



**HAL**  
open science

# Implants formés in-situ pour le traitement des poches parodontales : évaluation in-vitro et in-vivo

Kevimy Agossa

► **To cite this version:**

Kevimy Agossa. Implants formés in-situ pour le traitement des poches parodontales : évaluation in-vitro et in-vivo. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2018. Français. NNT : 2018LILUS037 . tel-02426015

**HAL Id: tel-02426015**

**<https://theses.hal.science/tel-02426015>**

Submitted on 1 Jan 2020

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

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



**UNIVERSITE DE LILLE**  
**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE**

---

**THESE DE DOCTORAT**

Mention : Sciences de la vie et de la santé

Spécialité : Chirurgie Orale - Parodontologie - Biologie Orale

*Présentée par*

**AGOSSA Kèvimy**

---

**IMPLANTS FORMÉS *IN-SITU* POUR LE TRAITEMENT DES POCHESES  
PARODONTALES : EVALUATION *IN-VITRO* ET *IN-VIVO***

---

*Thèse dirigée par : Madame DELCOURT-DEBRUYNE Elisabeth*

*Soutenue le 27 novembre 2018*

Rapporteurs :

<b>Madame GOSSET Marjolaine</b>	Professeur, Université Paris-Descartes
<b>Madame GROSGOGÉAT Brigitte</b>	Professeur, Université Claude Bernard Lyon 1

Autres membres du jury :

<b>Monsieur TENENBAUM Henri</b>	Professeur, Université de Strasbourg
<b>Monsieur SIEPMANN Juergen</b>	Professeur, Université de Lille
<b>Monsieur HUCK Olivier</b>	Professeur, Université de Strasbourg
<b>Monsieur DEVEAUX Etienne</b>	Professeur, Université de Lille
<b>Madame SIEPMANN Florence</b>	Professeur, Université de Lille
<b>Madame Neut Christel</b>	Maitre de Conférences, Université de Lille

## Résumé

La fréquence élevée et les conséquences considérables des maladies parodontales sur la qualité de vie orale et la santé générale font de ces pathologies une préoccupation de santé publique. Le développement de traitements innovants est un moteur essentiel du progrès dans la prise en charge de ces maladies. Ce travail s'intéresse à l'utilisation d'agents antimicrobiens (non-antibiotiques) et anti-inflammatoires comme adjuvants au débridement mécanique des poches parodontales. Il est consacré à la mise au point et à l'optimisation d'une forme galénique appelée implant formé *in-situ* (IFIS), à base de polymères biocompatibles et résorbables, conçue pour le traitement des poches parodontales. Ce dispositif est injecté dans la lésion où il libère de façon prolongée une combinaison d'antiseptique (chlorhexidine) et d'anti-inflammatoire (ibuprofène). Nos résultats montrent (i) *in-vitro* la supériorité de l'IFIS en termes de propriétés mécaniques et antimicrobiennes sur des systèmes actuellement commercialisés pour le même usage et (ii) *in-vivo*, chez l'animal, un effet positif de l'IFIS sur la cicatrisation parodontale. Cette étude valide l'usage d'IFIS à base d'acide Poly(D,L-lactique-co-glycolique) (PLGA) comme support de libération contrôlée de principes actifs dans la poche parodontale. Elle montre également que la combinaison d'un antiseptique et d'un anti-inflammatoire au sein du même système de libération locale pourrait améliorer le traitement des parodontites tout en limitant le recours aux antibiotiques.

*Mots clés : implant formé in-situ, parodontites, libération contrôlée, PLGA, antiseptiques, AINS*

## Abstract

Periodontal diseases are highly prevalent oral conditions which strongly impact the oral quality of life and general health. Progress in the management of periodontal diseases depends, at least partly, on the development of novel and effective periodontal treatments. This work is concerned with the use of non-antibiotic antimicrobials and anti-inflammatory drugs as adjunctive periodontal therapy. The aim was to develop a novel polymer-based, biocompatible and resorbable local drug delivery system (*in-situ* forming implants -ISFI-), which could be injected into periodontal pockets and control the delivery of both an antiseptic (chlorhexidine) and an anti-inflammatory agent (Ibuprofen). The physical key properties and antimicrobial activity of the proposed implants were very promising *in vitro* suggesting an improvement as compared to currently marketed drug delivery systems for periodontitis treatment. *In vivo* results are consistent with the latter, showing a positive effect of ISFI on periodontal wound healing in an experimental mice model of periodontitis. Data from this study support Poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid (PLGA) as an attractive formulation for local drug-delivery into periodontal pockets. Our results further suggest that the local delivery of both an antiseptic and an anti-inflammatory drug is a promising adjunctive treatment of periodontitis. This should additionally reduce the use of systemic antibiotics in periodontal treatment and contribute to the combat against the development of bacterial resistances.

*Keywords: in-situ forming implant, periodontitis, controlled drug-release, PLGA, antiseptics, NSAID*

# Remerciements

*A.M.D.G*

*A ma famille*

« *Ex nihilo nihil fit* »

Tout revient à ceux dont je viens

*A mes amis et aux belles rencontres*

« *Vae soli* »

Grâce à vous je ne suis jamais seul

*Aux maîtres qui ont façonné l'élève que je suis et l'enseignant que j'apprends à devenir*

Je remercie Monsieur le Professeur Henri Tenenbaum, pour sa bienveillance à mon égard et son soutien dans les étapes clés de mon parcours professionnel. Recevez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance, de ma grande admiration et de mon profond respect.

Je remercie Madame le Professeur Elisabeth Delcourt-Debruyne, qui a orchestré avec talent et abnégation mon retour à Lille. Vous avez insufflé votre dynamisme dans mes projets de carrière. Veuillez croire à ma profonde reconnaissance pour votre soutien indéfectible.

Je remercie Monsieur le Professeur Juergen Siepmann, pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire et la confiance qu'il a bien voulu placer en moi. Trouvez ici l'expression de ma respectueuse considération.

Je remercie Madame le Professeur Florence Siepmann, qui a su me faire progresser tout au long de ces trois années de recherche et me transmettre un peu de son perfectionnisme. Veuillez accepter ma sincère gratitude pour votre soutien et votre encadrement efficace.

Je remercie Monsieur le Professeur Etienne Deveaux, Doyen de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Lille, qui m'accorde sa confiance en m'accueillant dans ses effectifs. Trouvez ici l'expression de ma reconnaissance pour votre écoute et votre soutien.

Je remercie Madame le Professeur Marjolaine Gosset, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de toute ma considération et de mon admiration pour votre implication en recherche.

Je remercie Monsieur le Professeur Olivier Huck, pour son accompagnement précieux dans mes premières publications, la formation intensive qu'il m'a offerte à Strasbourg et pour sa motivation contagieuse.

Je remercie Madame le Professeur Brigitte Grosogeat, qui me fait l'honneur de juger ce travail. Trouvez ici l'expression de toute ma considération et de mon admiration pour l'enseignant-chercheur infatigable que vous êtes.

Je remercie Madame le Docteur Christel Neut, qui m'a accueilli au sein de son équipe et transmis avec patience un peu de sa grande expérience de microbiologiste. Trouvez ici l'expression de ma grande reconnaissance et de mon respect.

Je remercie Madame le Professeur Monique Capron, dont la rencontre restera un moment charnière de mes premiers pas dans la recherche. Vous me gratifiez de votre bienveillant soutien. Je vous prie d'accepter ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon respect.

*Aux collègues qui m'ont accompagné, aidé, soutenu et supporté*

Cette étude est le fruit d'un travail d'équipe. Aussi, je souhaite remercier tous ceux qui ont contribué de façon directe ou indirecte à la concrétisation de ce projet, en particulier :

Tous les membres, les usagers et les responsables des laboratoires U1008 Inserm de Lille, U995 Inserm de Lille, UMR 1260 Inserm Regenerative NanoMedicine de Strasbourg, et le Dr Meuric V., U1241 Inserm - Inra - Université de Rennes 1.

Mes co-thésards Martin L., Lauranne P. et Fareeha B.

Mes collègues de clinique Marie D., Romain D., Julie L., Jérôme R., Romain D. et François B.

Les étudiants stagiaires Angélique D., David A., Geoffrey P. et Aurélie G.



# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	<b>11</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>12</b>
<b>1. Etat de l'art de la thématique de recherche</b> .....	<b>13</b>
1.1. Les maladies parodontales .....	13
1.1.1. Définitions .....	13
1.1.2. Epidémiologie .....	14
1.1.3. Etiopathogénie .....	16
1.1.3.1. Le facteur bactérien .....	16
1.1.3.2. La réponse inflammatoire de l'hôte .....	17
1.2. Place des adjuvants chimiques en thérapeutique parodontale .....	19
1.2.1 Contrôle de l'infection .....	19
1.2.1.1. Antibiotiques dans le traitement parodontal .....	21
1.2.1.1.1. Administration des antibiotiques par voie systémique .....	21
1.2.1.1.2. Administration des antibiotiques par voie locale .....	26
1.2.1.1.3. Synthèse : les antibiotiques dans le traitement parodontal .....	26
1.2.1.2. Antiseptiques dans le traitement parodontal .....	26
1.2.1.2.1. Formes topiques des antiseptiques .....	27
1.2.1.2.2. Formes d'antiseptiques à libération contrôlée .....	27
1.2.1.2.3. Synthèse : les antiseptiques dans le traitement parodontal .....	28
1.2.2. Modulation de l'inflammation .....	28
1.2.2.1. Intérêt des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le traitement parodontal .....	33
1.2.2.1.1. Les AINS par voie systémique pour le traitement parodontal .....	33
1.2.2.1.2. Les AINS par voie locale pour le traitement parodontal .....	34
1.2.2.1.3. Synthèse : les AINS dans le traitement parodontal .....	34
1.2.2.2. Autres molécules anti-inflammatoires et immuno-modulatrices en parodontologie .....	34
1.3. Evolution des systèmes de libération contrôlée pour le traitement des parodontites .....	37
<b>2. Présentation du dispositif étudié : implants se formant <i>in-situ</i></b> .....	<b>40</b>
2.1. Principe de fonctionnement .....	40
2.2. Composition du dispositif étudié .....	41
2.2.1. Les polymères .....	41
2.2.2. Le solvant .....	42
2.2.3. Les principes actifs .....	42
2.2.4. Le plastifiant .....	42
<b>3. Problématique et objectifs de l'étude</b> .....	<b>43</b>
<b>CHAPITRE I:</b> .....	<b>57</b>
<b>PHYSICAL KEY PROPERTIES OF ANTIBIOTIC-FREE, PLGA/HPMC-BASED IN-SITU FORMING IMPLANTS FOR LOCAL PERIODONTITIS TREATMENT.</b> .....	<b>57</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>58</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>59</b>
<b>2. Materials and methods</b> .....	<b>61</b>
2.1. Materials .....	61
2.2. Preparation of liquid in-situ forming implant formulations .....	61
2.3. Syringeability .....	61
2.4. Texture profile analysis .....	62
2.5. "Adhesive" properties .....	64
2.6. Swelling/shrinking behavior .....	66
<b>3. Results and discussion</b> .....	<b>66</b>
3.1. Syringeability .....	66
3.2. Texture profile analysis .....	67
3.3. "Adhesive" properties .....	69
3.4. System swelling/shrinking .....	73

4. Conclusion.....	75
<b>CHAPITRE II .....</b>	<b>81</b>
<b>NOVEL <i>IN-SITU</i> FORMING IMPLANTS WITH A DUAL ANTIMICROBIAL AND ANTI- INFLAMMATORY EFFECT FOR LOCAL PERIODONTITIS TREATMENT .....</b>	<b>81</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>82</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>83</b>
<b>2. Materials and methods.....</b>	<b>85</b>
2.1. Materials.....	85
2.2. Preparation of liquid in-situ forming implant formulations .....	85
2.3. Microbiological tests.....	85
2.3.1. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC).....	85
2.3.2. Agar well diffusion .....	86
2.3.3. Time Kill Study.....	87
2.3.4. Growth Curves .....	87
2.4. Syringeability .....	87
2.5. Texture profile analysis.....	88
2.6. Swelling/shrinking behavior .....	88
2.7. Drug release.....	88
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>89</b>
3.1. Microbiological tests.....	89
3.1.1. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC).....	89
3.1.2. Agar well diffusion .....	90
3.1.3. Time Kill Study.....	92
3.1.4. Growth Curves .....	92
3.2. Syringeability .....	94
3.3. Texture profile analysis.....	94
3.4. Macroscopic swelling/shrinking .....	95
3.5. Drug release measurements.....	98
<b>4. Conclusion.....</b>	<b>99</b>
<b>CHAPITRE III .....</b>	<b>103</b>
<b>EFFECTS OF AN <i>IN SITU</i> FORMING IMPLANT ON GINGIVAL WOUND HEALING IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PERIODONTITIS.....</b>	<b>103</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>104</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>105</b>
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>107</b>
2.1. Experimental periodontitis induction in mouse model .....	107
2.2. Treatment of periodontal defect.....	107
2.3. Tissue preparation .....	107
2.4. Histomorphometric analysis.....	108
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>108</b>
<b>5. Conclusion.....</b>	<b>109</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>115</b>
<b>Résumé en français .....</b>	<b>118</b>
<b>Articles et communications .....</b>	<b>130</b>

## Abbréviations

AAP Académie Américaine de Parodontologie

AINS/NSAID Anti-inflammatoires non stéroïdien

ANR Agence Nationale de la Recherche

ATBC Acetyltributyl citrate

CAL Niveau clinique de l'attache parodontale

CHX Chlorhexidine

CMI/MIC Concentration minimale inhibitrice - Minimum inhibitory concentration

CMB/MBC Concentration minimale bactericide - Minimum bactericidal concentration

COX Cyclo-oxygénase

CFU/UFC Colonie formant unité - Colony forming unit

DSR/SRP Détartrage surfaçage radiculaire - Scaling and root planing

EDTA Ethylènediaminetétraacétique

EFP Fédération Européenne de Parodontologie - European Federation of Periodontology

HEC Hydroxyethylcellulose

HPMC Hydroxypropylmethylcellulose

IBU Ibuprofène

IFIS/ISFI Implants formés *in situ* - *In situ* forming implants

IL Interleukine

LPS Lipopolysaccharide

MMP Métalloprotéinase matricielle - Matrix metalloproteinase

NMP N-methyl pyrrolidone

PBS Tampon phosphate salin - Phosphate-buffered saline

PPD Proondeur de poche parodontale - Periodontal pocket probing depth

PFA paraformaldehyde

PGA Acide Polyglycolique - Polyglycolic acid; polyglycolide

PGE2 Prostaglandine E2

PLA Acide polylactique - Polylactic acid; polylactide

PLGA Acide Poly(D,L-lactique-co-glycolique) - Poly(lactic-co-glycolic acid)

TNF Facteur de nécrose tumorale - Tumor necrosis factor

TPA Analyse de profil de texture - Texture profile analysis

# Introduction

## Préambule

Cliniciens et chercheurs en parodontologie poursuivent un but commun, celui de promouvoir, restaurer et maintenir la santé parodontale. Le développement et la mise en œuvre de traitements parodontaux innovants et efficaces sont nécessaires pour parvenir à cette ambition. Dès le milieu du XX<sup>e</sup> siècle, la recherche scientifique a résolument accompagné l'évolution de la parodontologie. La « matrice conceptuelle » du parodontologiste moderne est inlassablement façonnée par un nombre grandissant d'études expérimentales et cliniques qui guident la prise en charge quotidienne des patients. Il est habituel de situer les prémices de la recherche parodontale moderne dans le courant des années 1960 avec la publication des premiers essais cliniques dont l'étude fondatrice de Løe *et al.* sur la gingivite expérimentale (1). Ces travaux mettent en évidence pour la première fois le lien causal entre les modifications quantitatives et qualitatives de la plaque dentaire et l'apparition des symptômes de la gingivite (2). La nature bactérienne de cette plaque dentaire accrédite alors l'hypothèse de l'étiologie infectieuse des maladies parodontales et valide par conséquent l'approche anti-infectieuse comme modalité de traitement de ces pathologies. Les concepts thérapeutiques hérités de cette période à savoir le débridement mécanique couplé à l'usage d'antimicrobiens par voie systémique ou locale (3) ont largement prouvé leur efficacité et demeurent valides. Soutenue par les progrès technologiques, la recherche parodontale a exploré parallèlement l'origine infectieuse des maladies parodontales ainsi que leur nature inflammatoire. En effet, le constat précoce d'une différence dans l'expression clinique de la maladie chez des sujets exposés aux mêmes facteurs environnementaux suggère une susceptibilité variable à l'inflammation parodontale (4). Dans les années 80, des travaux parmi lesquels ceux de Offenbacher *et al.* montrent des différences de niveau des médiateurs de l'inflammation tels que la prostaglandine E2 (PGE2) dans des sites à différents stades de la maladie (5). Ces études renforcent l'hypothèse du rôle central de la réponse de l'hôte dans l'expression phénotypique des maladies parodontales. La prépondérance du rôle de l'inflammation dans la destruction des tissus parodontaux modifie de façon considérable la compréhension de la pathogénèse des maladies parodontales. De plus, ce changement de paradigme a considérablement élargi les possibilités diagnostiques et thérapeutiques en parodontologie. De nombreux agents anti-inflammatoires, dont les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont alors été proposés, en

complément du débridement mécanique, pour moduler la réponse inflammatoire de l'hôte et limiter la destruction tissulaire (6,7).

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet ANR Imperio (ANR-14-CE16-0025) qui a pour but le développement, la caractérisation et l'optimisation d'une forme galénique à libération contrôlée destinée au traitement des lésions parodontales. Après un exposé de l'état de l'art du sujet, les deux premiers chapitres seront consacrés à l'étude des propriétés physiques et de l'activité antimicrobienne du dispositif. Le dernier chapitre abordera l'effet *in vivo* du dispositif à l'aide d'un modèle de parodontite expérimentale chez la souris, afin de vérifier les tendances observées *in vitro*.

