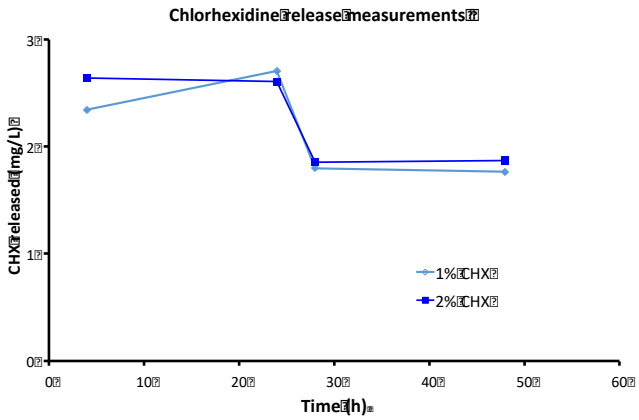


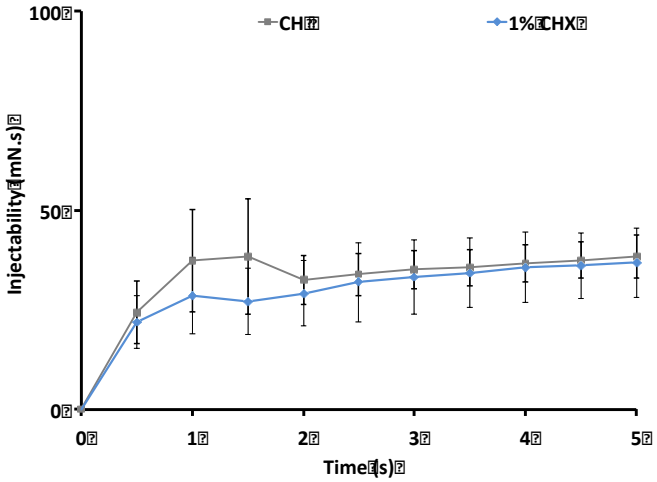
Figure 2. Chlorhexidine release measurements: release of chlorhexidine (CHX) from calcium hydroxide + CHX pastes with 1% (10×10^3 mg/L) and 2% (20×10^3 mg/L) CHX over 48 h.

2.2. Physical Properties

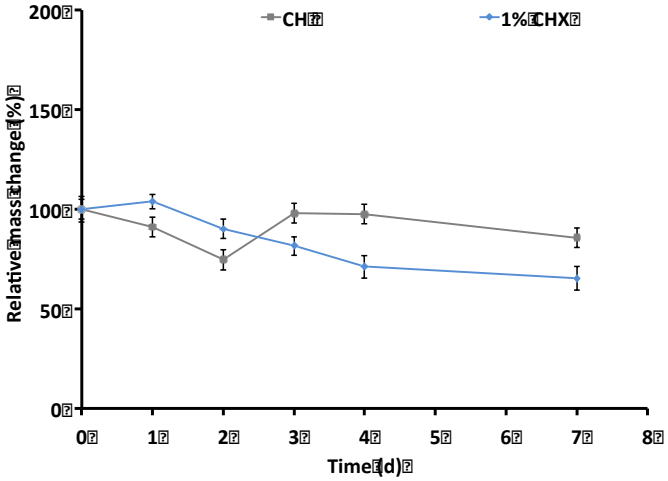
Figure 3 shows the physical properties of 1% CHX.

2.2.1. Injectability

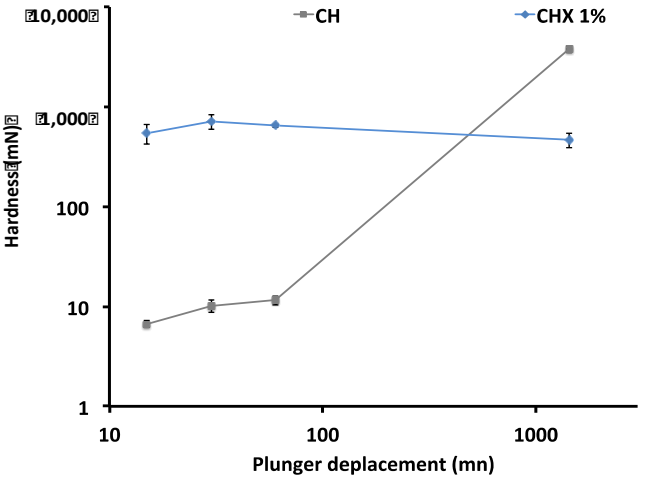
The results of the mechanical test in terms of the injectability of the CH paste with 1% CHX (10×10^3 mg/L) and the CH paste alone are given in Figure 3a. The two curves have similar profiles, indicating that there was no difference between the two formulations with respect to injectability.



(a)



(b)



(c)

Figure 3. Physical properties of the chlorhexidine-free calcium hydroxide paste (CH) and the calcium hydroxide paste containing 1% chlorhexidine (CHX) (10×10^3 mg/L); (**a**) injectability; (**b**) effect of CHX on mass change; (**c**) setting kinetics.

2.2.2. Mass Change

Figure 3b shows the percentage of mass change for the different CH formulations: CHX-free CH paste (CH) and CH + 1% CHX (10×10^3 mg/L) paste. Over a period of seven days, both formulations had mass losses ranging from 15% to 35%. On day 7, the mass loss of the CHX-CH paste was higher (35%) than that of the CHX-free paste (15%).

2.2.3. Puncture Resistance Test

Figure 3c shows the hardening curves. The initial hardness of the CH paste increased with the addition of CHX (292 ± 25.11 mN vs. 5.29 ± 0.23 mN). The hardness of the CHX-free CH paste increased over time. At the end of the test, the hardness of the CHX-free formulation (3767.74 ± 265.86 mN) was higher than that of the CHX-supplemented formulation (468.33 ± 78.42 mN).

2.3. Rheological Properties

The rheological properties of the calcium hydroxide formulations are shown in Figure 4.