## **1. Etat de l'art de la thématique de recherche**

### **1.1. Les maladies parodontales**

#### **1.1.1. Définitions**

Le parodonte est une entité anatomique et biologique composée de différents tissus (fibromuqueuse gingivale, desmodonte, ciment radiculaire, os alvéolaire) dont la principale fonction est d'assurer le soutien des dents et leur ancrage aux bases osseuses (8). La santé parodontale est définie comme l'absence d'inflammation, du moins cliniquement détectable, au niveau du parodonte, et une homéostasie entre le microbiote et la réponse immunitaire de l'hôte (9). Les maladies parodontales sont des pathologies chroniques inflammatoires multifactorielles, associées à une dysbiose bactérienne, qui affectent le parodonte et pourraient également modifier l'évolution de pathologies systémiques (10). Du point de vue clinique, les maladies parodontales sont regroupées en deux principaux groupes selon le niveau et la réversibilité de l'atteinte tissulaire. Les gingivites sont caractérisées par des lésions réversibles confinées au parodonte superficiel (tissu gingival). Les parodontites sont des atteintes irréversibles de l'ensemble des tissus parodontaux qui, en l'absence de traitement, aboutissent à la perte dentaire (10). L'une des caractéristiques fondamentales des maladies parodontales est qu'il s'agit d'une association de lésions élémentaires, pouvant siéger de façon indépendante à différents endroits autour d'une même dent correspondant à des sites parodontaux (11). Si les lésions de gingivite et de parodontite sont précisément décrites sur les plans histologique et clinique, la définition du cas de gingivite ou de parodontite est moins consensuelle et rend complexe l'estimation de

la fréquence des maladies parodontales à l'échelle de la population (12). Récemment, une révision de la classification des maladies parodontales et implantaire a été proposée par la Fédération Européenne (EFP) et l'Académie Américaine (AAP) de parodontologie pour mieux répondre aux besoins spécifiques des cliniciens et des chercheurs dans le domaine (13). Elle est présentée ici sous forme de tableau de synthèse (Tableau 1).

### **1.1.2. Epidémiologie**

Les maladies parodontales figurent au rang des affections humaines les plus fréquentes (14). La prévalence de la gingivite varie entre 50 et 90% de la population mondiale selon les définitions (10). Les parodontites sont moins fréquentes mais leurs conséquences sanitaires et socio-économiques en font une préoccupation de santé publique (14). La parodontite sévère est considérée comme la sixième maladie humaine la plus fréquente au monde et concernerait 11,2% de la population mondiale soit près de 750 millions de personnes (14–17). La parodontite est la première cause de perte dentaire chez l'adulte et serait responsable d'une part considérable des 442 Mds de coûts directs et indirects imputés aux pathologies bucco-dentaires en 2010 (18,19). La prévalence de la parodontite augmente avec l'âge et un pic d'incidence est observé entre 30 et 40 ans (17). La distribution de la maladie varie également en fonction de déterminants individuels et pourrait refléter des inégalités socio-économiques (20). En France, près d'un adulte sur deux présente des pertes d'attache parodontale sévères ( $\geq 5\text{mm}$ ) (21). Ces données sont concordantes avec celles issues d'autres populations occidentales (22,23). Il existe un lien entre l'état parodontal et la santé générale. Une revue récente des registres d'études cliniques identifie 57 associations potentielles entre les maladies parodontales et des pathologies systémiques qui font à ce jour l'objet de recherches (24). Les niveaux de preuve les plus élevés concernent des pathologies telles que les diabètes, certaines affections cardiovasculaires et la polyarthrite rhumatoïde (25–30). Le rationnel biologique de cette association est activement étudié mais reste partiellement élucidé. Le rôle du microbiote dysbiotique et sa capacité à moduler la réponse immune de l'hôte alimentent les hypothèses étiopathogéniques qui pourraient expliquer le lien entre les maladies parodontales et la santé générale (31,32).

## INTRODUCTION

**Tableau 1.** Résumé de la nouvelle classification des maladies parodontales et péri-implantaires, *adapté d'après Caton et al. 2018 (13)*

<b>CLASSIFICATION OF PERIODONTAL AND PERI-IMPLANT DISEASES AND CONDITIONS 2017</b>										
<b>Periodontal Diseases and Condition</b>										
<b>Periodontal Health, Gingival Diseases and Conditions</b>			<b>Periodontitis</b>			<b>Other Conditions Affecting the Periodontium</b>				
Periodontal Health and Gingival Health	Gingivitis: Dental Biofilm-induced	Gingival Diseases Non-Dental Biofilm-Induced	Necrotizing Periodontal Diseases	Periodontitis	Periodontitis as a Manifestation of Systemic Disease	Systemic diseases or condition affecting the periodontal supporting tissue	Periodontal Abscesses and Endodontic-Periodontal Lesions	Mucogingival Deformities and Conditions	Traumatic Occlusal Forces	Tooth and Prosthesis Related Factors
<b>Peri-Implant Diseases and Conditions</b>										
<b>Peri-Implant Health</b>			<b>Peri-Implant Mucositis</b>			<b>Peri-Implantitis</b>			<b>Peri-Implant Soft and Hard Tissue Deficiencies</b>	



### 1.1.3. Etiopathogénie

Les maladies parodontales seraient apparues il y a plus de 10 000 ans, au néolithique, une période marquée par de profonds changements des habitudes alimentaires qui ont engendré des modifications majeures du microbiote oral (33). En effet, le facteur bactérien est indissociable de l'initiation de la maladie parodontale mais sa présence ne suffit pas à en expliquer l'occurrence et la progression (4). L'analyse des facteurs de risque des maladies parodontales à l'aide de modèles de régression suggère d'ailleurs une contribution limitée de la plaque dentaire à la perte d'attache (34). A ce jour, les mécanismes qui expliquent le passage de la santé à la maladie parodontale ne sont qu'en partie élucidés. Les concepts actuels reposent sur des interactions complexes entre une flore commensale et la réponse immune de l'hôte au sein d'un environnement particulier (6,32) (Fig. 1).

#### 1.1.3.1. Le facteur bactérien

La mise en évidence de différences entre la flore bactérienne des sites sains et des sites malades a permis d'identifier une trentaine de bactéries cultivables, associées à la maladie parodontale et regroupées en complexes microbiens selon leur degré de pathogénicité (35). Parmi ces bactéries, *P. gingivalis*, *T. forsythia* et *T. denticola* se distinguent par leurs facteurs de virulence (protéases, toxines etc.) et leur capacité à induire chez l'animal une parodontite expérimentale (36). La triade du « complexe rouge » est également fortement associée chez l'Homme à la progression de la maladie (37). Ces données ont accrédité l'hypothèse d'un lien causal entre la virulence d'un petit groupe de pathogènes spécifiques et la parodontite (36–40). Les progrès récents permettent de mieux appréhender le rôle des bactéries dans l'étiologie des maladies parodontales et suggèrent un concept nouveau, basé sur la synergie polymicrobienne et la dysbiose (41). Selon cette théorie, le passage de la santé à la pathologie est caractérisé par un bouleversement écologique : le basculement d'une communauté microbienne symbiotique, compatible avec la santé, vers une flore dysbiotique pro-inflammatoire (41). Cette rupture de l'homéostasie tissulaire (42) qualifiée de « catastrophe écologique » (43) serait déclenchée par *P. gingivalis* qui, bien que faiblement représenté dans la communauté, orchestre le déséquilibre (41). Le terme pathogène clé de voûte ou « keystone pathogen » traduit l'influence de bactéries telles que *P. gingivalis* qui sont capables d'induire la dysbiose en modulant la réponse immunitaire de l'hôte *via* des

mécanismes complexes (44–46). Dans le modèle de dysbiose, l'inflammation et sa persistance résultent d'avantage de la virulence de l'ensemble du microbiote tel un orchestre que de celle de bactéries « clé de voûte » qualifiées de chefs d'orchestre (47). Cette hypothèse explique qu'en l'absence de pathogènes commensaux, *P. gingivalis* est incapable d'induire une parodontite expérimentale chez l'animal (46). Ainsi, la contribution du facteur bactérien à la maladie parodontale est aujourd'hui définie comme l'action synergique d'une coopérative de symbiontes devenus pathobiontes sous l'influence de pathogènes « clé de voûte » ou à la faveur d'une défaillance immunitaire de l'hôte (41).

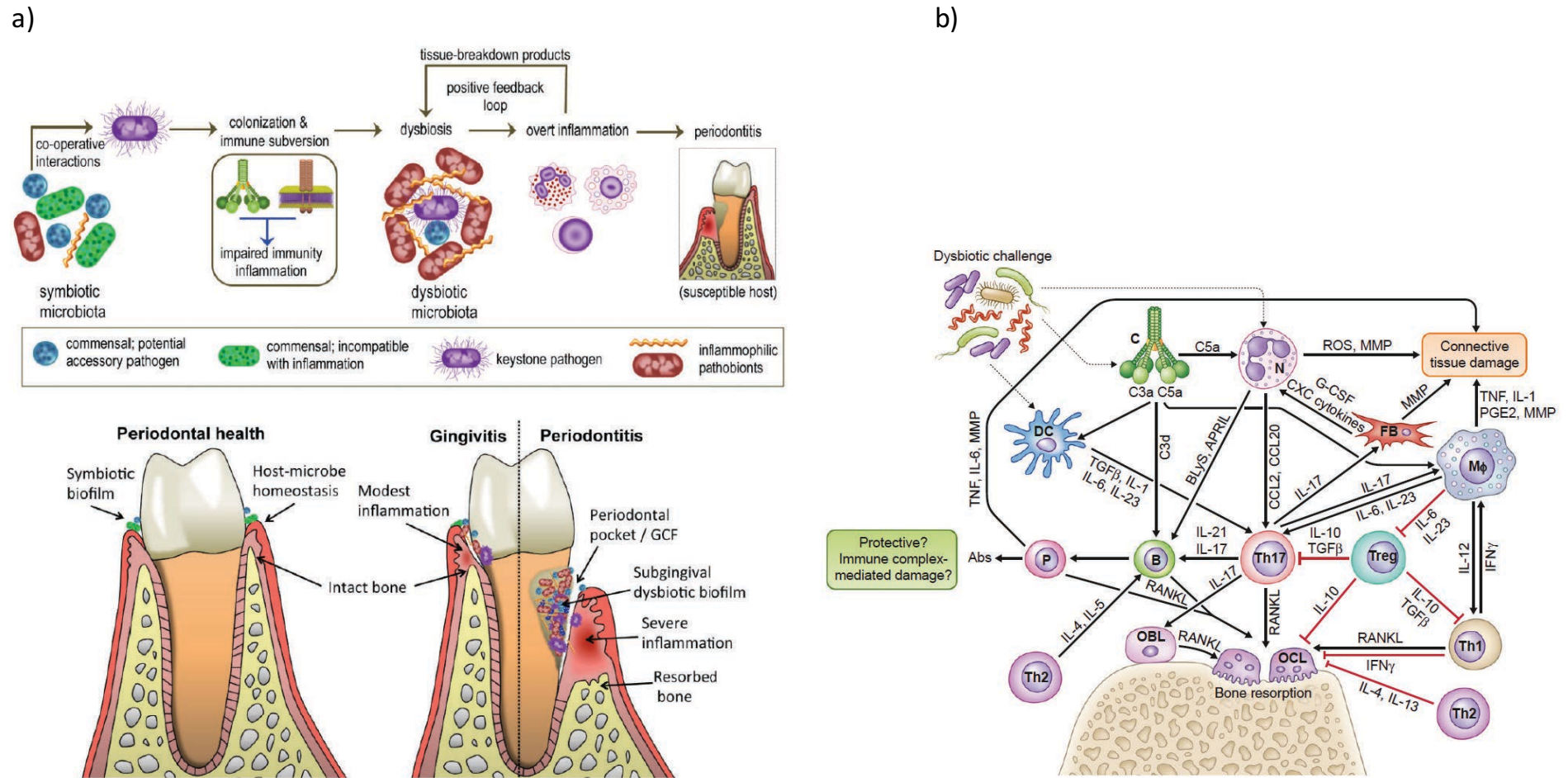
### 1.1.3.2. La réponse inflammatoire de l'hôte

Dès 1965, Løe *et al.* observent des différences inter-individuelles dans les degrés de sévérité de la gingivite (1). Les auteurs l'attribuent à la variabilité individuelle des mécanismes de défense de l'hôte et sont précurseurs de la notion de susceptibilité parodontale confirmée plus tard par Trombelli *et al.*, (48). La part du déterminisme génétique dans cette susceptibilité parodontale est admise bien que mal évaluée en raison du caractère environnement-dépendant et polygénique probable des maladies parodontales (49,50). Les travaux de Page et Schroeder (1976) ont initié la compréhension des mécanismes de la réponse de l'hôte face au challenge bactérien (51). Ils décrivent la réponse inflammatoire en quatre séquences chronologiques qui aboutissent à la progression (ou non) de la lésion et mettent en jeu des acteurs cellulaires et des médiateurs humoraux (51,52) :

- la première phase correspond à une réponse épithéliale et vasculaire à l'accumulation du biofilm. A ce stade, les métabolites bactériens activent les cellules de l'épithélium de jonction qui sécrètent des interleukines (IL-8, IL-1 $\alpha$ ), prostaglandines (PGE2) métallo-protéases et le TNF- $\alpha$ . La réponse épithéliale active à son tour les cellules péri-vasculaires et endothéliales qui sécrètent des médiateurs tels que l'IL-8 et l'histamine (52).

- la deuxième phase correspond à une réponse inflammatoire aiguë associée à une lésion tissulaire initiale. Elle est caractérisée par la sécrétion de nombreuses autres cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 etc.) et l'intervention des polynucléaires neutrophiles (52).

- la troisième phase est celle de la réponse immune, associée à une lésion tissulaire dite précoce. Elle est caractérisée par l'amplification de la réponse inflammatoire, l'apparition de cellules mononuclées telles que les lymphocytes T et la production d'une multitude de cytokines supplémentaires tels que IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13 (52)



**Fig 1.** a) Synergie polymicrobienne et dysbiose dans les maladies parodontales : la vue supérieure décrit le déséquilibre bactérien à l’origine de l’inflammation qui elle-même entretient la dysbiose. La vue inférieure montre l’évolution de la santé à la maladie parodontale

b) Schéma simplifié des interactions cellulaires et moléculaires aboutissant à la destruction osseuse.

*Adapté d’après Hajishengallis et al. 2015, 2017 (32, 53)*

- la quatrième phase caractérise le passage possible mais non systématique de la gingivite vers la parodontite. Elle correspond à une lésion histologique dite établie qui se traduit cliniquement par la migration de l'épithélium jonctionnel et l'apparition de la poche parodontale. On observe à ce stade la prépondérance de cellules plasmocytaires et une potentialisation de la production de médiateurs de l'inflammation (52).

Les progrès de ces quarante dernières années n'ont pas fondamentalement remis en cause le modèle de Page et Schroeder (1976). Ils permettent de mieux comprendre les interactions et rôles complexes des différents acteurs cellulaires mais génèrent également de nombreuses questions non encore élucidées (53).

## **1.2. Place des adjuvants chimiques en thérapeutique parodontale**

La thérapeutique parodontale repose sur la mise en œuvre simultanée de stratégies complémentaires :

- Stratégies médicales : elles visent à évaluer et contrôler les facteurs systémiques associés à l'état parodontal ;
- Stratégies comportementales : elles visent l'acquisition et la promotion de comportements favorables à la santé bucco-dentaire tout au long de la vie ;
- Stratégies mécanistiques : elles comprennent le contrôle de l'accumulation du biofilm par des approches individuelles et professionnelles, non chirurgicales ou chirurgicales.

Les deux premières stratégies, bien qu'essentielles au succès thérapeutique, ne seront pas abordées dans ce travail. Les adjuvants chimiques, notamment les agents antimicrobiens et anti-inflammatoires sont largement mis à contribution dans les stratégies mécanistiques qui visent le contrôle de l'infection et la résolution de l'inflammation (7, 54, 55) (Fig 2).

### **1.2.1 Contrôle de l'infection**

Le succès de la thérapeutique parodontale passe par la réduction de la charge bactérienne totale. Le contrôle de plaque individuel et le débridement mécanique des poches permettent d'atteindre cet objectif et suffisent le plus souvent à arrêter la progression de la maladie et en réduire les symptômes. C'est pourquoi le débridement mécanique est considéré à ce jour comme le traitement parodontal de référence (54).