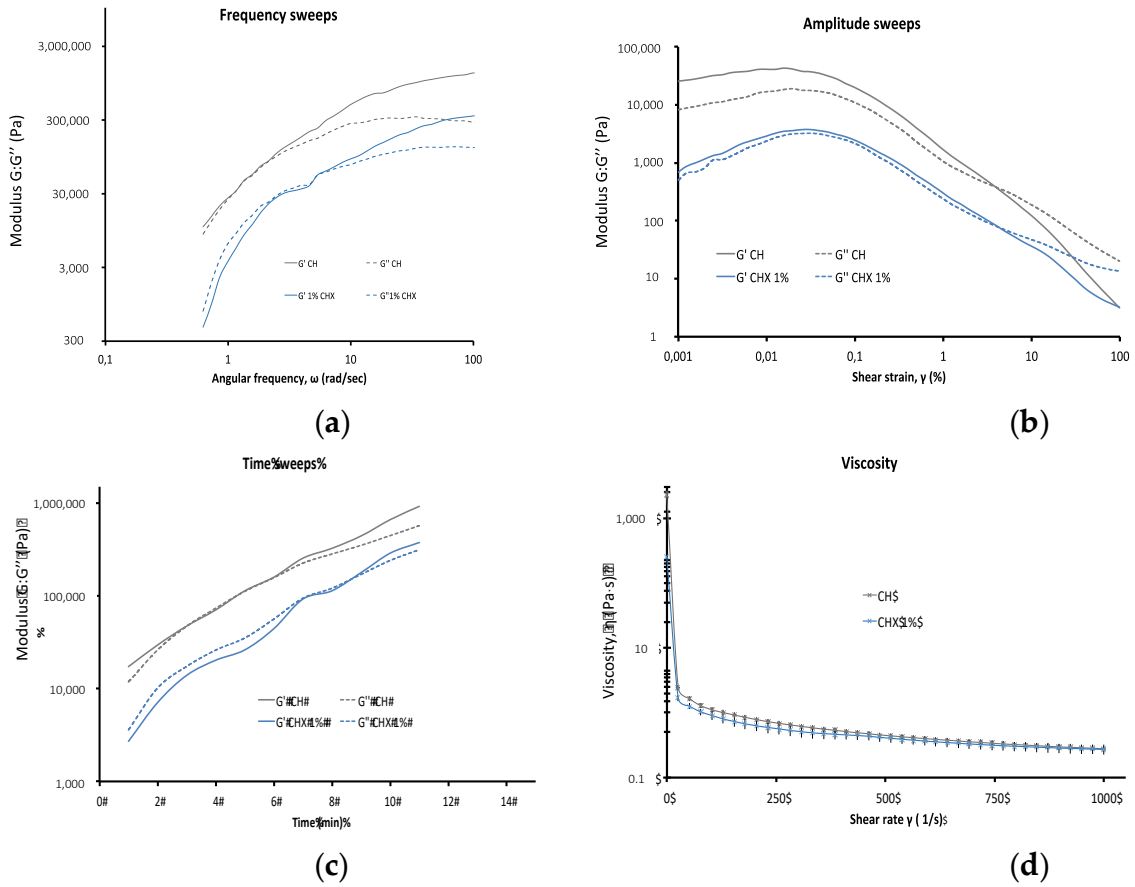


Figure 4. The rheological properties of the calcium hydroxide paste formulations: chlorhexidine-free calcium hydroxide paste (CH) and calcium hydroxide with 1% chlorhexidine (CHX) (10×10^3 mg/L): (**a**) frequency sweeps: determining G′ and G″ at a constant strain of 0.01%; (**b**) amplitude sweeps: determining G′ and G″ at a different shear strain; (**c**) time sweeps: evolution of the storage (G′) and loss (G″) moduli as a function of time at a frequency of 2.5 rad/s at 20 °C; (**d**) viscosity: shear-thinning evaluation by shear-rate dependent variations in viscosity.

The frequency sweep tests (Figure 4a) and the amplitude sweep tests (Figure 4b) were performed to determine the rheometric parameters. One preview test was performed for each sealer to analyze the setting pattern and to determine the rheometer settings (angular frequency of 2.5 rad/s) using a strain amplitude of 0.01% and the data analysis method.

For both formulations, G′ and G″ increased over time. On the time sweep analysis curves (Figure 4c), the storage moduli (G′) were very close to the loss moduli (G″) (G′ = G″ approximately) for both formulations. For the CHX-free formulation, after 6 min, G′ became higher than G″. In the presence of 1% CHX, the two moduli (G′ and G″) distanced themselves from each other: G″ was first higher than G′ then, after 9 min, G″ became lower than G′.

The amplitude sweeps showed that the moduli were lower with 1% CHX than without CHX. For both formulations, the flow point was 0.06%. The G points were 3.93% for the CHX-free formulation and 4.95% for the 1% CHX formulation. Figure 4d shows the formulation viscosity during the first 15 min. Both formulations displayed the same behavior but the CHX-free formulation was mechanically more consistent than the CHX formulation. Indeed, the initial viscosity was 2320 Pa·s for the CH paste alone and 253 Pa·s with the CH + CHX paste, following which the values became similar for both formulations.

3. Discussion

The present study compared the in vitro antimicrobial activity of a CH paste mixed with different metallic salts (Ag_2SO_4, $CuSO_4$, $ZnCl_2$) or CHT/CDP metallic nanoparticles to CH alone as a negative control and the CH + CHX paste as a positive control. The aim was to explore the potential value of metallic salts and CHT and CDP metallic nanoparticles as antimicrobial adjuvants for CH paste for eradicating *E. faecalis* and *C. albicans*, which are associated with root canal infections and are resistant to CH [3,10,11]. According to our results, only CHX was an effective antimicrobial adjuvant for CH paste, reducing the number of *E. faecalis* colonies after 24-h incubation.

The dosages of CHX incorporated into the CH paste were selected according to the most commonly used concentrations in similar studies [13–15,18–20,22,25] for comparison purposes. For the metallic salts, in particular the PMNPs, which are still very little studied as intracanal medications, the antimicrobial susceptibilities of *E. faecalis* and *C. albicans* were first verified using a standard MIC/MBC determination method (CLSI M07-A8), and the dosages to be tested were selected based on the MICs (0.5×, 1×, and 2×), as previously described [50–52]. At this first screening stage, copper and zinc (whose MIC values reached or exceeded 3200 mg/L for both *E. faecalis* and *C. albicans*) were excluded. Conflicting results have been reported in the literature regarding the susceptibility of *C. albicans* and *E. faecalis* to zinc and copper. Aghatabay et al. and Martínez et al. reported MIC values for *C. albicans* reaching 12.5 mg/L for zinc and 129.7 mg/L for copper, respectively [53,54]. More recently, Meto et al. reported a similar *C. albicans* MIC for copper mixed with CH (125 mg/L) [55]. Nozari et al. reported that they did not observe any antimicrobial effect by zinc oxide on *E. faecalis* [56]. Conflicting results have also been reported with the same metals for other oral bacteria, including *Streptococcus mutans* [57]. It has been suggested that some

metals may be inactivated by complex bacterial culture media [58] or that the discrepancies may be due to the different strains of the bacteria used in each study [54,55]. The MICs observed for silver salts and nanoparticles in the present study are generally consistent with those reported in previous studies [59–61].

As the results of the preliminary antimicrobial susceptibility test clearly indicated that the microorganisms studied are not susceptible to copper and zinc, only chlorhexidine and silver were selected to investigate their potential for enhancing the antimicrobial activity of the CH paste. A time-kill kinetics assay was used to monitor bacterial growth and death over a wide range of antimicrobial concentrations over time [62]. We used this technique rather than agar diffusion, which is the most commonly used technique to assess the antimicrobial activity of intracanal medications [63], given that the agar diffusion test has repeatedly been shown to be unreliable and unreproducible due to a number of limitations [64]. These limitations include reactions between agar ingredients and the antimicrobial agent, the lack of differentiation between bactericidal and bacteriostatic activity, variations related to the thickness of the agar gel, and the choice of cut-off size for the inhibition zones [64–66].

Three main conclusions can be drawn from our results with respect to the potential interest of antimicrobial-supplemented CH paste. First, our results suggested that the addition of silver in the form of a sulfate salt (Ag_2SO_4), CHT/Ag, or CDP/Ag does not improve the antimicrobial activity of CH against *E faecalis.* A recent study has shown that the antibacterial efficacy of a silver nanoparticle (AgNP) + CH combination is superior to CH alone when using single bacteria species or biofilms [67] while another study failed to show this benefit [24]. These discrepancies are generally attributed to differences in methodology or to the characteristics of the nanoparticles used. Pratsinis et al. have shown that the antibacterial activity of AgNPs as well as their toxicity are size-dependent [68]. AgNPs that are less than 10 nm in size have enhanced antimicrobial activity and are more toxic. This has been attributed to a larger available surface area for interactions with microorganisms and a greater capacity to penetrate the bacteria [61,68–72]. Increasing evidence has also shown that AgNP activity may also depend on shape. It has been reported that triangular nanoparticles may be more effective than spherical and rod-like shapes. It has been suggested that a triangular shape gives a greater positive charge to the nanoparticles, which may, in turn, contribute to better antimicrobial activity [61]. In the present study, the fact that the CHT/Ag- and CDP/Ag-containing CH pastes had no antibacterial activity is most likely due to a lack of silver ion release into the medium. Indeed, the ICP-MS analysis showed that no Ag was detected in the bacterial culture medium after 24 h (<0.1 μg/L). Polymer/silver or polymer/CH interactions may explain this observation, but given the lack of studies on CH + PMNP mixtures as intracanal medications, further investigations are needed to elucidate this issue.

Second, our results indicated that the CH + CHX combination is more effective in reducing the bacterial count of *E. faecalis* than CH paste alone and that this effect is dose-dependent, which is consistent with the known properties of CHX as an antibacterial agent [13]. A large number of recent studies have reported similar results [13,15,18–20,30], but the benefit of mixing CH with CHX to improve the antibacterial activity of CH remains controversial. A systematic review and meta-analysis by

Saatchi et al., which included nine studies, failed to show a significant difference between CH + CHX and CH alone in their effects on *E. faecalis* [63]. However, it should be mentioned that the most recent studies (published after 2012) were not included in this systematic review and that the comparisons made in the meta-analysis were very heterogeneous.

Lastly, we observed the same patterns of reduction of microbial counts between 1 h and 24 h of incubation of *C. albicans* in the presence of CH alone or in combination with the different antimicrobials. This means that the CH paste alone or combined with any of the antimicrobials studied has comparable fungicidal activity against *C. albicans*. This result contradicts the resistance of *C. albicans* to CH that is commonly documented in the literature [3,55,73]. Waltimo et al. studied the susceptibility of common oral Candida species to a saturated aqueous CH solution and reported that the sensitivity to CH was variable. Only 6 of 16 strains survived after 3 h but were killed after 6 h of incubation [73]. Similar results were reported by Weckwerth et al., who studied the susceptibility of 30 strains of oral *C. albicans* isolated from clinical specimens [74]. A decline in *Candida* growth was observed at 6, 12, and 24 h, with full inhibition of growth after 48 h of direct contact with an aqueous CH solution [74]. However, it seems evident that the resistance of *C. albicans* to CH in vivo is higher because the microorganisms are able to invade dentinal tubules and remain protected from the action of alkaline endodontic medications because of the buffering effect of dentin [66,75,76].

The key characteristics of an ideal endodontic filling material remain as stated by Grossman in [77]. In particular, from a physical and mechanical point of view, the filling material is expected to (i) be easy to handle, (ii) have an ample working time, (iii) be adaptable to the complex internal anatomy of root canals, and (iv) be dimensionally stable and insoluble in tissue fluid. It should be noted that this last point does not apply in the same way to temporary filling materials such as CH-based medications, which must be completely removed from the canal before the final obturation as the presence of CH paste remnants may negatively affect the quality of the root canal filling and reduce dentin bond strength and sealer adaptation [78]. The flowability of the filling material is clinically important because it improves the penetration of the sealer into the complex root canal, thus contributing to the clinical performance of the material [79–81]. This parameter can be precisely studied using a strain-controlled rheometer that provides information on the rheological properties of root canal sealers as a function of time and temperature [79]. Relatively few studies have investigated the rheological properties of root canal sealers [82,83] and, to our knowledge, none have investigated CH-based temporary medications. Injectability and penetration resistance tests are also standard methods for evaluating the ease of handling of injectable materials and the setting time [62,84]. Monitoring mass changes in water also provides information on water uptake/loss, which contributes to the swelling and/or disintegration of the material [62,84]. This is why we used the above methods to characterize the key physical properties of the CH + 1% CHX mixture. This formulation displayed the best efficacy at the lowest drug concentration. A slight rheofluidifying effect of CH + CHX ($G'' > G'$) at 9 min vs. 6 min for CH alone was observed but, overall, the rheological properties and ease of handling of the CH paste

were not altered by the addition of CHX, as shown by the similar viscosity and injectability curves for the two formulations. Moreover, the addition of 1% CHX seemed to slow down the setting of the CH paste and promote mass loss over time. The CH + CHX mixture had lower penetration resistance at 24 h and a higher mass loss after 7 days. The hydrophilic nature of CHX may explain these differences as it would promote the hydration of the CH paste, which would delay its hardening. In practice, the faster mass loss of the CH + CHX mixture could reflect faster resorption of the material in vivo due to its solubilization by tissue fluids.

The limitations of the present study are evidently related to the in vitro models used, which only made it possible to approximate a few of the parameters that could be involved in vivo. Notably, antimicrobial activity was evaluated with planktonic bacteria. In vivo, endodontic pathogens are organized in the form of polymicrobial biofilms whose susceptibility to antimicrobial agents can be very different. Further studies are required to confirm these results and correlate them with clinical outcomes.

4. Materials and Methods

4.1. Media, Molecules, and Formulations

4.1.1. Cultures and Media

Different types of tests, which are described in detail below, were performed using either a collection strain (*C. albicans* ATCC10231) or a strain isolated from a patient with a periapical lesion (*E. faecalis* C159.6). These strains were obtained from the Laboratory of Bacteriology collection at the College of Pharmacy, University of Lille, France. The two strains were subcultured in Mueller-Hinton broth (MHB composed of MH culture medium and ultra-pure water), seeded on Mueller Hinton agar (MHA composed of Mueller-Hinton culture medium (Oxoid®, Basingstoke, UK) and 1.5% agar (Becton-Dickinson®, Le Pont de Claix, France)) diluted in cysteinated Ringer (RC) solution (Merck®, Darmstadt, Germany).

4.1.2. Preparation of Antimicrobial Agents

The antimicrobials were tested in the form of solutions: chlorhexidine digluconate (Evonik, Hanau, Germany), silver sulfate (Ag_2SO_4) (Sigma-Aldrich®, Saint-Quentin Fallavier, France), copper (II) sulfate anhydrous ($CuSO_4$) (Alfa Aesar®, Kandel, Germany), and zinc chloride anhydrous ($ZnCl_2$) (Alfa Aesar®). Metallic ions (silver (Ag), copper (Cu), and zinc (Zn) were also tested in the form of PMNPs and were formulated with (i) low molecular weight chitosan (CHT) (MW: 140 kg mol^{-1}; DD: 77%) (Sigma-Aldrich®) to produce chitosan/metallic nanoparticles (CHT/MNPs) and were named, respectively, CHT/Ag, CHT/Cu, and CHT/Zn or (ii) with cyclodextrin polymer (Kleptose®, Roquette, Lestrem, France) to produce cyclodextrin polymer/metallic nanoparticles (CDP/MNPs) named, respectively, CDP/Ag, CDP/Cu, and CDP/Zn, as previously described [33,36].

An aqueous CHX solution was prepared by diluting 1024 mg of lyophilized digluconate CHX powder in 100 mL of distilled water. The metallic solutions (Ag^+, Cu^{2+}, Zn^{2+}) were prepared by diluting 640 mg of Ag_2SO_4, $CuSO_4$, or $ZnCl_2$ in 100 mL of ultra-pure water.

The aqueous CHT/Ag, CHT/Cu, CHT/Zn nanoparticle solutions (0.5% chitosan) were prepared in an acid medium (1% *v*/*v* lactic acid). The Ag_2SO_4, $CuSO_4$, and $ZnCl_2$ solutions (6400 mg/L) were prepared in volumetric flasks containing 100 mL of a 1% (*v*/*v*) aqueous lactic acid (VWR®, Fontenay Sous Bois, France) solution in ultra-pure water. The appropriate amount (500 mg) of chitosan was then mixed with the lactic acid solution and was stirred for 24 h. Once the chitosan solution became transparent, 640 mg of Ag_2SO_4, $CuSO_4$, or $ZnCl_2$ was added to the volumetric flask to obtain 100 mL of each CHT/MNP solution. A similar procedure was used for the production of aqueous CDP/Ag, CDP/Cu, and CDP/Zn nanoparticle solutions containing 0.3% cyclodextrin polymer with 6400 mg/L of Ag_2SO_4, $CuSO_4$, or $ZnCl_2$. These solutions were prepared in 100-mL volumetric flasks. The appropriate amount (300 mg) of cyclodextrin polymer was mixed in ultra-pure water and was stirred overnight (50 rpm). Next, 640 mg of Ag_2SO_4, $CuSO_4$, or $ZnCl_2$ was added to the volumetric flasks to produce 100-mL solutions of CDP/MNPs. The CHT/MNP and CDP/MNP solutions were stirred for 24 h at 70 °C in the dark.

4.1.3. Formulation of the Calcium Hydroxide Pastes

CH paste was prepared by mixing calcium hydroxide powder (Hidroxido de calcio; DentaFlux, Madrid, Spain) and distilled water (1:1; *w*/*v*) and spatulating the mixture on a glass plate. Antimicrobial-free CH paste was used as a negative control. The test formulations were produced by replacing the distilled water with the antimicrobial solutions described above (CHX, Ag^+, Cu^{2+}, Zn^{2+}, CHT/Ag, CHT/Cu, CHT/Zn, CDP/Ag CDP/Cu, or CDP/Zn).