## INTRODUCTION

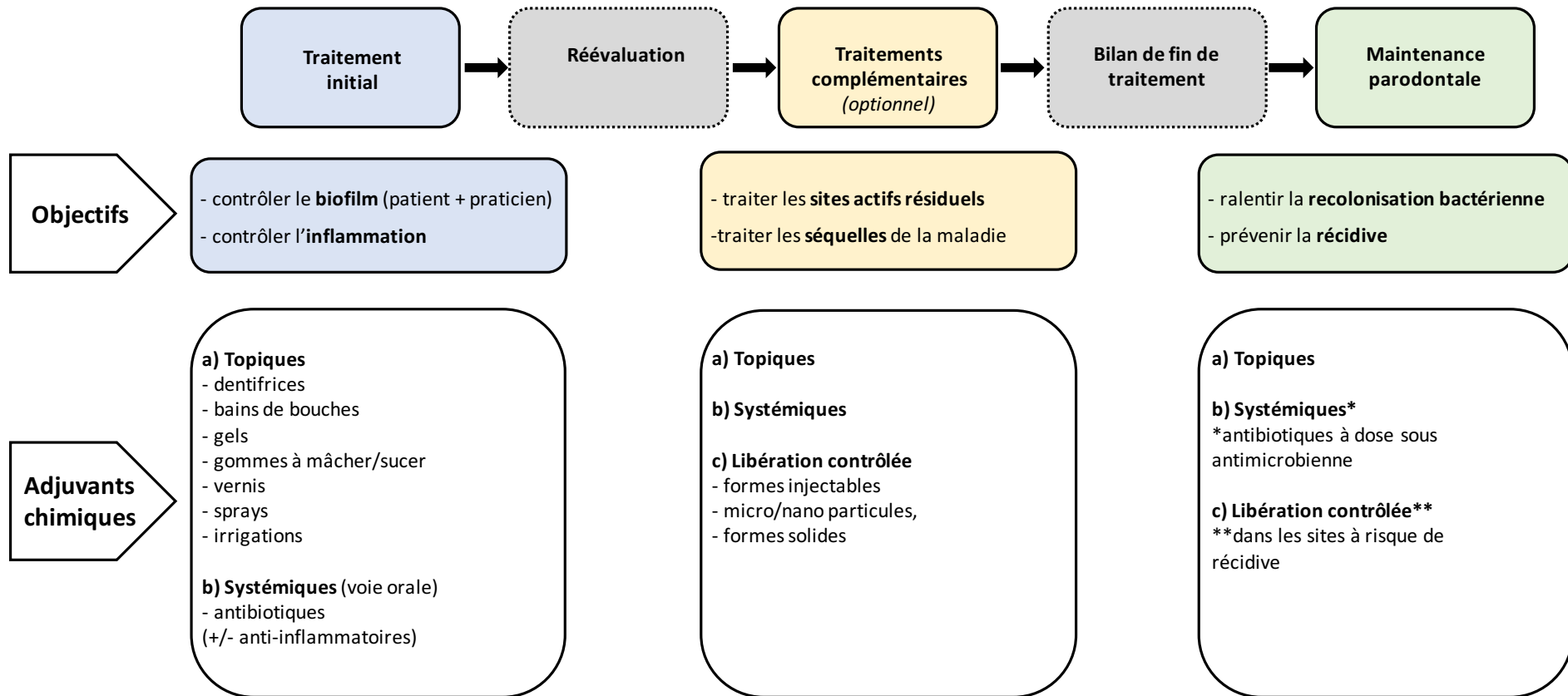


Fig 2. Place des adjuvants chimiques dans les étapes du traitement des parodontites

Les modalités et les résultats du traitement mécanique ont fait l'objet de très nombreuses études (55) qui ne sont pas traitées dans ce travail. Chez certains patients, un certain nombre de sites ne répondent pas suffisamment à la thérapeutique mécanique. Cette moindre efficacité serait due à (i) l'accès limité aux lésions profondes et/ou complexes (lésions infra osseuses, lésions inter radiculaires) (55), (ii) la présence de pathogènes spécifiques (56,57), (iii) la persistance de niches bactériennes extra parodontales telles que le dos de la langue qui servent de réservoir (58). Les adjuvants chimiques antimicrobiens ont pour but de compléter l'action mécanique pour améliorer le contrôle de l'infection. Les deux principaux types d'antimicrobiens utilisés en parodontologie sont les antibiotiques, par voie systémique ou locale, et les antiseptiques, sous forme topique ou à libération prolongée.

### **1.2.1.1. Antibiotiques dans le traitement parodontal**

En odontologie, les antibiotiques sont utilisés à des fins prophylactiques ou thérapeutiques. Notre propos se limite à leur usage thérapeutique pour le traitement parodontal.

#### **1.2.1.1.1. Administration des antibiotiques par voie systémique**

De nombreuses revues systématiques ont évalué l'efficacité des antibiotiques systémiques en complément du débridement mécanique. Les plus récentes ( $\leq 10$  ans) sont résumées dans le Tableau 2 (59–66). Les principaux antibiotiques administrés par voie systémique en parodontologie sont l'amoxicilline et le métronidazole, en monothérapie ou en combinaison pendant 7 à 14 jours (59–61). Des substitutions sont possibles avec des macrolides dont l'azithromycine et la clindamycine, notamment en cas d'allergies (62,67). Les tétracyclines, autrefois prescrites dans les formes agressives de parodontites ne sont plus recommandées en raison de leurs effets secondaires et de l'augmentation du risque de résistances bactériennes à ces molécules (68). De façon globale, les antibiotiques systémiques améliorent de façon significative mais modeste le gain d'attache clinique (0,2 à 0,6mm) et la réduction de poche (0,2 à 0,8mm) par rapport au traitement mécanique seul. Leur bénéfice est plus important dans les formes agressives de maladies parodontales et dans les poches parodontales profondes mais semble limité à long terme ( $> 6$  mois) (55).

## INTRODUCTION

**Tableau 2.** Revues systématiques récentes ( $\leq 10$  ans) évaluant l'efficacité des antibiotiques systémiques comme adjuvants du traitement mécanique

Auteurs, année {référence}	Etudes incluses	Conclusions
Bono <i>et al.</i> , 2010 {64}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 10 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 1 à 12 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + (Amox et/ou Met) pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	la méta-analyse ne montre pas de différence significative pour les paramètres cliniques étudiés (PPD, BOP, CAL, PI)
Sgolastra <i>et al.</i> , 2012 {59}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 4 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 3 à 24 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + (Amox/Met) pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	la méta-analyse montre une différence significative pour CAL (0,21; 95% IC = 0,02 - 0,4); et PPD ( 0,43; 95% IC = 0,24 - 0,63) en faveur du groupe SRP+ATB
Sgolastra <i>et al.</i> , 2012 {60}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 6 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 3 à 6 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> sujets de 26 à 38 ans atteints de parodontite agressive</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + (Amox/Met) pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	la méta-analyse montre une différence significative pour CAL (0,42; 95% IC = 0,23 - 0,61); PPD ( 0,58; 95% IC = 0,39 - 0,77); BOP (14,95; 95% IC, 6,68 - 23,23), GBI (21,44; 95% IC 3,80 - 39,08) en faveur du groupe SRP+ATB
Sgolastra <i>et al.</i> , 2014 {61}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 6 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 3 à 12 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + Met pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	la méta-analyse montre une différence significative pour CAL (0,10; 95% IC = 0,08 - 0,12); PPD (0,18; 95% IC = 0,09 - 0,28) et BOP (8,74; 95% IC = 3,23 - 14,24) en faveur du groupe SRP+ATB.
Kolakovic <i>et al.</i> , 2014 {65}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 12 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 3 à 12 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique ou agressive</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + (Amox/Met) pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	la probabilité de fermeture de la poche (PPD < 3mm) à 3 et 6 mois après traitement est augmentée de 3.55 et 4.43 dans le groupe SRP+ATB par rapport au groupe SRP seul

## INTRODUCTION

Keestra <i>et al.</i> , 2015 {62}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 43 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 2 mois à 13 ans</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB <i>Amox seul (1 étude); Amox+Ac. Clav (1 étude, Azth (8 études); Clari (1 étude); Doxy SDD (14 études); Doxy (4 études); Amox + Met (10 études); Moxi (1 étude); Ord (1 étude); Spira (2 études); Tetra (2 études)</i></p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>(i) les ATB améliorent la réduction de poche à 3, 6 et 12 mois par rapport au SRP seul</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- dans les poches modérées (PPD initiale 4-6mm): à 12 mois -0.25 mm +/- 0.27</li> <li>- dans les poches profondes (PPD initiale &gt;6mm): à 12 mois -0.74 +/-0.30 mm</li> </ul> <p>(ii) on observe une tendance à la supériorité de Amox+Met et de Met seul par rapport aux autres ATB</p> <p>(iii) on observe une tendance à la réduction de l'effet bénéfique des ATB au cours du temps</p>
Smiley <i>et al.</i> , 2015 {67}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 24 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> &gt; 6mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB <i>Amox + Met (7 études); Met seul (3 études); Azth (6 études); Clari (1 étude); Moxi (1 étude), Tetra (3 études), Doxy (3 études)</i></p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>les ATB améliorent le gain d'attache clinique CAL (0,35; 95% IC = 0,20 - 0,51) par rapport au SRP seul</p>
Chambrone <i>et al.</i> , 2016 {63}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 3 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> &gt; 6mois</p> <p><b>population étudiée:</b> patients fumeurs atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB <i>Met seul (2 études); Azth (1 étude)</i></p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>la méta-analyse ne montre pas de différence significative pour les paramètres cliniques étudiés (PPD, CAL, BOP)</p>
Zandbergen <i>et al.</i> , 2016 {64}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 20 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 2 à 12 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + (Amox/Met) pendant 7 à 14 jours</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>les ATB améliorent la réduction de poche PPD (-0,47mm), le gain d'attache CAL (+0.33 mm) et l'inflammation BOP (-6.98 %) par rapport au SRP seul</p>

RCT : essais contrôlés randomisés ; PPD : profondeur de poche parodontale ; CAL : niveau d'attache clinique ; ATB : antibiotiques ; BOP : saignement au sondage ; PI : indice de plaque ; IC : intervalle de confiance ; SRP : débridement mécanique ; Amox : amoxicilline ; Met : métronidazole ; Azth : azithromycine ; Moxi: moxifloxacine ; Clari : clarithromycine ; Tetra : tétracyclines ; Doxy : doxycycline ; Ord : ornidazole ; Ac Clac : acide clavulanique



## INTRODUCTION

**Tableau 3.** Revues systématiques récentes ( $\leq 10$  ans) évaluant l'efficacité des antibiotiques locaux comme adjuvants du traitement mécanique

Auteurs, année {référence}	Etudes incluses	Conclusions
Matesanz-Perez <i>et al.</i> , 2013 {69}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 52 RCTs (56 publications)</p> <p><b>durée de suivi:</b> 1 à 36 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB locaux (ou antiseptiques)</p> <p><i>Azth (1 étude); Doxy (7 études); Met (7 études); Min (18 études); Tetra (13 études)</i></p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul ou SRP + placebo</p>	<p>l'application sous gingivale de doxycycline, minocycline ou tétracycline améliore la fermeture de la poche (PPD -0,5 à 0,7 mm) par rapport au traitement mécanique seul</p>
Smiley <i>et al.</i> , 2015 {67}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 8 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 6 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB locaux (ou antiseptiques): Doxy (3 études); Min (5 études)</p> <p><b>groupe contrôle:</b></p>	<p>Avec un faible niveau de preuve, les auteurs concluent que l'application sous gingivale de doxycycline et de minocycline améliorent modestement le gain d'attache CAL (0,64; 95% IC = 0 - 1,28) et (0,24; 95% IC = 0,06 - 0,55) respectivement</p>
Chambrone <i>et al.</i> , 2016 {63}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 4 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 6 mois minimum</p> <p><b>population étudiée:</b> patients fumeurs atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB locaux (ou systémiques): Azth; Doxy; Met; Clari</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>l'application sous gingivale d'ATB locaux améliore la fermeture de la poche par rapport au traitement mécanique seul</p> <p>PPD (-0,81; 95% IC = 0,17 - 1,44), CAL (0,91; 95% IC = 0,19 - 1,63)</p>
Rovai <i>et al.</i> , 2016 {70}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 6 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 6 mois minimum</p> <p><b>population étudiée:</b> patients diabétiques atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> SRP + ATB locaux : Azth; Doxy; Clari; Mino (3 études)</p> <p><b>groupe contrôle:</b> SRP seul</p>	<p>le bénéfice clinique de l'application locale d'ATB est observé dans les cas suivants</p> <p>- diabétiques équilibrés: PPD (-0,86; 95% IC = 0,55 - 1,16) CAL (0,57; 95% IC = 0,56 - 0,98)</p> <p>- PPD &gt;5mm: PPD (-0,86; 95% IC = 0,55 - 1,16) CAL (0,77; 95% IC = 0,56 - 0,98)</p>

RCT : essais contrôlés randomisés ; PPD : profondeur de poche parodontale ; CAL : niveau d'attache clinique ; ATB : antibiotiques ; BOP : saignement au sondage ; PI : indice de plaque ; IC : intervalle de confiance ; SRP : débridement mécanique ; Amox : amoxicilline ; Met : métronidazole ; Azth : azithromycine ; Clari : clarithromycine ; Tetra : tétracyclines ; Doxy : doxycycline ; Min : minocycline

## INTRODUCTION

**Tableau 4.** Avantages et inconvénients de l'administration systémique et locale d'antibiotiques en parodontologie

Administration	Avantages	Inconvénients
<b>Systémique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) efficacité clinique et microbiologique à moyen terme</li> <li>(ii) éradication des espèces les plus virulentes (<i>P. gingivalis</i>, <i>A. actinomycetemcomitans</i>)</li> <li>(iii) contrôle des niches microbiennes extra - parodontales (muqueuses, joues, langue)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) nombreuses contre-indications (état physio-pathologique, allergies)</li> <li>(ii) effets secondaires nombreux et parfois graves                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- gastro-intestinaux</li> <li>- colorations dentaires</li> <li>- interactions médicamenteuses</li> <li>- réactions allergiques et hématologiques</li> <li>- tolérance hépatique</li> </ul> </li> <li>(iii) faible biodisponibilité dans les tissus</li> <li>(iv) résistances bactériennes</li> <li>(v) observance variable du patient</li> </ul>
<b>Locale</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) biodisponibilité supérieure à la voie systémique</li> <li>(ii) effets secondaires limités</li> <li>(iii) limite les problèmes d'observance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) bénéfice clinique limité</li> <li>(ii) effet limité dans les niches extra-parodontales</li> <li>(ii) mise en place et maintien sur le site</li> <li>(iii) cinétique de libération de la molécule</li> <li>(iv) risque de résistances bactériennes mal connu</li> </ul>

### **1.2.1.1.2. Administration des antibiotiques par voie locale**

L'administration locale d'antibiotiques améliore modestement la fermeture de la poche (-0,4 à -0,6mm) et le gain d'attache (0,3 mm) (55). Les molécules les plus efficaces sont la minocycline, la tetracycline et la doxycycline (63,67,69,70) (Tableau 3). Les antibiotiques locaux pourraient être indiqués chez les patients à risque (diabétiques et fumeurs) pour limiter le recours à la chirurgie (63,70) mais leur intérêt reste controversé. En France, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) déconseille leur utilisation (71). Les autres facteurs limitant leur usage sont : (i) la difficulté et le temps de mise en place, (ii) le coût élevé et (iii) la contribution potentielle aux résistances bactériennes (55). Les formes galéniques utilisées en parodontologie seront détaillées dans la suite de ce travail (cf paragraphe 3.).

### **1.2.1.1.3. Synthèse : les antibiotiques dans le traitement parodontal**

Le bénéfice à moyen terme (6 mois) des antibiotiques par voie systémique, en particulier la combinaison amoxicilline/métronidazole, en complément du débridement mécanique est établi avec un haut niveau de preuve (59,60). Les antibiotiques locaux permettent d'améliorer significativement la biodisponibilité de la molécule sur le site d'action et de limiter les effets secondaires. Cependant, leur bénéfice clinique est plus limité (63,67,69,70). Le Tableau 4 résume les principaux avantages et inconvénients des antibiotiques systémiques et locaux en complément du traitement mécanique.

### **1.2.1.2. Antiseptiques dans le traitement parodontal**

Une étude menée au Royaume-Uni montre qu'un tiers des dents présentent de la plaque visible chez plus de 70% des adultes (72). Par conséquent, le contrôle de plaque individuel est souvent insuffisant pour contrôler la gingivite en raison de sa faible qualité (73). Ces éléments justifient la mise en œuvre de moyens complémentaires pour contrôler l'accumulation du biofilm. Les antiseptiques peuvent répondre à ce besoin. Ils sont classés en trois catégories par ordre décroissant d'efficacité sur la réduction de la plaque dentaire. On distingue (i) les agents du groupe A dits anti-plaque tels que la chlorhexidine, dont l'efficacité est suffisante pour prévenir le développement de la gingivite ; (ii) les agents du groupe B tels que le chlorure de cetylpyridinium ou les huiles essentielles sont dits inhibiteurs de plaque. Leur efficacité sur la réduction de plaque et la gingivite est plus

limitée ; (iii) le groupe C comprend des molécules telles que l'hexétidine utilisées pour un usage cosmétique. Leur intérêt en thérapeutique parodontale est discutable. Cependant, l'évolution du niveau de preuve de l'efficacité de certains antiseptiques est susceptible de modifier ce classement (74). Utilisée depuis les années 1950, la chlorhexidine est la molécule antiseptique la plus courante et la mieux connue en odontologie. Son efficacité est due à un puissant effet antibactérien sur la majorité des bactéries buccales et à sa rémanence pouvant atteindre 12h dans la cavité buccale. L'activité antimicrobienne de la chlorhexidine est dose dépendante et attribuée à son caractère cationique qui entraîne des altérations de la membrane bactérienne. Cette molécule est peu absorbée dans le tube digestif et possède de ce fait un faible risque de toxicité générale (75). Une méta-analyse récente confirme les propriétés anti-plaque de la chlorhexidine et son action sur la réduction des scores cliniques d'inflammation. Tous ces arguments font de la chlorhexidine la molécule antiseptique de référence pour le contrôle chimique du biofilm dentaire (76).

#### **1.2.1.2.1. Formes topiques des antiseptiques**

En parodontologie, les antiseptiques sont notamment utilisés sous forme de bains de bouche et de solutions d'irrigation sous gingivale lors du débridement professionnel ou à domicile à l'aide d'hydropulseurs. D'autres formes telles que les gels et les dentifrices sont également fréquentes. De façon plus anecdotique, l'usage de gommes/comprimés à mâcher/sucer ou de matériels d'hygiène pré-traités est décrit (77). Les principales revues systématiques publiées ces 10 dernières années sont présentées dans le Tableau 6 (76,78–91). Elles confirment l'efficacité de la chlorhexidine et sa supériorité sur les autres molécules (76,78–81). Les huiles essentielles sont une alternative valide à la chlorhexidine et présentent des effets secondaires plus limités (82,83). Un intérêt grandissant est observé pour les produits naturels notamment les extraits de plantes mais les résultats *in vitro* et *in vivo* devront être confirmés par des études cliniques (84).