4.2. Antimicrobial Properties

4.2.1. Minimal Inhibitory Concentrations and Minimal Bactericidal Concentrations

The MICs and MBCs were determined using Clinical and Laboratory Standards Institute protocols (CLSI M07-A9, CLSI M26-A) [85]. Briefly, the broth microdilution method was used with ten concentrations of the antimicrobials (chlorhexidine digluconate solution, and silver, copper, and zinc solutions or in the form of PMNPs) [86]. The MICs and MBCs of *C. albicans* and *E. faecalis* were determined in triplicate, with antimicrobial concentrations ranging from 1 to 3200 mg/L, depending on the antimicrobial agent. A start inoculum of 10^6 cells/mL was used. The MICs were the lowest concentrations of the antimicrobials with which no visible growth occurred. The CFUs were visible after a 24- to 48-h incubation at 37 °C under aerobic conditions. The MBCs were the lowest concentrations at which no colony formation occurred. The first selection of antimicrobials was made based on the MIC and MBC results. The antimicrobials with the lowest MICs and MBCs were selected for the next step.

4.2.2. Time-Kill Kinetics Assay

A time-kill kinetics assay was performed to determine the time-dependent reduction in *E. faecalis* and *C. albicans* (Colony Forming Units [CFUs]) caused by the antimicrobials, as previously reported [62]. Briefly, bacterial suspensions were exposed to the antimicrobials for different periods of time, and the CFUs of the surviving microbial populations were counted. Each formulation (1 mL) was placed

in a 15-mL Falcon tube (Greiner, Courtaboeuf, France). Fresh MH medium was added (8 mL) followed by 1 mL of *E. faecalis* or *C. albicans* suspension (10^4–10^6 bacteria/mL). The tubes were then incubated for 24 h at 37 °C. At 0, 2, 4, 6 and 24 h, 100-µL samples were removed from the tubes and were diluted 10-fold with RC. The dilutions (100 µL) were plated on MHA plates, which were incubated for 24 h at 37 °C. The numbers of colonies were counted, and the results are expressed as log CFU/mL. All experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as means ± standard deviations.

4.2.3. Drug Release Measurements

The antimicrobials (100 µL) were placed in the bottom of 2-mL Eppendorf® vials using a standard syringe. The vials were horizontally shaken at 37 °C and 80 rpm (GFL 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Germany). At selected time points, the release medium (deionized water) was completely renewed. The amounts of drugs in the bulk fluids that were withdrawn from the vials were determined by HPLC-UV (Waters Alliance 2695 separation module, Waters 2489 UV/vis detector), as previously described [87]. Briefly, 20-µL samples were injected onto a C18 RP column (Gemini 5 µm C18 110 Å, 100 mm Å~4.6 mm; Phenomenex, Le Pecq, France). The flow rate was 1.5 mL/min. The column was kept at room temperature, and the detection wavelength was set at λ = 239 nm. All experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as means ± standard deviations.

4.3. Physical Properties

Depending on the results of the antimicrobial test, the antimicrobial agents displaying the best antibacterial properties were tested mechanically.

4.3.1. Injectability

The injectability of the different CH paste formulations was measured using a texture analyzer in compression mode (speed: 1 mm/s), as previously described [88]. The work required to expel the CH paste was calculated. Briefly, a cylindrical probe (6 mm in diameter) of the texture analyzer was used to drive the piston 10-mm downward (load cell: 50 kg, TA.XT.Plus; Stable Micro Systems, Surrey, UK). Force-distance profiles were recorded, and the work required to expel the liquid formulation from the syringe was calculated. For comparison purposes, the injectability of pure water was also determined. All the experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as means ± standard deviations.

4.3.2. Monitoring Changes in Dynamic Mass

The mass change % at time t was calculated, as previously described [87], using the following equation:

$$mass\ change\ (\%)(t) = 100.\frac{mass\ (t) - mass\ (t=0)}{mass\ (t=0)},$$

where the mass (t = 0) is the initial weight of the CH paste formulation used. The experiments were performed in triplicate, and the results are expressed as means ± standard deviations.

4.3.3. Penetration Resistance Test

The setting profiles of the CH paste samples were determined by measuring their penetration resistance at different times (15 min, 30 min, 60 min, 24 h) using an adaptation of a previously published protocol [84]. Briefly, a cylindrical hole was cut in the center of an agar gel and was filled with 200 µL of CH paste. A texture analyzer (TA.XT.Plus, load125cell: 1 kg) in compression mode and a spherical probe (6 mm) were used for the puncture test. Once in contact with the CH paste sample, the probe was lowered downward at a constant speed (1 mm/s) and was stopped when its penetration depth was equal to the target distance (5 mm). The force-displacement profile was recorded, and the area under the force-time plot was calculated. The tests were performed in triplicate at room temperature.

4.4. Rheological Properties

The rheological properties were evaluated using a strain-controlled modular compact rheometer (MCR 301 Physica: Anton Paar, Les Ulis, France) with a parallel plate geometry (diameter of 25 mm) and a Peltier plate temperature device (HPTD200, Anton Paar) to control the temperature [89]. A 1-mm gap was used for all the measurements. The CH paste samples were placed on the lower plate of the rheometer immediately after mixing. The upper plate was placed in the measuring position, and excess sample was trimmed using a spatula. The storage (G′) and loss (G″) moduli of the paste samples were evaluated as a function of time at 20 °C in the oscillatory mode at a frequency of 2.5 rad/s, a 0.01% strain, and a constant speed of 300 s^{-1}. The measurements began 90 s after the initial mixing in order to standardize the measurements. The tests were performed in triplicate for each group.

4.5. Statistical Analysis

The values were tabulated using Microsoft Office Excel Mac OS 2011 (14.4.7 [141117] version). The significance level of the statistical analysis was set at $p < 0.05$. The time-kill assay test results were analyzed by ANOVA followed by a Tukey Kramer test. All the experiments were repeated independently at least three times.

5. Conclusions

Within the limits of the present study, we can conclude that a mixture of CH and CHX as an intracanal medication could help eradicate *E. faecalis* associated with secondary and persistent root canal infections without altering the desired key physical properties of the CH paste. Our results do not support the use of CHT or CDP metallic nanoparticles as antimicrobial adjuvants for CH-based medication. Further studies are needed to optimize the antimicrobial activity of CHT/CDP metallic nanoparticles before they can be used as an adjuvant for endodontic therapy.

Author Contributions: Conceptualization, K.S., K.A., E.D., N.B., and C.N.; methodology, K.S. and K.A.; validation, C.N., N.B., E.D., and F.S.; formal analysis, K.S., M.M., and H.C.-F.; investigation, K.S. and K.A.; resources, F.S., B.M, N.B., and C.N.; data curation, K.S. and K.A.; writing—original draft preparation, K.S. and K.A.; writing—review and editing, N.B., C.N., and E.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research has received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors would like to warmly thank Isabelle Houcke and Séverine Mahieux, Institute for Translational Research in Inflammation, Jéremy Verin, Controlled Drug Delivery Systems and Biomaterials and Nicolas Beauval, Laboratoire de Toxicologie et Génopathies for their amazing work and their precious help.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J. Endod.* **2008**, *34*, 1291–1301.
2. Narayanan, L.L.; Vaishnavi, C. Endodontic microbiology. *J. Conserv. Dent.* **2010**, *13*, 233–239.
3. Nair, P.N.R. On the causes of persistent apical periodontitis: A review. *Int. Endod. J.* **2006**, *39*, 249–281.
4. Sundqvist, G. Ecology of the root canal flora. *J. Endod.* **1992**, *18*, 427–430.
5. Abouelenien, S.S.; Ibrahim, S.M.; Shaker, O.G.; Ahmed, G.M. Evaluation of postoperative pain in infected root canals after using double antibiotic paste versus calcium hydroxide as intra-canal medication: A randomized controlled trial. *F1000Research* **2018**, *7*, 1768.
6. Arruda, M.E.F.; Neves, M.A.S.; Diogenes, A.; Mdala, I.; Guilherme, B.P.S.; Siqueira, J.F.; Rôças, I.N. Infection control in teeth with apical periodontitis using a triple antibiotic solution or calcium hydroxide with chlorhexidine: A Randomized Clinical Trial. *J. Endod.* **2018**, *44*, 1474–1479.
7. Ghatole, K.; Gowdra, R.H.G.; Azher, S.; Sabharwal, S.; Singh, V.T.; Sundararajan, B.V. Enhancing the antibacterial activity of the gold standard intracanal medicament with incorporation of silver zeolite: An in vitro study. *J. Int. Soc. Prev. Community Dent.* **2016**, *6*, 75–79.
8. Mohammadi, Z.; Dummer, P.M.H. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int. Endod. J.* **2011**, *44*, 697–730.
9. Sukawat, C.; Srisuwan, T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* **2002**, *28*, 102–104.
10. Siqueira, J.F.; Lopes, H.P. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int. Endod. J.* **1999**, *32*, 361–369.
11. Kumar, G.; Tewari, S.; Tagg, J.; Chikindas, M.L.; Popov, I.V.; Tiwari, S.K. Can Probiotics Emerge as Effective Therapeutic Agents in Apical Periodontitis? A Review. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 299–314.
12. Kim, D.; Kim, E. Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: A literature review–Part I. In vitro studies. *Restor. Dent. Endod.* **2014**, *39*, 241–252.
13. Basrani, B.; Tjäderhane, L.; Santos, J.M.; Pascon, E.; Grad, H.; Lawrence, H.P.; Friedman, S. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2003**, *96*, 618–624.
14. Punathil, S.; Moyin, S.; Bhat, S.S.; Hedge, S.; Pai, A.; James, J. Comparison of Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide Combined with Chlorhexidine and Povidone-Iodine Against *Enterococcus faecalis* in Dentinal Tubules of Human Incisors: An In Vitro Comparative Study. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2020**, *12* (Suppl. S1), S448–S452.
15. Evans, M.D.; Baumgartner, J.C.; Khemaleelakul, S.; Xia, T. Efficacy of calcium hydroxide: Chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J. Endod.* **2003**, *29*, 338–339.
16. Pereira, T.C.; Vasconcelos, L.R.D.S.M.; Graeff, M.S.Z.; Ribeiro, M.C.M.; Duarte, M.A.H.; de Andrade, F.B. Intratubular decontamination ability and physicochemical properties of calcium hydroxide pastes. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 1253–1262.
17. Gomes, B.P.F.D.A.; Vianna, M.E.; Sena, N.T.; Zaia, A.A.; Ferraz, C.C.R.; de Souza Filho, F.J. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, *102*, 544–550.
18. Ercan, E.; Dalli, M.; Dülgergil, C.T. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2006**, 102, e27–e31.
19. Delgado, R.J.R.; Gasparoto, T.H.; Sipert, C.R.; Pinheiro, C.R.; Moraes, I.G.; Garcia, R.B.; Bramante, C.M.; Campanelli, A.P.; Bernardineli, N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* **2010**, *36*, 1389–1393.
20. Prabhakar, A.R.; Hadakar, S.G.; Raju, O.S. Comparative evaluation of pH and antibacterial effect of various calcium hydroxide combinations on *E. faecalis* and its effect on root strength: An in vitro study. *Contemp. Clin. Dent.* **2012**, *3*, 42–47.
21. Almyroudi, A.; Mackenzie, D.; McHugh, S.; Saunders, W.P. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: An in vitro study. *J. Endod.* **2002**, *28*, 163–167.

22. Schäfer, E.; Bössmann, K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J. Endod.* **2005**, *31*, 53–56.
23. Lynne, R.E.; Liewehr, F.R.; West, L.A.; Patton, W.R.; Buxton, T.B.; McPherson, J.C. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *J. Endod.* **2003**, *29*, 187–190.
24. Afkhami, F.; Pourhashemi, S.J.; Sadegh, M.; Salehi, Y.; Fard, M.J.K. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J. Dent.* **2015**, *43*, 1573–1579.
25. Charannya, S.; Duraivel, D.; Padminee, K.; Poorni, S.; Nishanthine, C.; Srinivasan, M.R. Comparative Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles and 2% Chlorhexidine Gluconate When Used Alone and in Combination Assessed Using Agar Diffusion Method: An In vitro Study. *Contemp. Clin. Dent.* **2018**, *9* (Suppl. S2), S204–S209.
26. Ahrari, F.; Eslami, N.; Rajabi, O.; Ghazvini, K.; Barati, S. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis* to colloidal solutions of different nanoparticles applied as mouthwashes. *Dent. Res. J.* **2015**, *12*, 44–49.
27. Yousefshahi, H.; Aminsobhani, M.; Shokri, M.; Shahbazi, R. Anti-bacterial properties of calcium hydroxide in combination with silver, copper, zinc oxide or magnesium oxide. *Eur. J. Transl. Myol.* **2018**, *28*, 7545.
28. Lemire, J.A.; Harrison, J.J.; Turner, R.J. Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2013**, *11*, 371–384.
29. Campoccia, D.; Ravaioli, S.; Vivani, R.; Donnadio, A.; Vischini, E.; Russo, A.; et al. Antibacterial Properties of a Novel Zirconium Phosphate-Glycinediphosphonate Loaded with Either Zinc or Silver. *Materials* **2019**, *12*, 3184.
30. Samiei, M.; Torab, A.; Hosseini, O.; Abbasi, T.; Abdollahi A.A.; Divband, B. Antibacterial Effect of Two Nano Zinc Oxide Gel Preparations Compared to Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture. *Iran. Endod. J.* **2018**, *13*, 305–311.
31. Nunes, B.S.; Rosendo, R.A.; Filho, A.A.O.; Fook, M.V.L.; de Sousa, W.J.B.; Barbosa, R.C.; Pina, H.N.; da Silva Neto, J.E.; Amoah, S.K.S.; Fontana, S.E.; et al. Chitosan-Based Biomaterial, Calcium Hydroxide and Chlorhexidine for Potential Use as Intracanal Medication. *Materials* **2021**, *14*, 488.
32. Revathi, T.; Thambidurai, S. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of copper oxide incorporated chitosan-neem seed biocomposites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *139*, 867–878.
33. Mogrovejo-Valdivia, A.; Rahmouni, O.; Tabary, N.; Maton, M.; Neut, C.; Martel, B.; Blanchemain, N. In vitro evaluation of drug release and antibacterial activity of a silver-loaded wound dressing coated with a multilayer system. *Int. J. Pharm.* **2019**, *556*, 301–310.
34. Palza, H. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2099–2116.
35. Ma, Q.; Song, J.; Zhang, S.; Wang, M.; Guo, Y.; Dong, C. Colorimetric detection of riboflavin by silver nanoparticles capped with β-cyclodextrin-grafted citrate. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2016**, *148*, 66–72.
36. Carapeto, A.P.; Ferraria, A.M.; do Rego, A.M.B. Unraveling the reaction mechanism of silver ions reduction by chitosan from so far neglected spectroscopic features. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *174*, 601–609.
37. Bano, I.; Arshad, M.; Yasin, T.; Ghauri, M.A.; Younus, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 380–383.
38. Blanchemain, N.; Karrout, Y.; Tabary, N.; Bria, M.; Neut, C.; Hildebrand, H.F.; Siepmann, J.; Martel, B. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *90*, 1695–1703.
39. Flores, C.; Lopez, M.; Tabary, N.; Neut, C.; Chai, F.; Betbeder, D.; Herkt, C.; Cazaux, F.; Gaucher, V.; Martel, B.; et al. Preparation and characterization of novel chitosan and β-cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *173*, 535–546.
40. Ouerghemmi, S.; Degoutin, S.; Tabary, N.; Cazaux, F.; Maton, M.; Gaucher, V.; Janus, L.; Neut, C.; Chai, F.; Martel, B.; et al. Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *Int. J. Pharm.* **2016**, *513*, 483–495.
41. Garcia-Fernandez, M.J.; Maton, M.; Benzine, Y.; Tabary, N.; Baptiste, E.J.; Gargouri, M.; Bria, M.; Blanchemain, N.; Karoutt, Y. Ciprofloxacin loaded vascular prostheses functionalized with poly-methylbeta-cyclodextrin: The importance of in vitro release conditions. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, *53*, 101166.
42. Vermet, G.; Degoutin, S.; Chai, F.; Maton, M.; Flores, C.; Neut, C.; Danjou, P.E.; Blanchemain, N.; Martel, B. Cyclodextrin modified PLLA parietal reinforcement implant with prolonged antibacterial activity. *Acta Biomater.* **2017**, *53*, 222–232.
43. Vermet, G.; Degoutin, S.; Chai, F.; Maton, M.; Bria, M.; Danel, C.; Hildebrand, H.F.; Blanchemain, N.; Martel, B. Visceral mesh modified with cyclodextrin for the local sustained delivery of ropivacaine. *Int. J. Pharm.* **2014**, *476*, 149–159.
44. Jansook, P.; Ogawa, N.; Loftsson, T. Cyclodextrins: Structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2018**, *535*, 272–284.
45. Tomson, R.M.E.; Polycarpou, N.; Tomson, P.L. Contemporary obturation of the root canal system. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 315–322.