#### **1.2.1.2.2. Formes d'antiseptiques à libération contrôlée**

Utilisés en libération contrôlée, les antiseptiques permettent de limiter le recours aux antibiotiques, dont le mésusage augmente le risque de résistances bactériennes, et de réduire les coûts tout en conservant l'efficacité antimicrobienne du dispositif. Malgré ces arguments, peu de dispositifs de libération contrôlée contenant des antiseptiques sont

disponibles sur le marché. Le plus étudié est une matrice solide à base de gélatine chargée en chlorhexidine, commercialisée sous l'appellation Periochip<sup>®</sup> (cf. paragraphe 3.1.). Une méta-analyse récente de six essais contrôlés randomisés conclut avec un niveau de preuve modéré à un gain d'attache supplémentaire de 0,4 mm (95% IC = 0,24 - 0,56) en faveur du Periochip<sup>®</sup> (67). Plus récemment une forme injectable à base de gel xanthane a été commercialisée (Chlo-Site<sup>®</sup>). Les études réalisées ces 10 dernières années attribuent à ce système des effets positifs mais limités lorsqu'il est utilisé en complément du traitement mécanique (92–101). Les données cliniques et microbiologiques demeurent hétérogènes et peu robustes. D'autres systèmes de libération contrôlée chargés en chlorhexidine ou contenant d'autres antiseptiques sont décrits mais ne sont pas commercialisés (102–107).

### **1.2.1.2.3. Synthèse : les antiseptiques dans le traitement parodontal**

L'efficacité de la chlorhexidine sur la réduction de la plaque et de la gingivite ainsi que son faible coût en font la molécule antiseptique de référence en parodontologie. Utilisée sous forme de bains de bouche, elle est efficace dans la totalité de la cavité buccale avec une rémanence de plusieurs heures mais un accès limité en sous gingival. Administrée sous forme solide ou injectable dans la poche parodontale, elle montre un effet significatif et prolongé sur la réduction de la charge bactérienne du site. Aux concentrations usuelles sous forme topique (0,10 – 0,2%), les effets secondaires sont transitoires et limités à la cavité buccale. Les interactions décrites avec les composants des dentifrices ou les fluides biologiques sont susceptibles de réduire l'action antimicrobienne de la chlorhexidine. Le risque de colorations dentaires et de dysgueusie augmente avec la durée d'utilisation ( $\geq 4$  semaines). Les avantages et inconvénients de l'application topique ou de formes à libération prolongée d'antiseptiques sont résumés dans le Tableau 5.

### **1.2.2. Modulation de l'inflammation**

Le rôle clé de l'inflammation dans la destruction tissulaire du parodonte explique le recours aux agents anti-inflammatoires (AI) dans le but de moduler la réponse de l'hôte. Parmi les nombreux AI qui ont été testés en parodontologie ces dernières années seuls les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) seront développés dans la suite du propos. Les autres familles d'AI seront simplement évoquées (cf 2.2.2.).

## INTRODUCTION

**Tableau 5.** Principaux antiseptiques utilisés en parodontologie, avantages et inconvénients des formes topiques et à libération contrôlée

<b>Principaux antiseptiques utilisés en parodontologie</b>	
classe	exemples de molécules
<b>Bisguanides</b>	<i>Chlorhexidine</i>
<b>Ammoniums quaternaires</b>	<i>Chlorure de cetylpyridinium</i>
<b>Huiles essentielles</b>	<i>Thymol - eucalyptol - menthol</i>
<b>Phenols</b>	<i>Triclosan</i>
<b>Enzymes</b>	<i>Aminoglucosidase</i>
<b>Extraits naturels</b>	<i>Sanguinarine</i>
<b>Dérivés oxygénés</b>	<i>Peroxyde d'hydrogène</i>
<b>Amino alcools</b>	<i>Delmopinol</i>
<b>Iodophores</b>	<i>Povidone iodée</i>
<b>Dérivés chlorés</b>	<i>Hypochlorite de sodium</i>
<b>Autres</b>	<i>Hexétidine</i>

<b>Antiseptiques sous forme topiques</b>		<b>Antiseptiques sous formes à libération contrôlée</b>	
avantages	inconvénients	Avantages	Inconvénients
(i) efficaces dans toute la cavité orale	(i) effets secondaires (colorations dentaires, dysgueusie, brûlures et lésions muqueuses)	(i) accès direct au site d'action	(i) toxicité des composants
(ii) facilité d'usage	(ii) durée d'action faible	(ii) maintien de concentrations efficaces	(ii) difficultés de mise en place
(iii) faible coût	(iii) compliance variable	(iii) meilleure biodisponibilité	(iii) inconfort lié à la mise en place
(iv) bonne tolérance par les patients	(iv) effets des excipients	(iv) réduction des doses nécessaires	(iv) coûts de production
(v) absorption systémique négligeable	(v) effet limité en sous-gingival	(v) meilleure compliance	(v) volume limité par la taille du site
(vi) rémanence de certaines molécules	(vi) interactions avec le dentifrice	(vi) effet limité dans le reste de la bouche	(vi) dégradation par les enzymes salivaires

## INTRODUCTION

**Tableau 6.** Revues systématiques récentes ( $\leq 10$  ans) évaluant l'efficacité des antiseptiques dans le traitement parodontal

Auteurs, année {référence}	Etudes incluses	Conclusions
James P <i>et al.</i> , 2017 {78}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 51 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 4 -6 semaines et 6 mois</p> <p><b>population étudiée:</b> gingivite débutante, modérée ou légère selon le GI de Löe</p> <p><b>groupe test:</b> brossage dentaire/interdentaire + CHX-Bdb pendant au moins 4 semaines</p> <p><b>groupe contrôle:</b> brossage dentaire/interdentaire (+/- placebo)</p>	<p>chez les patients souffrant de gingivite légère (GI moyen = 1) les CHX-Bdb sont plus efficaces que le brossage pour réduire l'inflammation (GI: -0,21; 95% IC = -0,11 à - 0,31) et la plaque dentaire (PI: -1.45; 95% IC -1.00 à -1.90) à 4, 6 semaines et 6 mois</p>
Van der Sluijs <i>et al.</i> , 2016 {85}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 14 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 2 semaines à 13 ans</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite</p> <p><b>groupe test:</b> débridement US + irrigation antiseptique (CHX, PVP, HE)</p> <p><b>groupe contrôle:</b> débridement US + irrigation H2O, serum physiologique ou placebo</p>	<p>l'irrigation sous gingivale à l'aide d'antiseptiques pendant le débridement n'apporte pas de bénéfice supplémentaire. l'analyse en sous-groupe montre un léger bénéfice pour la PVP en terme de gain d'attache (CAL 0,23; 95%IC: 0.43 - 0.02)</p>
Karygianni <i>et al.</i> , 2016 {84}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 14 études <i>in-vivo</i>, <i>in-situ</i> et <i>ex-vivo</i></p> <p><b>durée de suivi:</b> -</p> <p><b>population étudiée:</b> -</p> <p><b>groupe test:</b> extraits végétaux (sauf HE et composés purifiés)</p> <p><b>groupe contrôle:</b> -</p>	<p>certains extraits végétaux (<i>Vitis vinifera</i>, <i>Pinus spp.</i>, <i>Coffea canephora</i>, <i>Camellia sinensis</i>, <i>Vaccinium macrocarpon</i>, <i>Galla chinensis</i>, <i>Caesalpinia ferrea Martius</i>, <i>Psidium cattleianum</i>, miel de manuka ) sont efficaces <i>in-vitro</i> , <i>ex-vivo</i> et <i>in-situ</i> sur des biofilms oraux multi-espèces (au moins 2 espèces bactériennes)</p>
Eberhard <i>et al.</i> , 2015 {86}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 12 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 3 mois minimum</p> <p><b>population étudiée:</b> adultes (&gt;18 ans) atteints de parodontite chronique</p> <p><b>groupe test:</b> FMS ou FMD (= FMS + antiseptique)</p> <p><b>groupe contrôle:</b> DSR conventionnel</p>	<p>il n'y a pas de différence cliniquement significative entre les 3 types de traitement</p>
Slot <i>et al.</i> , 2014 {79}	<p><b>nombre et type d'études:</b> 11 RCTs</p> <p><b>durée de suivi:</b> 4 semaines à 2 ans</p> <p><b>population étudiée:</b> patients &gt; 16 ans atteints de gingivite</p> <p><b>groupe test:</b> gels ou dentifrices à base de CHX pendant au moins 4 semaines</p> <p><b>groupe contrôle:</b> dentifrices ou gels placebo</p>	<p>les dentifrices à base de CHX améliorent la réduction de la plaque et de l'inflammation</p>

## INTRODUCTION

---

Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2014 {83}	<b>nombre et type d'études:</b> 5 RCTs <b>durée de suivi:</b> 3 semaines à 6 mois <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de gingivite <b>groupe test:</b> Brossage + Bdb HE <b>groupe contrôle:</b> brossage + Bdb à l'eau ou avec une solution alcoolisée	les bains de bouche à base d'HE améliorent le contrôle de plaque et la réduction de l'inflammation gingivale (PI -0,39; 95% IC = -0.30 à -0.47),(GI -0,36; 95% IC = -0.26 à -0,62)
Riley & Lamont 2013 {87}	<b>nombre et type d'études:</b> 30 RCTs <b>durée de suivi:</b> 6 mois minimum <b>population étudiée:</b> population générale <b>groupe test:</b> brossage un dentifrice fluoré contenant du TIs-C <b>groupe contrôle:</b> brossage avec un dentifrice fluoré	Après 6 - 7 mois d'utilisation les dentifrices contenant du TIs-C améliorent le contrôle de plaque (PI -22%) et la réduction de l'inflammation gingivale (-22%) le saignement gingival (BOP -48%) par rapport à un dentifrice fluoré
Van Strydonck <i>et al.</i> , 2012 {76}	<b>nombre et type d'études:</b> 30 RCTs <b>durée de suivi:</b> 4 semaines à 6 mois <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de gingivite <b>groupe test:</b> CHX-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage <b>groupe contrôle:</b> brossage seul ou avec Bdb placebo	la CHX-Bdb permet une réduction de plaque et de l'inflammation supérieure au groupe contrôle (PI -33%, GI - 26%)
Van Leeuwen <i>et al.</i> , 2011 {82}	<b>nombre et type d'études:</b> 19 RCTs <b>durée de suivi:</b> 1 jour à 6 mois <b>population étudiée:</b> patients > 16 ans atteints de gingivite <b>groupe test:</b> HE-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage <b>groupe contrôle:</b> CHX-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage	sur une période de suivi de 4 semaines minimum la CHX-Bdb est plus efficace que HE-Bdb pour la réduction de la plaque dentaire (PI -0,19). Il n'y a pas de différence pour la réduction de l'inflammation gingivale
Affenich <i>et al.</i> , 2011 {80}	<b>nombre et type d'études:</b> 6 RCTs <b>durée de suivi:</b> 4 jours à 6 semaines <b>population étudiée:</b> patients > 16 ans atteints de gingivite <b>groupe test:</b> Hxt-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage <b>groupe contrôle:</b> CHX-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage ou placebo	Hxt-Bdb sont plus efficaces qu'un placebo mais moins efficaces que CHX-Bdb ils ne peuvent pas être considérés comme une alternative à la CHX

---



## INTRODUCTION

Hossainian <i>et al.</i> , 2011 {81}	<b>nombre et type d'études:</b> 10 RCTs <b>durée de suivi:</b> 3 jours à 6 mois <b>population étudiée:</b> patients > 16 ans atteints de gingivite <b>groupe test:</b> H2O2-Bdb seul ou en combinaison avec le brossage <b>groupe contrôle:</b> BdB contrôle positif ou négatif, seul ou combiné au brossage	utilisés seuls, les H2O2-Bdb n'ont pas d'effet sur la plaque dentaire. Au long cours H2O2-Bdb pourrait avoir un effet sur l'inflammation gingivale
Sahrman <i>et al.</i> , 2010 {88}	<b>nombre et type d'études:</b> 7 RCTs <b>durée de suivi:</b> 5 semaine à 12 mois <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de parodontite chronique <b>groupe test:</b> SRP + irrigation PVP <b>groupe contrôle:</b> SRP + irrigation eau/serum physiologique ou SRP seul	utilisée comme solution d'irrigation, la PVP pourrait améliorer la réduction de poche (PPD -0,28 95% IC = -0,08 à -0,48)
Haps <i>et al.</i> , 2008 {89}	<b>nombre et type d'études:</b> 8 RCTs <b>durée de suivi:</b> 4 semaines à 6 mois <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de gingivite <b>groupe test:</b> brossage + CPC-BdB <b>groupe contrôle:</b> brossage seul ou Brossage + placebo	les CPC-Bdb auraient un effet positif mais faible sur la réduction de la plaque et de l'inflammation gingivale
Husseini <i>et al.</i> , 2008 {90}	<b>nombre et type d'études:</b> 7 RCTs <b>durée de suivi:</b> 2 à 7 mois <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de gingivite <b>groupe test:</b> brossage + hydropulseur <b>groupe contrôle:</b> brossage seul	l'hydropulseur n'a pas d'effet sur la réduction de la plaque dentaire mais pourrait avoir un effet sur l'indice gingival
Lang <i>et al.</i> 2008 {91}	<b>nombre et type d'études:</b> 12 RCTs <b>durée de suivi:</b> 6 mois minimum <b>population étudiée:</b> adultes (>18 ans) atteints de parodontite chronique <b>groupe test:</b> FMS ou FMD (= FMS + antiseptique) <b>groupe contrôle:</b> DSR conventionnel par quadrant	il n'y a pas de différence cliniquement significative entre les 3 types de traitement

RCT : essais contrôlés randomisés ; Bdb : bains de bouche ; CHX : chlorhexidine ; GI : indice gingival ; US : ultrasons ; H<sub>2</sub>O : eau, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène ; TIs : triclosan ; HE : huiles essentielles ; PVP : povidone iodée ; CPC : chlorure de cetylpyridinium, CAL : niveau d'attache clinique ; BOP : saignement au sondage ; PI : indice de plaque ; IC : intervalle de confiance ; SRP : débridement mécanique ; FMS : débridement complet en une seule séance ; FMD : FMS + antiseptiques ; DSR : débridement par quadrant en plusieurs séances

### **1.2.2.1. Intérêt des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans le traitement parodontal**

Les AINS sont parmi les molécules les plus prescrites au monde. Leur efficacité dans la réduction de l'inflammation résulte de l'inhibition sélective ou non qu'elles exercent sur les isoformes COX-1 et COX-2 de la cyclooxygénase (COX). Ces enzymes constitutives sont en grande partie responsables de la production des prostaglandines (PGs), notamment la prostaglandine E2 (PGE2) impliquée dans l'initiation de la réponse inflammatoire en général et de l'inflammation parodontale en particulier. L'utilisation des AINS a été proposée pour limiter la destruction parodontale et a fait l'objet de nombreuses études (7).

#### **1.2.2.1.1. Les AINS par voie systémique pour le traitement parodontal**

La preuve initiale de l'intérêt potentiel des AINS systémiques en parodontologie est issue d'études épidémiologiques qui montrent un effet protecteur vis-à-vis de la maladie parodontale chez les patients sous AINS au long cours pour raisons médicales (7,108–112). Cependant, le bénéfice clinique au niveau parodontal est très variable et n'apparaît qu'au bout de plusieurs années de traitement. Les études interventionnelles montrent un effet des AINS non sélectifs tels que l'ibuprofène, administrés par voie systémique, sur la réduction du niveau crévicaire des marqueurs inflammatoires mais aucun bénéfice clinique n'est retrouvé. Utilisés au long cours (> 6 semaines), les inhibiteurs sélectifs de COX-2, notamment les coxibs, pourraient avoir un effet sur les paramètres cliniques et biologiques parodontaux en particulier chez les fumeurs. Quelques travaux évaluent la combinaison de plusieurs molécules anti-inflammatoires dont des AINS dans le traitement parodontal (113–118) mais le faible niveau de preuve ne permet pas de valider une telle approche.

Des effets secondaires nombreux voire graves sont associés à l'usage au long cours des AINS. Les plus fréquemment rapportés sont les ulcères gastroduodénaux retrouvés chez 15 à 30% des patients sous AINS au long cours (119). Les autres effets délétères des AINS sont leur néphro-toxicité et leur cardio-toxicité qui ont abouti au retrait de certaines molécules du marché (120,121). En résumé le rapport bénéfice-risque défavorable ne permet pas de recommander à ce jour l'administration systémique d'AINS dans le traitement parodontal.

### **1.2.2.1.2. Les AINS par voie locale pour le traitement parodontal**

Compte tenu de l'implication des prostaglandines notamment la PGE2 dans la pathogénèse de la maladie parodontale, de très nombreuses études ont évalué les AINS sous forme topique dans le traitement parodontal (7,118). Les modèles de parodontite expérimentale chez l'animal (rongeurs, chiens, primates) montrent que l'application locale d'AINS prévient l'apparition des lésions parodontales et/ou limite leur progression (122). Les études les plus récentes (publiées depuis 2000) sont résumées dans le Tableau 7 (123–126).

### **1.2.2.1.3. Synthèse : les AINS dans le traitement parodontal**

L'inhibition sélective ou non de COX-1 et COX-2 réduit les signes cliniques et biologiques de l'inflammation parodontale chez l'animal et chez l'Homme. Cependant, l'inhibition sélective de COX-2 semble avoir un effet protecteur plus important sur la perte osseuse. La combinaison de plusieurs agents anti-inflammatoires par exemple l'association des AINS avec les acides gras oméga-3 semble montrer un effet synergique sur l'action de ces molécules. L'application locale d'AINS procure un bénéfice similaire et une meilleure sécurité d'utilisation que la voie systémique (108). Ces données sont cohérentes avec la longue expérience de l'application locale des AINS dans les pathologies articulaires inflammatoires et soutiennent la préférence pour la voie locale en parodontologie. D'autres molécules aux propriétés anti inflammatoires sont également à l'étude et devront permettre l'émergence de nouveaux traitements.