46. Komabayashi, T.; Colmenar, D.; Cvach, N.; Bhat, A.; Primus, C.; Imai, Y. Comprehensive review of current endodontic sealers. *Dent. Mater. J.* **2020**, *39*, 703–720.
47. Kreth, J.; Kim, D.; Nguyen, M.; Hsiao, G.; Mito, R.; Kang, M.K.; Chugal, N.; Chi, W. The Antimicrobial Effect of Silver Ion Impregnation into Endodontic Sealer against *Streptococcus mutans*. *Open Dent. J.* **2008**, *2*, 18–23.
48. Noronha, V.T.; Paula, A.J.; Durán, G.; Galembeck, A.; Cogo-Müller, K.; Franz-Montan, M.; Duran, N. Silver nanoparticles in dentistry. *Dent. Mater.* **2017**, *33*, 1110–1126.
49. Fujioka-Kobayashi, M.; Schaller, B.; Pikos, M.A.; Sculean, A.; Miron, R.J. Cytotoxicity and Gene Expression Changes of a Novel Homeopathic Antiseptic Oral Rinse in Comparison to Chlorhexidine in Gingival Fibroblasts. *Materials* **2020**, *13*, E3190.
50. Vestergaard, M.; Skive, B.; Domraceva, I.; Ingmer, H.; Franzyk, H. Peptide/β-Peptoid Hybrids with Activity against Vancomycin-Resistant *Enterococci*: Influence of Hydrophobicity and Structural Features on Antibacterial and Hemolytic Properties. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5617.
51. Zhang, S.; Tang, H.; Wang, Y.; Nie, B.; Yang, H.; Yuan, W.; Qu, X.; Yue, B. Antibacterial and antibiofilm effects of flufenamic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105067.
52. Tavares, T.D.; Antunes, J.C.; Padrão, J.; Ribeiro, A.I.; Zille, A.; Amorim, M.T.P.; Farreira, F.; Felgueiras, H.P. Activity of specialized biomolecules against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 314.
53. Aghatabay, N.M.; Neshat, A.; Karabiyik, T.; Somer, M.; Haciu, D.; Dülger, B. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of Fe(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II) complexes with 2,6-bis(benzimidazol-2-yl) pyridine ligand. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, *42*, 205–213.
54. Martínez, A.; Apip, C.; Meléndrez, M.F.; Domínguez, M.; Sánchez-Sanhueza, G.; Marzialetti, T.; Catalán, A. Dual antifungal activity against *Candida albicans* of copper metallic nanostructures and hierarchical copper oxide marigold-like nanostructures grown in situ in the culture medium. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130*, 1883–1892.
55. Meto, A.; Colombari, B.; Sala, A.; Pericolini, E.; Meto, A.; Peppoloni, S.; Blasi, E. Antimicrobial and antibiofilm efficacy of a copper/calcium hydroxide-based endodontic paste against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Dent. Mater. J.* **2019**, *38*, 591–603.
56. Nozari, A.; Karimkhani, A.; Motamedifar, M.; Arasteh, P. The antimicrobial effects of zinc oxide-calcium hydroxide mixture fillers: Determining the ideal mixture ratio. *Iran. J. Microbiol.* **2019**, *11*, 239–245.
57. Almoudi, M.M.; Hussein, A.S.; Abu Hassan, M.I.; Zain, N.M. A systematic review on antibacterial activity of zinc against *Streptococcus mutans*. *Saudi Dent. J.* **2018**, *30*, 283–291.
58. Bradshaw, D.J.; Marsh, P.D.; Watson, G.K.; Cummins, D. The effects of triclosan and zinc citrate, alone and in combination, on a community of oral bacteria grown in vitro. *J. Dent. Res.* **1993**, *72*, 25–30.
59. Cui, J.; Sun, Q.; Duan, M.; Liu, D.; Fan, W. Establishment and characterization of silver-resistant *Enterococcus faecalis*. *Folia Microbiol.* **2020**, *65*, 721–733.
60. Kulatunga, D.; Dananjaya, S.; Godahewa, G.I.; Lee, J.; De Zoysa, M. Chitosan silver nanocomposite (CAgNC) as an antifungal agent against *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2017**, *55*, 213–222.
61. Freire, P.L.L.; Albuquerque, A.J.R.; Farias, I.A.P.; da Silva, T.G.; Aguiar, J.S.; Galembeck, A.; Flores, M.A.P.; Sampaio, F.C.; Stamford, T.C.M.; Rosenblatt, A. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of colloidal chitosan–silver nanoparticles–fluoride nanocomposites. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 896–903.
62. Sy, K.; Flamme, J.; Maquet, H.; Chai, F.; Neut, C.; Siepmann, F.; Agossa, K. Antimicrobial effect and physical properties of an injectable 'active oxygen' gel for the treatment of periodontitis. *Am. J. Dent.* **2020**, *33*, 305–309.
63. Saatchi, M.; Shokraneh, A.; Navaei, H.; Maracy, M.R.; Shojaei, H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: A systematic review and meta-analysis. *J. Appl. Oral Sci.* **2014**, *22*, 356–365.
64. Bonev, B.; Hooper, J.; Parisot, J. Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 1295–1301.
65. Ingle, J.I.; Bakland, L.K.; Baumgartner, J.C. *Endodontics*, 6th ed.; BC Decker: Bloomington, IN, USA, 2008; p. 996.
66. Siqueira, J.F.; de Uzeda, M. Intracanal medicaments: Evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J. Endod.* **1997**, *23*, 167–169.
67. Tülü, G.; Kaya, B.Ü.; Çetin, E.S.; Köle, M. Antibacterial effect of silver nanoparticles mixed with calcium hydroxide or chlorhexidine on multispecies biofilms. *Odontology* **2021**, *109*, 802–811.
68. Pratsinis, A.; Hervella, P.; Leroux, J.-C.; Pratsinis, S.E.; Sotiriou, G.A. Toxicity of silver nanoparticles in macrophages. *Small* **2013**, *9*, 2576–2584.
69. Agnihotri, S.; Mukherji, S.; Mukherji, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 3974–3983.
70. Rai, M.; Yadav, A.; Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 76–83.

71. Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramírez, J.T.; Yacaman, M.J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2346–2353.
72. Chatterjee, T.; Chatterjee, B.K.; Majumdar, D.; Chakrabarti, P. Antibacterial effect of silver nanoparticles and the modeling of bacterial growth kinetics using a modified Gompertz model. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1850*, 299–306.
73. Waltimo, T.M.; Sirén, E.K.; Orstavik, D.; Haapasalo, M.P. Susceptibility of oral *Candida species* to calcium hydroxide in vitro. *Int. Endod. J.* **1999**, *32*, 94–98.
74. Weckwerth, P.H.; Carnietto, C.; Weckwerth, A.C.V.B.; Duarte, M.A.H.; Kuga, M.C.; Vivan, R.R. In vitro susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. *Braz. Dent. J.* **2012**, *23*, 192–198.
75. Sen, B.H.; Safavi, K.E.; Spångberg, L.S. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **1997**, *84*, 68–73.
76. Haapasalo, H.K.; Sirén, E.K.; Waltimo, T.M.; Ørstavik, D.; Haapasalo, M.P. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: An in vitro study. *Int. Endod. J.* **2000**, *33*, 126–131.
77. Gutmann, J.L. Grossman's Endodontic Practice–13th Edition. *J. Conserv. Dent.* **2016**, *19*, 494.
78. Calt, S.; Serper, A. Dentinal tubule penetration of root canal sealers after root canal dressing with calcium hydroxide. *J. Endod.* **1999**, *25*, 431–433.
79. Chang, S.W.; Lee Y-K.; Zhu, Q.; Shon, W.J.; Lee, W.C.; Kum, K.Y.; Baek, S.H.; Lee, I.B.; Lim, B.-S.; Bae, K.S. Comparison of the rheological properties of four root canal sealers. *Int. J. Oral Sci.* **2015**, *7*, 56–61.
80. Marin-Bauza, G.A.; Rached-Junior, F.J.A.; Souza-Gabriel, A.E.; Sousa-Neto, M.D.; Miranda, C.E.S.; Silva-Sousa, Y.T.C. Physicochemical properties of methacrylate resin-based root canal sealers. *J. Endod.* **2010**, *36*, 1531–1536.
81. Siqueira, J.F.; Favieri, A.; Gahyva, S.M.; Moraes, S.R.; Lima, K.C.; Lopes, H.P. Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J. Endod.* **2000**, *26*, 274–277.
82. De Freitas, J.V.; Ebert, J.; Mazzi-Chaves, J.F.; de Sousa-Neto, M.D.; Lohbauer, U.; Baratto-Filho, F. Do Contaminating Substances Influence the Rheological Properties of Root Canal Sealers? *J. Endod.* **2020**, *46*, 258–263.
83. Kaplan, A.E.; Ormaechea, M.F.; Picca, M.; Canzobre, M.C.; Ubios, A.M. Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int. Endod. J.* **2003**, *36*, 527–532.
84. Agossa, K.; Lizambard, M.; Rongthong, T.; Delcourt-Debruyne, E.; Siepmann, J.; Siepmann, F. Physical key properties of antibiotic-free, PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for local periodontitis treatment. *Int. J. Pharm.* **2017**, *521*, 282–293.
85. Li, M.; Yang, Y.; Lin, C.; Zhang, Q.; Gong, L.; Wang, Y.; Zhang, X. Antibacterial Properties of Small-Size Peptide Derived from Penetratin against Oral Streptococci. *Materials* **2021**, *14*, 2730.
86. Abedini, A.; Roumy, V.; Mahieux, S.; Gohari, A.; Farimani, M.M.; Rivière, C.; Samaillie, J.; Sahpaz, S.; Bailleul, F.; Neut, C.; et al. Antimicrobial activity of selected Iranian medicinal plants against a broad spectrum of pathogenic and drug multiresistant micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* **2014**, *59*, 412–421.
87. Lizambard, M.; Menu, T.; Fossart, M.; Bassand, C.; Agossa, K.; Huck, O.; Neut, C.; Siepmann, F. In-situ forming implants for the treatment of periodontal diseases: Simultaneous controlled release of an antiseptic and an anti-inflammatory drug. *Int. J. Pharm.* **2019**, *572*, 118833.
88. Winkler, B.; Margerison, J.K. Mechanical properties of the bovine clawhorn during lactation. *J. Dairy Sci.* **2012**, *95*, 1714–1728.
89. Palomino-Durand, C.; Lopez, M.; Cazaux, F.; Martel, B.; Blanchemain, N.; Chai, F. Influence of the Soluble–Insoluble Ratios of Cyclodextrins Polymers on the Viscoelastic Properties of Injectable Chitosan–Based Hydrogels for Biomedical Application. *Polymers* **2019**, *11*, 214.

Annexe 3. Liste des communications

Communications orales nationales et internationales :

SY K., CHEVALIER C., GROSGOGEAT B., DEVEAUX E., AGOSSA K., GRITSCH K. Effets physico-chimiques et biologiques des médications endodontiques sur le parodonte : étude *ex vivo* et *in vitro*. Forum des jeunes chercheurs en odontologie (FJCO), octobre 2022, Toulouse (France).

SY K., CHEVALIER C., GROSGOGEAT B., DEVEAUX E., AGOSSA K., GRITSCH K. Diffusion trans-radiculaire des composés bioactifs de médications intracanalaires : implications pour le traitement des lésions endo-parodontales. Collège National des Enseignants en Parodontologie (CNEP), octobre 2022, Clermont-Ferrand (France).

SY K., CHEVALIER C., GROSGOGEAT B., DEVEAUX E., AGOSSA K., GRITSCH K. Endo-Periodontal Treatment: Trans-radicular Release of Active Components by Intracanal Medications. Annual Meeting of the Pan European Region of the International Association of Dental Research (PER-IADR), septembre 2021, Marseille (France).

SY K. Les lésions endo-parodontales. Séminaire Facebook live du (CNEP), janvier 2022, Lyon (France).

Communications affichées nationales et internationales avec communication orale :

SY K., DEVEAUX E., AGOSSA K. Effect of endodontic treatment on periodontal outcomes in endo periodontal lesions: a systematic review. European Federation of Periodontology, (Europerio 10), juin 2022, Copenhagen (Danemark).

SY K., AGOSSA K., DEVEAUX E., NEUT C., BLANCHEMAIN N. Intérêt de la supplémentation en argent et en chlorhexidine sur l'activité antibactérienne de l'hydroxyde de calcium. Collège National des Enseignants en Odontologie Conservatrice (CNEOC), juin 2019, Nancy. *Lauréate de la séance*

Communications affichées nationales et internationales :

SY K., DEVEAUX E., AGOSSA K. Does endodontic treatment improve healing of endo periodontal lesions: systematic review. Annual Meeting of the Continental European Division of the International Association of Dental Research, septembre 2021, Bruxelles (Belgique).

SY K., AGOSSA K., BOUSSOUNI S., PISKORSKI G., DEVEAUX E., SIEPMAN F., NEUT C., BLANCHEMAIN N. Chlorhexidine - supplemented calcium hydroxide in endodontics: How formulation affects the performance. Annual Meeting of the Continental European Division of the International Association of Dental Research (CED-IADR), septembre 2019, Madrid (Espagne).

SY K., AGOSSA K., DEVEAUX E., NEUT C., BLANCHEMAIN N. Intracanal medication in endodontics: Contribution of antibacterial molecules to the antibacterial potential of calcium hydroxide. Journée André Verbert (JAV), septembre 2019, Lille.

Annexe 4. Listes de laboratoires impliqués :

INSERM U1008 "Advanced Drug Delivery Systems", Groupe de Recherche sur les Biomatériaux
Faculté de Médecine, pôle Recherche, Université de Lille
1 place de Verdun 59045 Lille Cedex

INSERM U1286 Infinite—Institute for Translational Research in Inflammation
Faculté de Pharmacie, Université de Lille
3 rue du Professeur Laguesse, BP83, F-59006 Lille Cedex

Laboratoire des Multimatériaux et Interfaces, UMR CNRS 5615
Faculté d'Odontologie, Université Lyon 1,
11 rue Guillaume Paradin 69372 Lyon Cedex 08,

Liste des figures

Figure 1. Photographie histologique d'un tissu pulpaire sain ……2

Figure 2. Anatomie et structure de la dent et du parodonte ……3

Figure 3. Diagramme schématique du processus de développement de la dent……4

Figure 4. Exemple de canal principal et des canaux secondaires à l'apex d'une racine ……5

Figure 5. Image de tubules dentinaires ……6

Figure 6. Facteurs étiologiques et contributifs des lésions endo-parodontales ……8

Figure 7. Prévalence d'espèces bactériennes obtenues par hybridation ADN-ADN en damier à partir d'échantillons issus de lésions endo-parodontales ……9

Figure 8. Régulation par les cytokines de la dégradation de la matrice et de la résorption osseuse dans les environnements parodontaux et péri-apicaux ……12

Figure 9. Exemple de fracture radiculaire verticale d'origine iatrogène ……14

Figure 10. Classification des lésions endo-parodontale (Chicago 2018) ……18

Figure 11. Sondage des lésions endo-parodontales (Harrington 1975) ……19

Figure 12. Prérequis biologiques à la régénération parodontale ……23

Figure 13. Exemple de rhéomètre ……43

Figure 14. Étude du « profil de durcissement » : protocole utilisé pour le test de pénétration ……44