### **1.2.2.2. Autres molécules anti-inflammatoires et immuno-modulatrices en parodontologie**

Les revues systématiques fréquentes consacrées à la modulation de l'inflammation parodontale témoignent de l'intérêt et du dynamisme de la recherche dans le domaine (6,7,110,111,127). Compte tenu du grand nombre de molécules étudiées, la liste ci-dessous ne saurait être exhaustive :

- Les corticoïdes et immunosuppresseurs : le rationnel de leur utilisation repose sur des études observationnelles chez des patients traités pour raison médicale notamment en rhumatologie. Le bénéfice parodontal est très discutable et les effets secondaires nombreux et graves. Leur usage ne peut être recommandé à des fins parodontales (7).

- Les inhibiteurs des métallo-protéases matricielles (MMPs): à doses sous antimicrobienne (20mg 2 fois/jour pendant 12 semaines) la doxycycline présente un effet anti-inflammatoire par inhibition de la MMP-8 notamment. Le bénéfice clinique est statistiquement significatif et bien documenté. Cependant, le risque de développement de résistances bactériennes est mal connu (7).
- Biothérapies : utilisées dans le traitement de maladies auto-immunes, elles auraient un effet protecteur sur le parodonte. Une étude récente montre l'effet positif d'anti-lymphocyte-B (Rituximab) sur l'état parodontal de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde suggérant un rôle des cellules B dans l'inflammation parodontale (128).
- Les résolvines et leurs dérivés : les effets anti-inflammatoires de ces dérivés de lipides (acides gras omega-3) ont fait l'objet d'un grand intérêt ces dernières années. Ils seraient impliqués dans la résolution de l'inflammation, un processus actif et naturel de contrôle de l'inflammation par opposition aux mécanismes d'inhibition des anti-inflammatoires. Une revue systématique récente montre des résultats cliniques prometteurs malgré le manque de robustesse des données disponibles (129).
- Les anti-résorbeurs osseux : les bisphosphonates et les inhibiteurs de RANK-ligand ont été proposés pour limiter la destruction osseuse parodontale. Cependant, le risque d'ostéonécrose associé à leur administration systémique a freiné leur étude. L'administration par voie locale pourrait permettre de contourner cet obstacle (130).
- Les statines : des études expérimentales ont montré que ces molécules largement prescrites pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes présentaient un effet anti-résorbeur osseux en particulier par voie locale. Une méta-analyse récente d'essais contrôlés randomisés confirme l'effet positif de l'application locale de statines comme adjuvant au débridement mécanique sur le gain d'attache et le gain osseux (131).
- Les extraits végétaux : de nombreux extraits végétaux sont potentiellement intéressants en parodontologie de par leurs propriétés anti-inflammatoires. De plus, certains d'entre eux possèdent à la fois des propriétés antiseptiques et anti-inflammatoires. Cependant, leur efficacité et la sécurité de leur usage doivent encore être confirmées (132).

## INTRODUCTION

**Tableau 7.** Etudes animales récentes (publiées depuis 2000) sur l'application locale d'AINS dans le traitement parodontal

Auteurs, année {référence}	Protocole expérimental	Résultats
Queiroz-Junior <i>et al.</i> , 2009 {123}	<b>Description du modèle:</b> induction par ligature chez le rat <b>Critères étudiés:</b> mesures histomorphométriques + comptage cellulaire <b>AINS testés:</b> inhibiteurs sélectifs ou non de COX-1 et COX-2 par voie locale et systémique (indométacine, celecoxib, SC236, SC560) <b>Durée du suivi:</b> 11 jours	l'administration locale et systémique des inhibiteurs sélectifs et non sélectifs de COX-2 réduit significativement la perte d'attache, la perte osseuse et le comptage de cellules inflammatoires dans les tissus. L'inhibition sélective de COX-1 réduit également la perte d'attache et l'infiltrat inflammatoire mais ne prévient pas la perte osseuse
Vardar-sengul <i>et al.</i> , 2008 {124}	<b>Description du modèle:</b> induction par injection de LPS de <i>E. coli</i> chez le rat <b>Critères étudiés:</b> analyse histomorphométrique + immunohistochimie <b>AINS testés:</b> celecoxib +/- acides gras oméga-3 par gavage <b>Durée du suivi:</b> 15 jours	l'inhibition sélective de COX-2, l'administration prophylactique d'acides gras omega 3 et la combinaison de ces 2 agents inhibent l'expression de MMP-8 dans les tissus. L'application thérapeutique d'acides gras omega-3 seul augmente l'expression de TIMP-1
Vardar-sengul <i>et al.</i> , 2006 {125}	<b>Description du modèle:</b> induction par injection de LPS de <i>E. coli</i> chez le rat <b>Critères étudiés:</b> analyse histomorphométrique + dosage par ELISA <b>AINS testés:</b> Celecoxib +/- acides gras oméga-3 par gavage <b>Durée du suivi:</b> 14 jours	l'inhibition sélective de COX-2, l'administration d'acides gras omega 3 et leur combinaison augmentent le niveau sérique d'ostéocalcine
Vardar <i>et al.</i> , 2005 {126}	<b>Description du modèle:</b> induction par injection de LPS de <i>E. coli</i> chez le rat <b>Critères étudiés:</b> analyse histomorphométrique + dosage immunoenzymatique <b>AINS testés:</b> celecoxib +/- acides gras oméga-3 par gavage <b>Durée du suivi:</b> 15 jours	l'administration combinée d'inhibiteurs sélectifs de COX-2 et d'acides gras omega 3 montre un effet synergique sur la réduction de PGE2, PGF2-alpha, PAF et LTB4 dans les tissus

LPS : lipopolysaccharide ; COX : cyclo-oxygénase ; E. coli : *Escherichia coli* ; SC236 : 4-[5-(4-chlorophenyl)-3-(trifluorométhyl)-1H-pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide ; PGE2 : prostaglandine E2 ; SC560 : [5-(4-chlorophenyl)-1-(4-méthoxyphényl)-3-trifluorométhyl pyrazole] ; MMP : métalloprotéases matricielles ; TIMP-1 : inhibiteur de la métalloprotéase 1 ; LTB4 : leucotriène B4 ; PGF2-alpha : prostaglandine F 2 alpha ; PAF : facteur d'activation des plaquettes

### 1.3. Evolution des systèmes de libération contrôlée pour le traitement des parodontites

Le traitement médicamenteux repose fondamentalement sur le choix de la molécule thérapeutique la plus adaptée. Cependant, de nombreux principes actifs aux propriétés pharmacologiques avérées échouent en pratique clinique. La libération contrôlée a pour but d'améliorer l'efficacité clinique de ces molécules en contrôlant différents paramètres clés qui contribuent à l'efficacité finale à savoir : (i) le site d'action, (ii) le temps d'exposition, (iii) la dose délivrée et (iv) la cinétique de libération (133). De ce fait, la libération contrôlée contribue à limiter les effets secondaires des traitements et l'impact négatif du manque d'observance des patients. Les applications des systèmes de libération contrôlée sont nombreuses en médecine en général et en parodontologie en particulier. En effet, la poche parodontale peut servir de réservoir naturel pour la libération prolongée et *in-situ* de doses efficaces de principes actifs. Les dispositifs disponibles varient selon (i) le type (réservoir ou matrice monolithique), (ii) la forme (solide ou semi-solide, adhésive ou non) (iii) la molécule utilisée (antibiotique ou non), (iv) le mode d'application (injectable ou non) et (v) la résorbabilité (134). Les formes sont nombreuses et comprennent notamment des fibres, films, ciments, strips, inserts, microsphères, microcapsules microparticules et gels (Tableau 8)(135).

- Fibres : ce sont historiquement les premiers dispositifs décrits en parodontologie. D'abord proposés sous la forme de systèmes réservoirs (fibres « creuses »), ils ont évolué vers des matrices à base de polymères chargées en tétracycline (Actisite<sup>®</sup>) (136). Les inconvénients que sont la difficulté de mise en place, l'irritation sur le site et la nécessité d'un deuxième temps opératoire pour la dépose expliquent leur retrait du marché.
- Films, strips ou inserts : ce sont des matrices solides plus ou moins fines, résorbables ou non, dans lesquelles le principe actif est dispersé. La libération s'effectue par diffusion, érosion ou dissolution. Elles servent de support à des antibiotiques (tétracycline, métronidazole) ou des antiseptiques. Le système le plus connu est une matrice à base de gélatine chargée en chlorhexidine (Periochip<sup>®</sup>). D'autres modèles en cellulose ou en PLGA ont été proposés (138,139). Ils restent peu pratiques à mettre en place et ont un maintien aléatoire dans la poche parodontale (137).

- Formes injectables : à base d'hydrogels ou d'oléogels (Elyzol<sup>®</sup>), elles sont faciles à appliquer et s'adaptent parfaitement à l'anatomie du site. Cependant, la libération des principes actifs est plus rapide qu'avec les autres systèmes et le système est rapidement éliminé de la poche (134).
- Microparticules : le principe est basé sur la micro encapsulation du principe actif par un polymère. Les microparticules sont résorbables et peuvent être injectées facilement dans la poche parodontale où, au contact du fluide gingival, elles libèrent le principe actif (Arestin<sup>®</sup>). La micro encapsulation améliore la stabilité du principe actif et peut permettre un meilleur contrôle de la cinétique de libération (134).
- Liposomes : conçus pour mimer la structure et le comportement biologique de la membrane cellulaire, ils pourraient servir de véhicules pour la libération ciblée au niveau du biofilm. Ils pourraient également apporter une réponse à la toxicité possible des polymères synthétiques et de leurs produits de dégradation (137).
- Nanoparticules : elles font l'objet de recherches actives et pourraient avoir un potentiel important notamment en régénération parodontale (140–143). Certaines possèdent également des propriétés antimicrobiennes. Cependant, la toxicité possible des nanoparticules dont la petite taille permet la dissémination systémique reste mal connue (140).

Compte tenu des spécificités du site parodontal, le système optimal doit répondre au cahier des charges suivant :

- facilité de mise en place et rétention sur le site ;
- biocompatibilité et résorbabilité ;
- libération prolongée à des concentrations efficaces ;
- facilité de production et coût limité.

Les systèmes actuellement disponibles sur le marché ne répondent que partiellement à ces attentes. Leur inconvénient majeur est le manque d'adhésion aux parois de la poche parodontale qui explique un temps de résidence trop court sur le site. Par ailleurs, peu de systèmes contenant des antiseptiques sont aujourd'hui commercialisés. Les implants formés *in-situ* pourraient pallier ces insuffisances.

## INTRODUCTION

**Tableau 8.** Exemples de dispositifs de libération contrôlée sur le marché pour le traitement des poches parodontales. *Adapté d'après Do, MP 2014 (135)*

Forme	Composition			Cinétique de libération		Résorbabilité	Nom commercial
	principe actif	dose (w/w)	véhicule	libération à 24h <i>in vitro</i>	durée de libération		
fibres	Tetracycline HCl	25%	Ethylene vinyl acetate	n.a	9 j	Non	Actisite® (Alza Corporation, Palo Alto, CA, USA)
Inserts	Chlorhexidine gluconate	34%	Gélatine hydrolysée/ glutaraldehyde	40%	7 - 10 j	Oui	Periochip® (Dexcel Pharma, Northampton, UK)
Gels	Metronidazole benzoate	25%	Glycerilmono-oleate + huile de sésame	n.a	n.a	Oui	Elyzol® (Dumex-Alpha, Copenhagen, Denmark)
	Minocycline HCl	2%	HEC + aminoalkyl+ triacetine + MgCl <sub>2</sub> + glycerin	n.a	n.a	Oui	Dentomycin® (Blackwell -Supplies, Kent, UK) Parocline® (Sunstar, Levallois-Perret, France) Periocline® (Sunstar, Osaka, Japan)
Implants in-situ	Doxycycline hyclate	10%	NMP (63.3 %)+ PLA (36.7 %)	n.a	7 j	Oui	Atridox® (TOLMAR Inc., Fort Colin, CO, USA)
micro-sphères	Minocycline HCl	2%	n.a	n.a	14 j	Oui	Arestin® (OraPharma, Horsham, PA, USA)

Hcl : hyclate ; n.a : non disponible ; j : jours ; HEC : hydroxyethylcellulose; MgCl<sub>2</sub> : magnesium chloride; NMP = N-methyl pyrrolidone; PLA : poly(L-lactide-co-D/L-lactide)

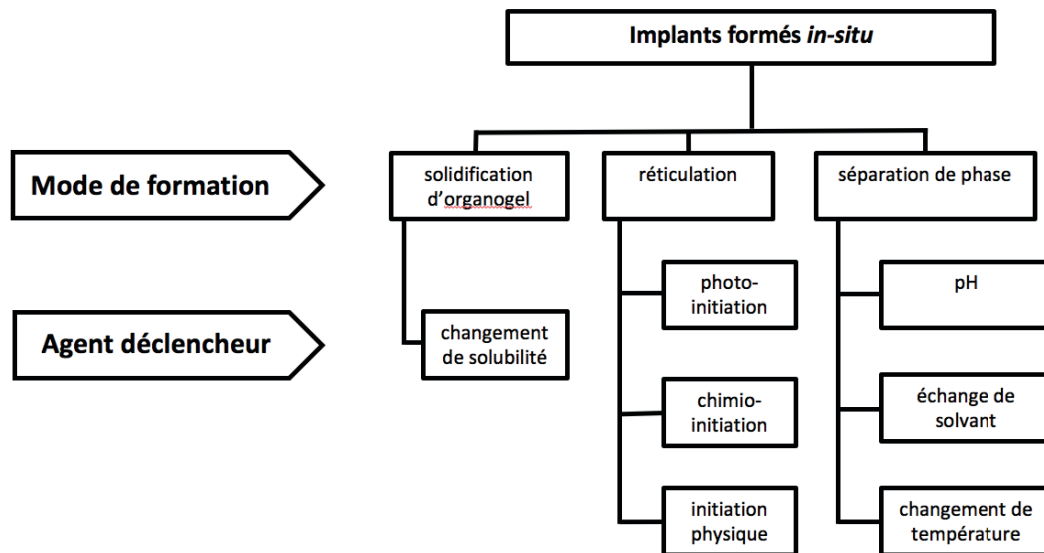


## 2. Présentation du dispositif étudié : implants se formant *in-situ*

### 2.1. Principe de fonctionnement

Les implants formés *in-situ* (IFIS) sont des formulations administrées sous forme liquide par voie parentérale qui ont la capacité de former des dépôts solides ou semi-solides au niveau du site d'administration (144). Mis au point dans les années 1980 pour l'administration locale d'antimicrobiens en parodontologie (145), les IFIS ont suscité un grand intérêt et trouvé de nombreuses applications en ophtalmologie, en oncologie et en ingénierie tissulaire (146). Les raisons de ce succès viennent tout d'abord du besoin de développer des formes parentérales pour les molécules de plus en plus nombreuses qui ne peuvent être administrées par voie orale en raison de leur toxicité ou de leur moindre efficacité. Les IFIS ont également l'avantage de permettre la libération prolongée de principes actifs et d'éviter une administration répétée, potentiellement traumatique. Par rapport aux autres formes locales utilisées en parodontologie telles que les microparticules et les matrices solides, l'administration des IFIS est simple, rapide peu invasive et leur fabrication peu coûteuse (144,146). De plus, la transition de la phase liquide à la phase solide permet la formation d'un dépôt parfaitement adapté à l'anatomie du site et rétentif. On distingue trois grandes familles d'IFIS en fonction du mécanisme de formation de l'implant (146) : (i) la réticulation, (ii) la solidification d'organogel et (iii) la séparation de phase. Parmi les IFIS formés par séparation de phase, ceux auxquels nous ferons référence dans la suite de ce travail sont obtenus par échange de solvant. Inventé par Dunn *et al.*, (145) le principe de ces IFIS consiste à dissoudre un principe actif et un polymère biodégradable dans un solvant commun. Le mélange, à l'état liquide, est facilement déposé à l'aide d'une seringue dans la poche parodontale. Au contact des fluides biologiques, la diffusion du solvant entraîne la précipitation du polymère (qui est non soluble dans l'eau) et emprisonne le principe actif qui sera progressivement libéré par diffusion à travers les pores aqueux et par érosion lors de la dégradation de l'implant. Du fait de la biodégradabilité du polymère, le retrait du dispositif est inutile. Cette technologie est déjà utilisée pour deux systèmes de libération contrôlée disponibles sur le marché dont un en parodontologie, commercialisé sous le nom d'Atridox®. Ce dernier est à base d'acide poly(D,L-lactide) (PLA) et contient 10% d'hyclate de Doxycycline. Une fois injecté dans la poche parodontale il permet la libération du principe actif pendant une durée de 7 jours (147).

**Fig 3.** Classification des implants formés *in-situ*, Adapté d'après Kempe et al. 2012 (146)



## 2.2. Composition du dispositif étudié

La formulation de l'IFIS à l'étude est basée sur les résultats de travaux précédents réalisés au sein du laboratoire (135,147–149). Les composants sont le solvant, les polymères, les principes actifs et un plastifiant.

### 2.2.1. Les polymères

Les polymères hydrophobes sont capables de former la matrice de l'implant par précipitation en milieu aqueux, c'est le cas dans la poche parodontale au contact du fluide gingival (135). Le dispositif à l'étude contient une combinaison de deux polymères :

- L'acide Poly(D,L-lactique-co-glycolique) (PLGA) (CAS No. 26780-50-7) de haut poids moléculaire a été choisi pour ses propriétés physico-chimiques, son excellente biocompatibilité et sa vitesse de dégradation lente. Utilisé depuis longtemps en médecine, il entre dans la composition des sutures résorbables et de matériels implantables en orthopédie. Sa dégradation par hydrolyse produit deux monomères non-toxiques, l'acide glycolique et l'acide lactique, naturellement présents dans l'organisme où ils sont excrétés par voie urinaire ou convertis en bout de chaîne en dioxyde de carbone et en eau. Le PLGA est considéré à ce jour comme le matériau le mieux caractérisé et le plus performant pour

les systèmes à libération contrôlée (150,151). Par ailleurs, sa capacité à contrôler la libération de principes actifs est très largement étudiée (152).

- L'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC) (CAS No. 9004-65-3) a été choisi en raison de ses propriétés muco-adhésives. En effet, la bonne adhésion aux parois du site conditionne le temps de résidence dans la poche parodontale et, *in fine*, l'efficacité clinique (153,154). L'HPMC est un polymère hydrophile déjà utilisé dans les systèmes à libération contrôlée pour la cavité orale (155). Des travaux précédents du laboratoire ont montré que l'addition d'HPMC améliorerait significativement les propriétés adhésives des IFIS à base de PLGA (147).

### **2.2.2. Le solvant**

Le solvant doit présenter en plus de sa capacité à dissoudre le PLGA une faible toxicité et une bonne miscibilité dans l'eau pour faciliter l'échange de solvants et la formation de l'implant. Parmi les solvants répondant à ces conditions, le N-méthyl pyrrolidone (NMP) (CAS No. 872-50-4) a été retenu. Il s'agit d'un des solvants organiques les plus utilisés pour dissoudre les polymères. Il est peu volatil, peu inflammable et utilisé dans un produit similaire déjà commercialisé (Atridox<sup>®</sup>). La toxicité du NMP est relativement faible. Il est classé irritant potentiel et reprotoxique par l'agence européenne des produits chimiques.

### **2.2.3. Les principes actifs**

Notre système contient à la fois un antiseptique, la chlorhexidine et un anti-inflammatoire non stéroïdien l'ibuprofène. La combinaison de deux principes actifs de nature différente au sein d'un même système de libération contrôlée n'a encore jamais été étudiée. Le choix de ces molécules est basé sur le rationnel discuté ci-dessus (cf. paragraphe 1.2.1.2 et 1.2.2.1).

### **2.2.4. Le plastifiant**

Les plastifiants sont utilisés pour améliorer les propriétés mécaniques de formulations à base de polymères notamment leur flexibilité et la facilité de manipulation (156,157). L'acetyltributyl citrate (ATBC) (CAS No. 77-90-7) est un plastifiant non soluble dans l'eau très utilisé dans l'industrie pharmaceutique, cosmétique et agroalimentaire pour sa performance, son absence d'odeur, de toxicité et son faible coût (158). D'après les résultats de travaux précédents, l'addition de 10% d'ATBC améliore significativement la plasticité des

IFIS à base de PLGA et leurs propriétés adhésives, sans altérer l'activité antimicrobienne (147).

### 3. Problématique et objectifs de l'étude

Compte tenu de la dualité inflammatoire et infectieuse des maladies parodontales, l'administration concomitante d'antimicrobiens et d'anti-inflammatoires semble prometteuse. Il est surprenant de constater que cette piste n'est que peu explorée. Les produits à « action duale » reconnus sont des antibiotiques (doxycycline et azithromycine) qui possèdent des effets immuno-modulateurs. A notre connaissance, la combinaison dans un même système à application locale d'un antiseptique et d'un anti-inflammatoire n'a jamais été décrite.

La chlorhexidine et l'ibuprofène sont deux molécules éprouvées, bénéficiant d'un long recul. Leur usage en parodontologie repose sur un rationnel scientifique robuste et leur application locale montre un rapport bénéfice/risque favorable. Cependant, dans la cavité buccale et plus particulièrement la poche parodontale, le turn-over cellulaire élevé et le lavage constant par les fluides biologiques favorisent l'élimination rapide des principes actifs. Des travaux précédents montrent que les IFIS à base de polymères (PLGA-HPMC) sont une piste prometteuse pour la libération contrôlée de principes actifs (PA) dans la poche parodontale et pourraient améliorer le temps de résidence du dispositif sur le site d'action (147–149).

Les principaux objectifs de ce travail sont :

- (i) Préparer et évaluer *in vitro* les propriétés mécaniques notamment d'adhésion de différents IFIS aux surfaces dentaires ;
- (ii) Evaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne des IFIS sur des bactéries isolées à partir de prélèvements cliniques de poches parodontales ;
- (iii) Evaluer *in vivo* l'effet de l'administration de l'IFIS sur la cicatrisation parodontale à l'aide d'un modèle de parodontite expérimentale chez la souris.

## Références

1. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental gingivitis in man. *J Periodontol.* 1965;36:177-87.
2. Theilade E, Wright WH, Jensen SB, Löe H. Experimental gingivitis in man. II. A longitudinal clinical and bacteriological investigation. *J Periodontol Res.* 1966;1:1-13.
3. Löe H. Principles of aetiology and pathogenesis governing the treatment of periodontal disease. *Int Dent J.* 1983;33(2):119-26.
4. Löe H, Anerud A, Boysen H, Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J Clin Periodontol.* 1986;13(5):431-45.
5. Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol.* 1981;8(4):359-67.
6. Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. *Unlearning learned concepts. Periodontol 2000.* 2013;62(1):203-17.
7. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):131-49.
8. Cho MI, Garant PR. Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000.* 2000;24:9-27.
9. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45 Suppl 20:S68-77.
10. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet Lond Engl.* 19 2005;366(9499):1809-20.
11. Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1 1984;11(1):21-32.
12. Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000.* 2017;75(1):45-51.
13. G Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, S Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S1-8.
14. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol.* 2017;44(5):456-62.

15. Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond Engl.* 2012;380(9859):2197-223.
16. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013;92(7):592-7.
17. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res.* 2014;93(11):1045-53.
18. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res.* 2014;93(7 Suppl):20S-28S.
19. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J Dent Res.* 2015;94(10):1355-61.
20. Jin LJ, Armitage GC, Klinge B, Lang NP, Tonetti M, Williams RC. Global oral health inequalities: task group--periodontal disease. *Adv Dent Res.* 2011;23(2):221-6.
21. Bourgeois D, Bouchard P, Mattout C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodontol Res.* 2007;42(3):219-27.
22. Sheiham A, Netuveli GS. Periodontal diseases in Europe. *Periodontol* 2000. 2002;29:104-21.
23. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ, CDC Periodontal Disease Surveillance workgroup: James Beck (University of North Carolina, Chapel Hill, USA), Gordon Douglass (Past President, American Academy of Periodontology), Roy Page (University of Washin. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res.* 2012;91(10):914-20.
24. Monsarrat P, Blaizot A, Kémoun P, Ravaud P, Nabet C, Sixou M, et al. Clinical research activity in periodontal medicine: a systematic mapping of trial registers. *J Clin Periodontol.* 2016;43(5):390-400.
25. Chapple ILC, Genco R, working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol.* 2013;84(4 Suppl):S106-112.
26. Genco RJ, Van Dyke TE. Prevention: Reducing the risk of CVD in patients with periodontitis. *Nat Rev Cardiol.* 2010;7(9):479-80.
27. Kobschull M, Demmer RT, Papananou PN. « Gum bug, leave my heart alone! »--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res.* 2010;89(9):879-902.

28. Tonetti MS, Van Dyke TE, Working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Clin Periodontol.* 2013;40 Suppl 14:S24-29.
29. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol.* 2010;6(12):727-30.
30. Potempa J, Mydel P, Koziel J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(10):606-20.
31. Han YW, Wang X. Mobile microbiome: oral bacteria in extra-oral infections and inflammation. *J Dent Res.* 2013;92(6):485-91.
32. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(1):30-44.
33. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013;45(4):450-5, 455e1.
34. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol.* 1994;65(3):260-7.
35. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
36. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science.* 1988;239(4835):55-7.
37. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(6):469-77.
38. Cutler CW, Kalmar JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.* 1995;3(2):45-51.
39. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR.* 1998;62(4):1244-63.
40. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the « red complex », a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005;38:72-122.
41. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(6):409-19.

42. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481-90.
43. h PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol Read Engl.* 2003;149(Pt 2):279-94.
44. Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, et al. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal.* 16 2010;3(109):ra11.
45. Liang S, Krauss JL, Domon H, McIntosh ML, Hosur KB, Qu H, et al. The C5a receptor impairs IL-12-dependent clearance of *Porphyromonas gingivalis* and is required for induction of periodontal bone loss. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 2011;186(2):869-77.
46. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskin MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 17 2011;10(5):497-506.
47. Hajishengallis G. Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol.* 2014;35(1):3-11.
48. Trombelli L, Tatakis DN, Scapoli C, Bottega S, Orlandini E, Tosi M. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. II. Identification of « high-responder » and « low-responder » subjects. *J Clin Periodontol.* 2004;31(4):239-52.
49. Divaris K, Monda KL, North KE, Olshan AF, Reynolds LM, Hsueh W-C, et al. Exploring the genetic basis of chronic periodontitis: a genome-wide association study. *Hum Mol Genet.* 1 2013;22(11):2312-24.
50. Kumar PS. Smoking and the subgingival ecosystem: a pathogen-enriched community. *Future Microbiol.* 2012;7(8):917-9.
51. Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 1976;34(3):235-49.
52. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14:33-53.
53. Hajishengallis G, Korostoff JM. Revisiting the Page & Schroeder model: the good, the bad and the unknowns in the periodontal host response 40 years later. *Periodontol 2000.* 2017;75(1):116-51.
54. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2001;25:77-88.
55. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000.* 2017;75(1):152-88.
56. Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J. Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1990;17(6):345-50.



57. Renvert S, Wikström M, Dahlén G, Slots J, Egelberg J. On the inability of root debridement and periodontal surgery to eliminate *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 1990;17(6):351-5.
58. Danser MM, Timmerman MF, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. The effect of periodontal treatment on periodontal bacteria on the oral mucous membranes. *J Periodontol.* 1996;67(5):478-85.
59. Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012;83(10):1257-69.
60. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol.* 2012;83(6):731-43.
61. Sgolastra F, Severino M, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of metronidazole as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2014;49(1):10-9.
62. Keestra J a. J, Grosjean I, Coucke W, Quirynen M, Teughels W. Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2015;50(3):294-314.
63. Chambrone L, Vargas M, Arboleda S, Serna M, Guerrero M, de Sousa J, et al. Efficacy of Local and Systemic Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Smokers With Chronic Periodontitis: A Systematic Review. *J Periodontol.* 2016;87(11):1320-32.
64. Bono A, Brunotto M. Amoxicillin/metronidazole or scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis. *Acta Odontol Latinoam AOL.* 2010;23(3):196-203.
65. Kolakovic M, Held U, Schmidlin PR, Sahrman P. An estimate of pocket closure and avoided needs of surgery after scaling and root planing with systemic antibiotics: a systematic review. *BMC Oral Health.* 22 2014;14:159.
66. Zandbergen D, Slot DE, Niederman R, Van der Weijden FA. The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root planing alone in treating periodontitis: =a systematic review=. *BMC Oral Health.* 29 2016;16:27.
67. Smiley CJ, Tracy SL, Abt E, Michalowicz BS, John MT, Gunsolley J, et al. Systematic review and meta-analysis on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts. *J Am Dent Assoc* 1939. 2015;146(7):508-524.e5.

68. van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, DelleMijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol.* 2000;27(2):79-86.
69. Matesanz-Pérez P, García-Gargallo M, Figuero E, Bascones-Martínez A, Sanz M, Herrera D. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(3):227-41.
70. Rovai ES, Souto MLS, Ganhito JA, Holzhausen M, Chambrone L, Pannuti CM. Efficacy of Local Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Patients With Periodontitis and Diabetes: A Systematic Review. *J Periodontol.* 2016;87(12):1406-17.
71. Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth A. Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol 2000.* 2011;55(1):205-16.
72. Morris AJ, Steele J, White DA. The oral cleanliness and periodontal health of UK adults in 1998. *Br Dent J.* 2001;191(4):186-92.
73. van der Weijden GA, Hioe KPK. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:214-28.
74. Moran JM. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. *Periodontol 2000.* 2008;48:42-53.
75. Wu CD, Savitt ED. Evaluation of the safety and efficacy of over-the-counter oral hygiene products for the reduction and control of plaque and gingivitis. *Periodontol 2000.* 2002;28:91-105.
76. Van Strydonck DAC, Slot DE, Van der Velden U, Van der Weijden F. Effect of a chlorhexidine mouthrinse on plaque, gingival inflammation and staining in gingivitis patients: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2012;39(11):1042-55.
77. Cummins D. Vehicles: how to deliver the goods. *Periodontol 2000.* 1997;15:84-99.
78. James P, Worthington HV, Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database Syst Rev.* 31 2017;3:CD008676.
79. Slot DE, Berchier CE, Addy M, Van der Velden U, Van der Weijden GA. The efficacy of chlorhexidine dentifrice or gel on plaque, clinical parameters of gingival inflammation and tooth discoloration: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2014;12(1):25-35.
80. Afennich F, Slot DE, Hossainian N, Van der Weijden GA. The effect of hexetidine mouthwash on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2011;9(3):182-90.

81. Hossainian N, Slot DE, Afennich F, Van der Weijden GA. The effects of hydrogen peroxide mouthwashes on the prevention of plaque and gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2011;9(3):171-81.
82. Van Leeuwen MPC, Slot DE, Van der Weijden GA. Essential oils compared to chlorhexidine with respect to plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *J Periodontol.* 2011;82(2):174-94.
83. Van Leeuwen MPC, Slot DE, Van der Weijden GA. The effect of an essential-oils mouthrinse as compared to a vehicle solution on plaque and gingival inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Dent Hyg.* 2014;12(3):160-7.
84. Karygianni L, Al-Ahmad A, Argyropoulou A, Hellwig E, Anderson AC, Skaltsounis AL. Natural Antimicrobials and Oral Microorganisms: A Systematic Review on Herbal Interventions for the Eradication of Multispecies Oral Biofilms. *Front Microbiol.* 2015;6:1529.
85. Van der Sluijs M, Van der Sluijs E, Van der Weijden F, Slot DE. The effect on clinical parameters of periodontal inflammation following non-surgical periodontal therapy with ultrasonics and chemotherapeutic cooling solutions: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2016;43(12):1074-85.
86. Eberhard J, Jepsen S, Jervøe-Storm P-M, Needleman I, Worthington HV. Full-mouth treatment modalities (within 24 hours) for chronic periodontitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 17 2015;(4):CD004622.
87. Riley P, Lamont T. Triclosan/copolymer containing toothpastes for oral health. *Cochrane Database Syst Rev.* 5 2013;(12):CD010514.
88. Sahrman P, Puhon MA, Attin T, Schmidlin PR. Systematic review on the effect of rinsing with povidone-iodine during nonsurgical periodontal therapy. *J Periodontol.* 2010;45(2):153-64.
89. Haps S, Slot DE, Berchier CE, Van der Weijden GA. The effect of cetylpyridinium chloride-containing mouth rinses as adjuncts to toothbrushing on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2008;6(4):290-303.
90. Hussein A, Slot DE, Van der Weijden GA. The efficacy of oral irrigation in addition to a toothbrush on plaque and the clinical parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg.* 2008;6(4):304-14.
91. Lang NP, Tan WC, Krähenmann MA, Zwahlen M. A systematic review of the effects of full-mouth debridement with and without antiseptics in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8 Suppl):8-21.
92. Gupta R, Pandit N, Aggarwal S, Verma A. Comparative evaluation of subgingivally delivered 10% doxycycline hyclate and xanthan-based chlorhexidine gels in the treatment of chronic periodontitis. *J Contemp Dent Pract.* 1 2008;9(7):25-32.

93. Paolantonio M, D'Ercole S, Pilloni A, D'Archivio D, Lisanti L, Graziani F, et al. Clinical, microbiologic, and biochemical effects of subgingival administration of a Xanthan-based chlorhexidine gel in the treatment of periodontitis: a randomized multicenter trial. *J Periodontol*. 2009;80(9):1479-92.
94. Chandra C, Valavalkar N, Vandana KL. The comparative evaluation of xanthan gel with chlorhexidine (Chlosite) in smokers and non-smokers: A clinical and microbiological assessment. *J Indian Soc Periodontol*. 2011;15(3):221-7.
95. Verma A, Sanghi S, Grover D, Aggarwal S, Gupta R, Pandit N. Effect of insertion of xanthan-based chlorhexidine gel in the maintenance phase following the treatment of chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2012;16(3):381-5.
96. Matesanz P, Herrera D, Echeverría A, O'Connor A, González I, Sanz M. A randomized clinical trial on the clinical and microbiological efficacy of a xanthan gel with chlorhexidine for subgingival use. *Clin Oral Investig*. 2013;17(1):55-66.
97. Chauhan AS, Bains VK, Gupta V, Singh GP, Patil SS. Comparative analysis of hyaluronan gel and xanthan-based chlorhexidine gel, as adjunct to scaling and root planing with scaling and root planing alone in the treatment of chronic periodontitis: A preliminary study. *Contemp Clin Dent*. 2013;4(1):54-61.
98. Chitsazi MT, Kashefimehr A, Pourabbas R, Shirmohammadi A, Ghasemi Barghi V, Daghighi Azar B. Efficacy of Subgingival Application of Xanthan-based Chlorhexidine Gel Adjunctive to Full-mouth Root Planing Assessed by Real-time PCR: A Microbiologic and Clinical Study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(2):95-101.
99. Jain M, Dave D, Jain P, Manohar B, Yadav B, Shetty N. Efficacy of xanthan based chlorhexidine gel as an adjunct to scaling and root planing in treatment of the chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2013;17(4):439-43.
100. Phogat M, Rana T, Prasad N, Baiju CS. Comparative evaluation of subgingivally delivered xanthan-based chlorhexidine gel and herbal extract gel in the treatment of chronic periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*. 2014;18(2):172-7.
101. Faramarzi M, Shirmohammadi A, Chitsazi M, Shamami MS, Ghanitab S. The clinical and metabolic effects of subgingival application of xanthan-based chlorhexidine gel in Type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *Dent Res J*. 2017;14(5):299-305.
102. Putt MS, Proskin HM. Custom tray application of peroxide gel as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: results of a randomized controlled trial after six months. *J Clin Dent*. 2013;24(3):100-7.
103. Anitha V, Rajesh P, Shanmugam M, Priya BM, Prabhu S, Shivakumar V. Comparative evaluation of natural curcumin and synthetic chlorhexidine in the management of chronic periodontitis as a local drug delivery: a clinical and microbiological study. *Indian J Dent Res Off Publ Indian Soc Dent Res*. 2015;26(1):53-6.