Figure 15. Protocole de fabrication du modèle de diffusion avant la préparation chimio-mécanique ……46

Figure 16. Protocole de fabrication du modèle de diffusion sur une incisive ……47

Figure 17. Injectabilité de la pâte d'hydroxyde de calcium pour différents ratios liquide/poudre ……56

Figure 18. Variations de masse relative et durcissement pour différents ratios liquide/poudre ……57

Figure 19. Cinétique de réduction bactérienne de *C. albicans* ……59

Figure 20. Cinétique de réduction bactérienne d'*Enterococcus faecalis*……60

Figure 21. Cinétique de réduction bactérienne de *P. gingivalis* ……61

Figure 22. Évolution de la quantité de chlorhexidine libérée au cours du temps pendant 48 heures ……62

Figure 23. Variation de l'injectabilité de la pâte d'hydroxyde de calcium seul ou en présence de chlorhexidine à différentes concentrations ……64

Figure 24. Variation de la cinétique de prise de la pâte d'hydroxyde de calcium seul ou en présence de chlorhexidine à différentes concentrations ……65

Figure 25. Variation de masse de la pâte d'hydroxyde de calcium seul ou en présence de chlorhexidine à différentes concentrations ……65

Figure 26. Propriétés rhéologiques de la pâte d'hydroxyde de calcium seul et de la pâte d'hydroxyde de calcium couplé à la chlorhexidine : modules dynamiques en fonction de la fréquence et balayages d'amplitude ……66

Figure 27. Propriétés rhéologiques de la pâte d'hydroxyde de calcium seul et de la pâte d'hydroxyde de calcium couplé à la chlorhexidine : balayages temporels et viscosité ……67

Figure 28. Évolution pendant 28 jours du pH du milieu de diffusion de dents contenant ou non une médication intracanalaire à base d'hydroxyde de calcium ……68

Figure 29. Évolution de la concentration d'ions calcium dans le milieu de diffusion de dents contenant ou non une médication intracanalaire à base d'hydroxyde de calcium……69

Figure 30. Évolution de la concentration de chlorhexidine dans le milieu de diffusion de dents contenant ou non une médication intracanalaire à base d'hydroxyde de calcium ……70

Figure 31. Prolifération des fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……71

Figure 32. Prolifération des cémentoblastes après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……72

Figure 33. Prolifération des ostéoblastes après 1, 3 et 7 jours de contact avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……73

Figure 34. Activité de l'ALP intracellulaire de cémentoblastes stimulés avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……74

Figure 35. Activité de l'ALP intracellulaire des ostéoblastes stimulés avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……75

Figure 36. Quantification du dépôt de calcium dans les cellules par coloration au rouge d'alizarine sur les cémentoblastes après contact avec les extraits ……75

Figure 37. Quantification du dépôt de calcium dans les cellules par coloration au rouge d'alizarine sur les ostéoblastes stimulés avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……76

Figure 38. Expression du TNF-α par les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire traités avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……77

Figure 39. Expression de l'interleukine 6 (IL-6) par les fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire traités avec des extraits d'hydroxyde de calcium avec ou sans chlorhexidine ……77

Figure 40. Pré-stadification de la sévérité de la lésion endo-parodontale ……91

Figure 41. Exemple de modèle expérimental de diffusion radiculaire …… 92

Listes des tableaux

Tableau 1. Évolution des classifications des lésions endo-parodontales ……17

Tableau 2. Éléments de diagnostic d'une lésion endo-parodontale ……20

Tableau 3. Synthèse des matériaux de régénération utilisés dans le traitement des lésions endo-parodontales ……25

Tableau 4. Synthèse des études cliniques utilisant les techniques de régénération pour le traitement de lésions endo-parodontales.……26

Tableau 5. Facteurs de pronostic d'une lésion endo-parodontale…… 29

Tableau 6. Concentration minimale inhibitrice (CMI) et bactéricide (CMB) de trois agents métalliques (cuivre, zinc, argent) et la chlorhexidine sur *E. faecalis* et *C. albicans* ……58

Tableau 7. Effets de médications intracanalaires sur un biofilm de *E. faecalis* mature ou en formation……63

Liste des Annexes

Annexe 1. Figures ……126

Annexe 2. Publication……128

Annexe 3. Liste des communications ……148

Annexe 4. Liste des laboratoires impliqués ……150

Kadiatou SY

POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE MEDICATIONS INTRACANALAIRES DANS LES LESIONS ENDO-PARODONTALES

Résumé

Les lésion endo-parodontale (LEP) sont des situation cliniques complexes où coexistent, au niveau d'une même dent, une pathologie parodontale et une pathologie pulpaire. Leur traitement implique en général une approche combinée endodontique et parodontal et leur pronostic est souvent incertain. Les médications intracanalaires (MIC) à base d'hydroxyde de calcium ($Ca[OH]_2$), pour compléter la désinfection canalaire, auraient un effet positif sur la cicatrisation parodontale dans les LEP mais les mécanismes qui expliquent cet effet sont encore mal compris.

La première partie de cette étude expérimentale est consacrée à l'optimisation d'une MIC à base de $Ca(OH)_2$ par addition de différents agents antimicrobiens (cuivre, zinc, argent et chlorhexidine [CHX]) et à la caractérisation détaillée des formulations obtenues. Parmi les molécules testés, seule la chlorhexidine (CHX) (1% et 2%) a significativement amélioré, *in vitro*, l'activité antimicrobienne de la pâte de $Ca(OH)_2$ sur les microorganismes cibles, sans en altérer les propriétés mécaniques et physico chimiques.

La deuxième partie du travail rapporte l'étude *ex vivo* du potentiel de diffusion de composés actifs contenus dans la MIC à travers la racine dentaire et l'étude *in vitro* de l'effet d'extraits de MIC sur la viabilité et la réponse de trois populations de cellules parodontales (fibroblastes du ligament alvéolo-dentaire, cémentoblastes et ostéoblastes). Une diffusion d'ions (Ca^{2+}, OH^-) et de CHX, plus importante via l'apex, a pu être mise en évidence, avec des profils de libération variables au cours du temps et selon la dose de CHX de départ. *In vitro*, les extraits de $Ca(OH)_2$ dilués (avec ou sans CHX) semblent bien tolérées par les cellules parodontales et réduire la production de médiateurs inflammatoires sans effet significatif cependant sur le potentiel de minéralisation des cellules.

Mots clés : lésion endo-parodontales, hydroxyde de calcium, chlorhexidine, nanoparticules, cellules parodontales

Abstract

Endo-periodontal lesions (EPL) are difficult clinical situations where periodontal and pulpal pathologies occur in the same tooth. Their treatment usually involves a combined endodontic and periodontal approach, and their prognosis is often uncertain. Intracanal calcium hydroxide ($Ca[OH]_2$) medications (ICM), to complete root canal disinfection, have been reported to have a positive effect on periodontal healing in EPL, but the specific mechanisms involved in the process are still unclear.

The first part of this experimental study is devoted to the optimization of a $Ca(OH)_2$-based MIC by addition of different antimicrobial agents (copper, zinc, silver and chlorhexidine [CHX]) and to the precise characterization of the resulting formulations. Among the tested molecules, only chlorhexidine (CHX) (1% and 2%) significantly improved, *in vitro*, the antimicrobial activity of the $Ca(OH)_2$ paste on the target microorganisms, without altering its mechanical and physicochemical properties.

The second part of the work reports the *ex vivo* study of the diffusion potential of active compounds contained in the ICM through the dental root and the *in vitro* study of the effect of ICM extracts on the viability and response of three populations of periodontal cells (fibroblasts of the periodontal ligament, cementoblasts and osteoblasts). A stronger diffusion of ions (Ca^{2+}, OH^-) and CHX via the apex could be demonstrated, with variable release profiles over time and according to the initial CHX dose. *In vitro*, diluted $Ca(OH)_2$ extracts (with or without CHX) seem to be well tolerated by periodontal cells and to reduce the production of inflammatory mediators without significant effect on the mineralization potential of the cells.

Key words: endo-periodontal lesion, calcium hydroxide, chlorhexidine, nanoparticles, periodontal cells