104. Lecic J, Cakic S, Janjic Pavlovic O, Cicmil A, Vukotic O, Petrovic V, et al. Different methods for subgingival application of chlorhexidine in the treatment of patients with chronic periodontitis. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(6):502-7.
105. Morelli L, Cappelluti MA, Ricotti L, Lenardi C, Gerges I. An Injectable System for Local and Sustained Release of Antimicrobial Agents in the Periodontal Pocket. *Macromol Biosci*. 2017;17(8).
106. Scholz M, Reske T, Böhmer F, Hornung A, Grabow N, Lang H. In vitro chlorhexidine release from alginate based microbeads for periodontal therapy. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185562.
107. Singh A, Sridhar R, Shrihatti R, Mandloy A. Evaluation of Turmeric Chip Compared with Chlorhexidine Chip as a Local Drug Delivery Agent in the Treatment of Chronic Periodontitis: A Split Mouth Randomized Controlled Clinical Trial. *J Altern Complement Med N Y N*. 2018;24(1):76-84.
108. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:85-101.
109. Agossa K, Morand DN, Tenenbaum H, Davideau JL, Huck O. Systemic Application of Anti-inflammatory Agents in Periodontal Treatment. *Clin Anti-Inflamm Anti-Allergy Drugs*. 2015;2(1):3-13.
110. Van Dyke TE. Control of inflammation and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;45:158-66.
111. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-29.
112. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007;43:294-315.
113. Mohiuddin K, Ravindra S, Ahmed MG, Murthy S, Smitha BR. Single use of tetracycline with and without diclofenac sodium as local drug delivery in pocket therapy: a clinico-microbiological study. *J Investig Clin Dent*. 2011;2(4):280-6.
114. Elkhoul AM. The efficacy of host response modulation therapy (omega-3 plus low-dose aspirin) as an adjunctive treatment of chronic periodontitis (clinical and biochemical study). *J Periodontal Res*. 2011;46(2):261-8.
115. Lee H-M, Ciancio SG, Tüter G, Ryan ME, Komaroff E, Golub LM. Subantimicrobial dose doxycycline efficacy as a matrix metalloproteinase inhibitor in chronic periodontitis patients is enhanced when combined with a non-steroidal anti-inflammatory drug. *J Periodontol*. 2004;75(3):453-63.
116. Ziebolz D, Rupprecht A, Schmickler J, Bothmann L, Krämer J, Patschan D, et al. Association of different immunosuppressive medications with periodontal condition in

- patients with rheumatoid arthritis - results from a cross-sectional study. *J Periodontol.* 22 2018;
117. Elwakeel NM, Hazaa HH. Effect of omega 3 fatty acids plus low-dose aspirin on both clinical and biochemical profiles of patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes: a randomized double blind placebo-controlled study. *J Periodontal Res.* 2015;50(6):721-9.
  118. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, et al. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega-3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol.* 2010;81(11):1635-43.
  119. Laine L, Curtis SP, Cryer B, Kaur A, Cannon CP, MEDAL Steering Committee. Assessment of upper gastrointestinal safety of etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet Lond Engl.* 10 2007;369(9560):465-73.
  120. Harirforoosh S, Jamali F. Renal adverse effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Expert Opin Drug Saf.* 2009;8(6):669-81.
  121. Waksman JC, Brody A, Phillips SD. Nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs and cardiovascular risk: are they safe? *Ann Pharmacother.* 2007;41(7):1163-73.
  122. Dumitrescu AL. *Antibiotics and Antiseptics in Periodontal Therapy.* 2011 edition. Heidelberg ; New York: Springer; 2011. Chap. 6, p 248.
  123. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Maltos KLM, Caliaro MV, Duarte IDG, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclo-oxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J Periodontal Res.* 2009;44(2):153-60.
  124. Vardar-Sengul S, Buduneli E, Turkoglu O, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, et al. The effects of selective COX-2 inhibitor/celecoxib and omega-3 fatty acid on matrix metalloproteinases, TIMP-1, and laminin-5gamma2-chain immunolocalization in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2008;79(10):1934-41.
  125. Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E, Baylas H, Atilla G, Lappin D, et al. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on serum interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. *J Periodontol.* 2006;77(4):657-63.
  126. Vardar S, Buduneli E, Baylas H, Berdeli AH, Buduneli N, Atilla G. Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005;76(1):99-106.
  127. Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1601-8.

128. Coat J, Demoersman J, Beuzit S, Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Saraux A, et al. Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(9):817-23.
129. Chee B, Park B, Fitzsimmons T, Coates AM, Bartold PM. Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy-a review. *Clin Oral Investig*. 2016;20(5):879-94.
130. Badran Z, Kraehenmann MA, Guicheux J, Soueidan A. Bisphosphonates in periodontal treatment: a review. *Oral Health Prev Dent*. 2009;7(1):3-12.
131. Meza-Mauricio J, Soto-Peñaloza D, Peñarrocha-Oltra D, Montiel-Company JM, Peruzzo DC. Locally applied statins as adjuvants to non-surgical periodontal treatment for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22(7):2413-30.
132. Giraudi M, Romano F, Aimetti M. An Update on Herbal Anti-inflammatory Agents in Periodontal Therapy. *Clin Anti-Inflamm 1 Anti-Allergy Drugs*. 2015;2:27-37.
133. Hillery AM, Park K. *Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Second Edition. CRC Press; 2016. Chap 2.
134. Joshi D, Garg T, Goyal AK, Rath G. Advanced drug delivery approaches against periodontitis. *Drug Deliv*. 2016;23(2):363-77.
135. Do MP. *Implants se formant in-situ pour le traitement des parodontites*. Thèse Université Lille2 - Droit et Santé; 2014.
136. Goodson JM, Holborow D, Dunn RL, Hogan P, Dunham S. Monolithic tetracycline-containing fibers for controlled delivery to periodontal pockets. *J Periodontol*. 1983;54(10):575-9.
137. Vyas SP, Sihorkar V, Mishra V. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases. *J Clin Pharm Ther*. 2000;25(1):21-42.
138. Bromberg LE, Buxton DK, Friden PM. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 28 2001;71(3):251-9.
139. Tabary N, Chai F, Blanchemain N, Neut C, Pauchet L, Bertini S, et al. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta Biomater*. 2014;10(1):318-29.
140. Li G, Zhou T, Lin S, Shi S, Lin Y. Nanomaterials for Craniofacial and Dental Tissue Engineering. *J Dent Res*. 2017;96(7):725-32.
141. Seneviratne CJ, Leung KC-F, Wong C-H, Lee S-F, Li X, Leung PC, et al. Nanoparticle-encapsulated chlorhexidine against oral bacterial biofilms. *PloS One*. 2014;9(8):e103234.

142. Osorio R, Alfonso-Rodríguez CA, Medina-Castillo AL, Alaminos M, Toledano M. Bioactive Polymeric Nanoparticles for Periodontal Therapy. PLoS ONE [Internet]. 7 2016 [cité 14 2018];11(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5098795/>
143. Schwinté P, Mariotte A, Anand P, Keller L, Idoux-Gillet Y, Huck O, et al. Anti-inflammatory effect of active nanofibrous polymeric membrane bearing nanocontainers of atorvastatin complexes. *Nanomed*. 2017;12(23):2651-74.
144. Packhaeuser CB, Schnieders J, Oster CG, Kissel T. In situ forming parenteral drug delivery systems: an overview. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2004;58(2):445-55.
145. Dunn RL, Tipton AJ, Harkrader RJ, Rogers JA. Intraingival delivery systems for treatment of periodontal disease [Internet]. US5324520A, 1994 [cité 14 2018]. Disponible sur: <https://patents.google.com/patent/US5324520/en>
146. Kempe S, Mäder K. In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 20 2012;161(2):668-79.
147. Do MP, Neut C, Delcourt E, Seixas Certo T, Siepmann J, Siepmann F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2014;88(2):342-50.
148. Do MP, Neut C, Metz H, Delcourt E, Siepmann J, Mäder K, et al. Mechanistic analysis of PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for periodontitis treatment. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV*. 2015;94:273-83.
149. Do MP, Neut C, Metz H, Delcourt E, Mäder K, Siepmann J, et al. In-situ forming composite implants for periodontitis treatment: How the formulation determines system performance. *Int J Pharm*. 2015;486(1-2):38-51.
150. Södergård A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog Polym Sci*. 1 2002;27(6):1123-63.
151. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*. 1 2007;32(8):762-98.
152. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems--a review. *Int J Pharm*. 30 2011;415(1-2):34-52.
153. Needleman IG, Smales FC, Martin GP. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1997;24(6):394-400.
154. Needleman IG, Martin GP, Smales FC. Characterisation of bioadhesives for periodontal and oral mucosal drug delivery. *J Clin Periodontol*. 1998;25(1):74-82.



155. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC. Mucoadhesive Gels Designed for the Controlled Release of Chlorhexidine in the Oral Cavity. *Pharmaceutics*. 27 2011;3(4):665-79.
156. Ljungberg N, Wesslén B. The effects of plasticizers on the dynamic mechanical and thermal properties of poly(lactic acid). *J Appl Polym Sci*. 21 2002;86:1227-34.
157. Yang T-C, Cheng K-C, Huang C-C, Lee B-S. Development of new tissue conditioner using acetyl tributyl citrate and novel hyperbranched polyester to improve viscoelastic stability. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. 2015;31(6):695-701.
158. Johnson W. Final report on the safety assessment of acetyl triethyl citrate, acetyl tributyl citrate, acetyl trihexyl citrate, and acetyl trioctyl citrate. *Int J Toxicol*. 2002;21 Suppl 2:1-17.

**CHAPITRE I:**

**PHYSICAL KEY PROPERTIES OF ANTIBIOTIC-FREE, PLGA/HPMC-BASED IN-SITU  
FORMING IMPLANTS FOR LOCAL PERIODONTITIS TREATMENT.**

*Agossa K, Lizambard M, Rongthong T, Delcourt-Debruyne E, Siepmann J,  
Siepmann F.*

Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008 - Controlled Drug Delivery Systems and  
Biomaterials, F-59000 Lille, France.

*(Article publié dans International Journal of Pharmaceutics  
2017;521(1-2):282-293 )*

## Abstract

*In-situ* forming implants (ISFI) offer an interesting potential for the treatment of periodontitis, allowing for time-controlled drug release directly at the site of action (which is difficult to reach). For this purpose, ISFI loaded with antibiotics have been reported in the literature. But the use of antibiotic drugs at low doses over prolonged periods of time can lead to the development of bacterial resistances. This risk should be avoided. The aim of this study was to develop a novel type of in-situ forming implants, loaded with the antiseptic drug chlorhexidine. Special emphasis was placed on the physical properties of the systems, assuring a reliable residence time in the periodontal pockets of patients suffering from periodontitis. In particular, the risk of premature, accidental loss of the formulations due to mechanical stress (e.g. during tooth brushing and chewing) was to be reduced. Two commercially available drug products for local periodontitis treatment were studied for reasons of comparison: Chlo-site and Parocline. The syringeability and swelling behavior of the formulations were investigated, and the hardness, springiness, resilience and "stickiness" of the systems determined using extracted human teeth. Interestingly, the novel in-situ forming implants, based on PLGA/HPMC and being free of antibiotics, exhibit highly promising physical key properties: They are intensively sticking to teeth' surfaces and provide adequate mechanical strength to assure reliable and prolonged residence times in periodontal pockets. In contrast, the commercial drug products showed limited adhesion and either rapidly shrank (Chlo-site), or substantially swelled and were mechanically very weak (Parocline).

Keywords: in-situ forming implant; mechanical properties; periodontitis; local controlled drug release; PLGA

## 1. Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease of the periodontium with a considerable prevalence: For example, Eke *et al.* (2012) reported that over 47% of the adults in the United States (64.7 million subjects) likely had periodontitis in 2009/2010. Elder people are particularly affected, e.g. 64% of the adults older than 64 years were estimated to have either moderate or severe periodontitis (1). Importantly, this disease leads to a progressive loss of the alveolar bone and periodontal ligament. The tissue loss results in the formation of periodontal pockets (2-4), and subsequent loosening of the teeth (due to the reduced mechanical anchorage). Finally, the affected teeth get lost. In fact, periodontitis is the first cause for tooth loss in adults (5). Pathogenic bacteria (forming biofilms covering the teeth' surface in the subgingival area) and bacterial products are considered as initiating factors of periodontitis. It seems that the microflora in the periodontal pockets of patients is different from that in healthy subjects. For instance, the number of gram negative anaerobic bacteria has been reported to be increased and certain clinical forms of periodontitis are likely to be associated with specific microbiota (6). Thus, a promising therapeutic approach is based on the administration of agents acting against the pathogenic bacteria (7-11). Unfortunately, drug partitioning into the contents of periodontal pockets, especially into the biofilms located on the teeth' surface, is limited when using classical administration routes (e.g., oral, i.v., i.m., s.c.). Consequently, high drug doses are required, resulting in considerable drug concentrations in the rest of the human body and an important risk of undesired side effects. Drug delivery systems, which release the active agent directly at the side of action, and this during prolonged periods of time, offer an interesting potential to overcome this crucial hurdle (12-14). Generally, this type of advanced local drug treatment is combined with prior mechanical removal of the bacterial plaques and calculus (called "scaling and root planning") (15,16). Different reports are available in the literature on drug delivery systems aiming at the delivery of antibiotic drugs into the periodontal pockets of patients suffering from periodontitis. "Paroclone" is an example for a commercially available drug product, containing 2% minocycline. It is a gel, which is injected into periodontal pockets, based on Eudragit RS [poly(ethyl acrylate-co-methyl methacrylate-co-trimethylammonioethyl methacrylate chloride) 1:2:0.1], hydroxyl ethylcellulose, triacetine, glycerol and magnesium chloride. However, the use of low doses of antibiotics during prolonged periods of time can

lead to the formation of bacterial resistances against these drugs. This is highly undesirable in the context of the growing inefficiency of more and more antibiotic drugs against life-threatening diseases due to bacterial resistances. To avoid this, advanced drug delivery systems for local periodontitis treatments should be free of antibiotics. The latter should be replaced by other types of active agents, for example antiseptics. For instance, chlorhexidine might offer an interesting potential (17-19). A commercial drug product containing a combination of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine dihydrochloride is available on the market under the tradename "Chlo-site". It is a gel based on xanthan gum, containing 1.5% antiseptic agent. However, one of the major challenges such gels face in practice is premature, accidental expulsion from the periodontal pocket: Due to mechanical stress (e.g., generated during tooth brushing or chewing), the formulations (or parts of them) can be detached and swallowed. In-situ forming implants (ISFI) offer an interesting potential to overcome this critical drawback (20-22): These are liquid formulations, which can be easily injected into periodontal pockets, and then (e.g., following solvent exchange) harden to form solid implants with customized geometry. Importantly, the liquid formulations can initially easily spread within the entire cavity, and once hardened the solid implants exhibit exactly the sizes and shapes of the periodontal pockets. Such "personalized" implants should be biodegradable, biocompatible and intensively stick to the surface of the affected teeth to assure reliable residence times at the site of action. Recently, ISFI based on poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) have been proposed for local periodontitis treatment (14,23,24). The addition of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) to these formulations has been shown to improve the adhesion of the resulting implants to metal surfaces. However, metal surfaces might not be representative of teeth' surfaces, and these systems were loaded with antibiotic drugs, namely doxycycline hyclate, metronidazole and minocycline hydrochloride. Yet, there is a lack of ISFI for the treatment of periodontitis, being free of antibiotics and reliably sticking to the teeth of a patient. The aim of this study was to develop new, chlorhexidine-loaded ISFI and to characterize their "stickiness" to human teeth. Also, the syringeability of the liquid formulations, as well as the swelling behavior of the resulting implants were investigated. For reasons of comparison, also two commercially available drug products for periodontitis treatment were studied: Parocline and Chlo-site.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA, Resomer RG 502H; Evonik, Darmstadt, Germany) acetyltributyl citrate (ATBC; Morflex, Greensboro, NC, USA); hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, Methocel, E50; Colorcon, Dartford, UK); N-methyl pyrrolidone (NMP, 99%; Acros organics, Geel, Belgium); chlorhexidine dihydrochloride (Evonik, Hanau, Germany); agarose (GenAgarose LE; Genaxxon BioScience, Ulm, Germany); Parocline (2% minocycline, Eudragit RS, hydroxyl ethylcellulose, magnesium chloride, triacetate, glycerol; Sunstar France, Levallois-Perret, France); Chlo-site (1% chlorhexidine dihydrochloride; 0.5% chlorhexidine digluconate, xanthan gum; Ghimas, Casalecchio di Reno, Italy); molar and premolar human teeth (extracted from patients for orthodontic reasons); auto-polymerized acrylic resin (Duralay; Reliance dental manufacturing, Worth, USA); ethyl cyanoacrylate (Loctite superglue 3; Henkel, Boulognebillancourt, France).

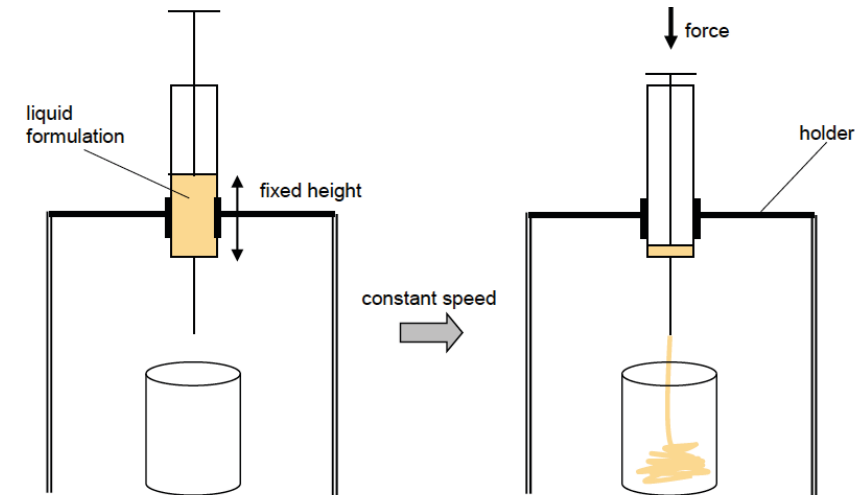
### 2.2. Preparation of liquid in-situ forming implant formulations

PLGA (28% w/w, based on the total liquid formulation without drug) was dissolved in NMP at 25°C for 30 min under stirring in a glass vial. ATBC (10% w/w, based on the PLGA mass) and HPMC (10 or 20% w/w, based on the PLGA mass) were added and the mixture was vortexed for 3 min, followed by standing for 3 h at 25°C. Subsequently, chlorhexidine dihydrochloride (10% w/w, based on the total liquid formulation without drug) was added, and the mixture vortexed for 15 min, followed by standing for 3 h at 25°C. The formulations were stored at 2-8 °C in a refrigerator (for up to 3 d) and protected from light to avoid drug degradation until further use.

### 2.3. Syringeability

The work required to expulse a liquid formulation from an empty Emdogain syringe (with a 19G cannula, 35 mm length) (Straumann, Malmoe, Sweden) was determined using a texture analyzer, as illustrated in Figure 1 (load cell: 50 kg, TA.XT.Plus; Stable Micro Systems, Surrey, UK). The syringe (volume: 2 mL) was filled with 1.5 mL formulation and fixed in a holder. A stainless steel cylindrical probe (6 mm in diameter) was used to drive the piston of the syringe downward at a constant speed of 1 mm/s, up to 10 mm. Force-distance profiles were

recorded at room temperature. Note that the same syringe was used for all formulations (including the investigated commercial drug products). The experiments were conducted in triplicate.

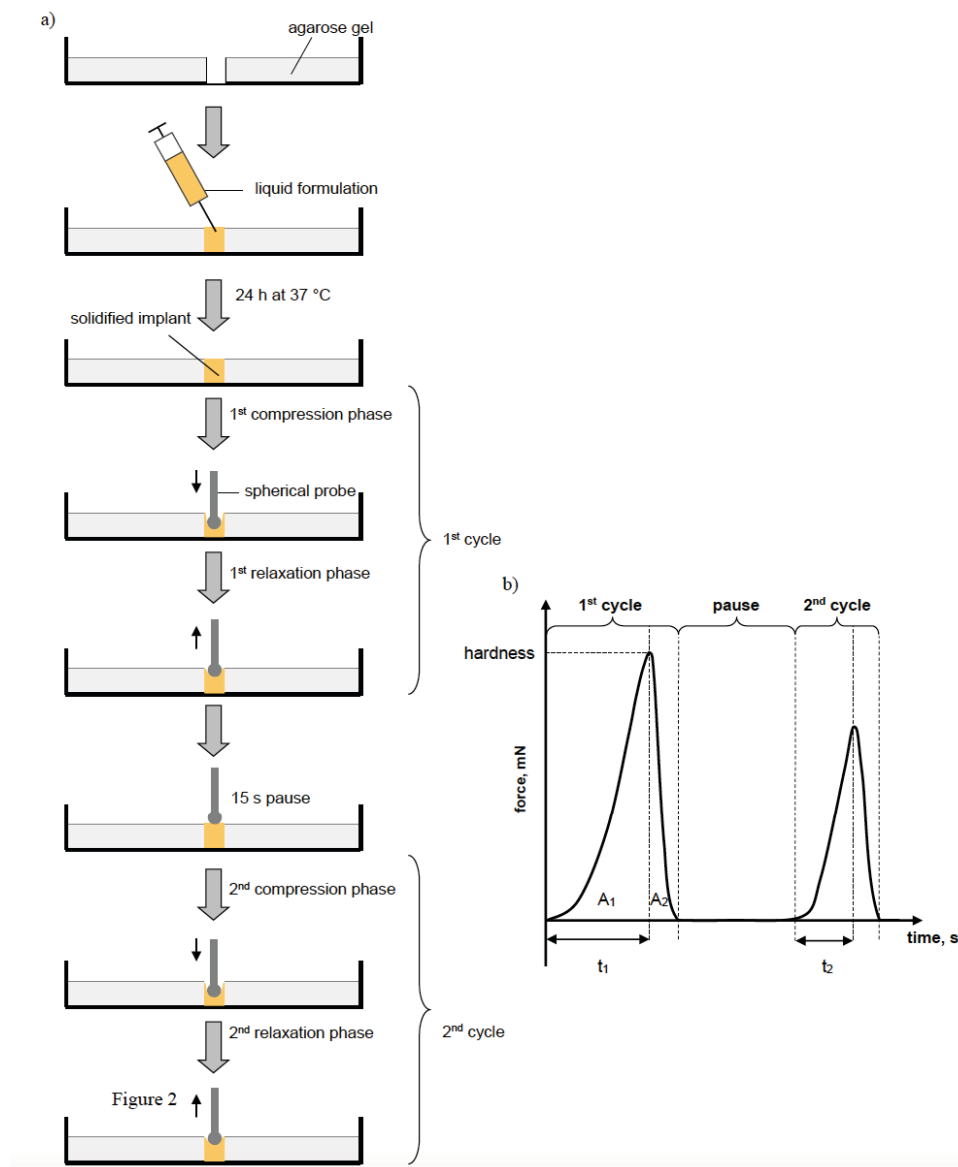


**Fig 1.** Syringeability of the investigated formulations: a) Schematic presentation of the applied experimental setup

## 2.4. Texture profile analysis

The texture profile of the investigated in-situ forming implants (and of commercial drug products for reasons of comparison) was determined with a texture analyzer (TA.XT.Plus, load cell: 1 kg). The “double compression test” was used, which is frequently applied to characterize the textural properties of foods (25). The experimental setup is schematically illustrated in Figure 2a. Agarose was dissolved in boiling water (0.6% w/v), and the resulting solution was cast into Petri dishes (diameter = 9 cm). Upon cooling to room temperature, gels formed. At the center of the gels, cylindrical holes (diameter = 6 mm) were made and filled with 250  $\mu\text{L}$  formulation: ISFI, Parocline or Chlo-site. The Petri dishes were horizontally shaken at 37  $^{\circ}\text{C}$  at 80 rpm (GLF 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik, Burgwedel, Germany) for 24 h. In the case of ISFI, implants formed upon solvent exchange. Two compression-traction cycles were run as follows: A spherical probe (diameter = 5 mm) was driven downward (at a constant speed of 2 mm/s). Once in contact with the formulation, the applied force and displacement of the probe were recorded as a function of time. When the penetration depth was equal to half of the sample height, the probe was driven upward (at a

speed of 2 mm/s) until the position was reached, at which the probe had had its first contact with the formulation. This position was held for 15 s before a second compression-traction cycle was conducted (identical to the 1st cycle). All tests were performed in triplicate at room temperature. Figure 2b shows a typical force-time diagram obtained with this setup.



**Fig 2.** Texture Profile Analysis: a) Schematic presentation of the experimental setup used for the characterization of the texture of the investigated formulations (details are described in the text), b) A typical force-time plot obtained with this setup.



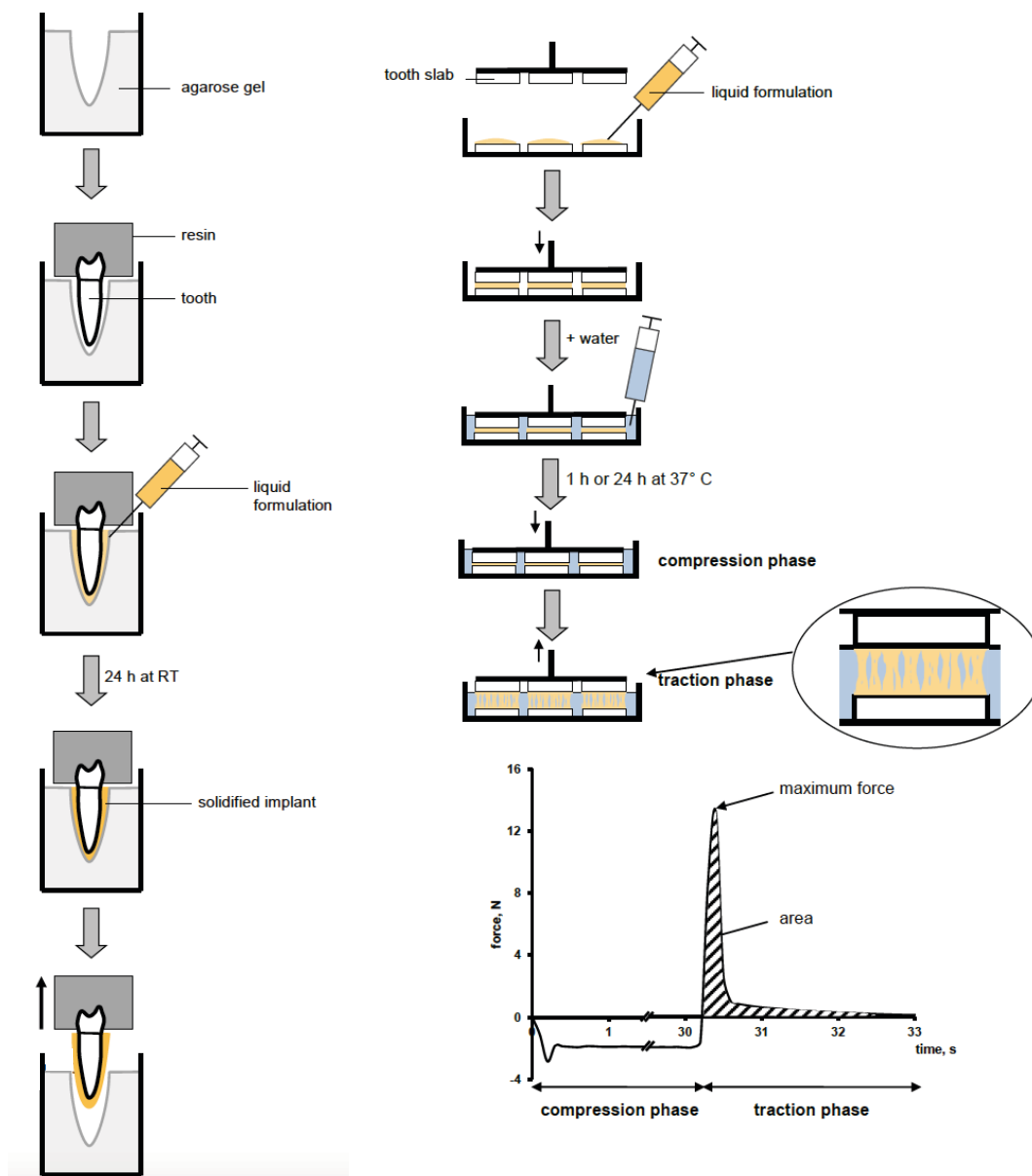
## 2.5. “Adhesive” properties

A texture analyzer (load cell: 5 kg; TA.XT.Plus) was used to measure the “adhesive” properties of the investigated in-situ forming implant formulations (and of commercial drug products for reasons of comparison). The following 2 setups were applied:

*Entire tooth setup:* Agarose was dissolved in boiling water (0.6% w/v), and the solution cast into cylindrical flasks (diameter = 35 mm, height = 70 mm). An Eppendorf microcentrifuge tube (volume = 1.5 mL) was introduced in the middle of the solution. Upon cooling to room temperature, a gel formed. After careful removal of the Eppendorf tube, a hole was created (as illustrated at the top of Figure 3). The crown of an extracted human tooth was embedded in an auto-polymerized acrylic resin and fixed to the upper grip of the texture analyzer. The root of the tooth was placed into the hole in the agarose gel, while leaving some empty space between the tooth and the agarose gel (Figure 3, the junction of the root and the crown was at the same height as the surface of the agarose gel). Then, the investigated formulations were injected into the space between the tooth and the agarose gel using a syringe, until this space was completely filled (in the case of ISFI formulations using a 1 mL syringe connected to a 18G needle; in the case of Parocline and Chlo-site using the syringes provided in the commercial drug products). The systems were kept at room temperature for 24 h. In the case of ISFI, the implants formed upon solvent exchange. The tooth was then moved upward with the texture analyzer (at a constant speed of 0.5 mm/s), and the applied force and displacement were recorded.

*Tooth slab setup:* Tooth slabs (10 x 8 mm, thickness 1.5 mm) were obtained by cutting extracted human teeth using a high-performance table-top cut-off machine (Secotom-15; Struers, Ballerup, Denmark). The slabs were sonicated in water to remove surface debris. Three tooth slabs were fixed at the bottom of a Petri dish with ethyl cyanoacrylate glue (Figure 4). Three more tooth slabs were fixed with the same glue at a holder, which was attached to the upper grip of the texture analyzer. The investigated formulations were carefully placed on the top of the three tooth slabs fixed on the Petri dish (Figure 4, 100  $\mu$ L per tooth slab). Then, the holder with the 3 upper tooth slabs was carefully moved downward until a distance of 1 mm to the lower tooth slabs was reached. This assured that the entire 6 tooth surfaces were fully in contact with the formulations, and that no air was left between the upper and lower tooth slabs. Subsequently, water was carefully introduced into the Petri dishes using a syringe, assuring complete immersion of the tooth slab

assembly. The system was kept at 37 °C for 1 or 24 h (as indicated). In the case of ISFI, the implants formed upon solvent exchange. Afterwards, the holder with the upper tooth slabs was moved downward (at constant speed of 1 mm/s) until a target force of 2 N was reached (“compression phase”). This position was held for 30 s. Then, the holder with the upper tooth slabs was moved upward at a constant speed of 2 mm/s. Forces and displacements were recorded as a function of time. All measurements were conducted in triplicate.



**Fig 3.** Schematic presentation of the experimental setup used to determine the “adhesive” properties of the investigated formulations with entire teeth (left column) or tooth slabs (right column). At the bottom, a typical force-time profile is illustrated. Details are described in the text.

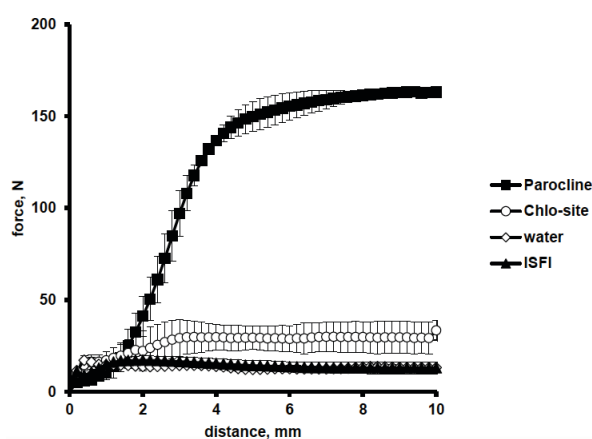
## 2.6. Swelling/shrinking behavior

ISFI formulations (and Parocline and Chlo-site for reasons of comparison) were injected into holes (diameter: 6 mm) at the center of agarose gels in Petri dishes, as illustrated in the upper part of the cartoon in Figure 2. After 5 min or 24 h (as indicated) at 37 °C, macroscopic pictures were taken with an optical image analysis system (Nikon SMZ-U, Nikon, Tokyo, Japan), equipped with a Zeiss camera (AxioCam ICc 1, Zeiss, Jena, Germany) in top and side view modus.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Syringeability

The syringeability of a formulation, which is administered into periodontal pockets of a patient suffering from periodontitis, is of utmost practical importance: If the forces required to inject the drug product are high, the treatment becomes complicated and time-consuming. To measure the syringeability of ISFI, the setup illustrated in Figure 1 was used. For reasons of comparison, also water, Parocline and Chlo-site were studied. Briefly, a 2 mL Emdogain syringe was filled with 1.5 mL formulation. The syringe was fixed in a holder and the cylindrical probe of a texture analyzer was used to drive its piston 10 mm downward. Force-distance profiles were recorded at room temperature. Figure 4 shows the results obtained for an ISFI containing 28% PLGA (matrix forming polymer), 10% ATBC (plasticizer), 10% HPMC (adhesion enhancing polymer) and 10% chlorhexidine dihydrochloride. As it can be seen, the force required to expulse Parocline was substantially higher compared to the other formulations. Interestingly, the ISFI was as easily expulsed as pure water.

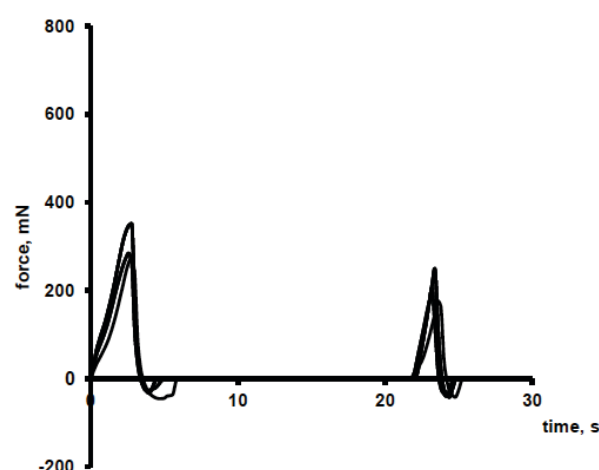


**Fig 4.** Syringeability of the 10%ISFI formulation as compared to Parocline Chlo-Site and water

### 3.2. Texture profile analysis

Obviously, the texture of a formulation to be administered into the periodontal pocket of a patient suffering from periodontitis is another key feature to be considered when formulating advanced local controlled drug delivery systems for the treatment of this disease (26-28). For this reason, a texture profile analysis using a TA.XT.Plus was performed in this study. The experimental setup is illustrated in Figure 2. Briefly, an agarose gel was cast into a Petri dish, a cylindrical hole was created at its center and filled with ISFI (or Parocline or Chlo-site for reasons of comparison). Incubation for 24 h at 37 °C allowed for solvent exchange and hardening of the in-situ forming implant. Then, two compression-traction cycles were run: A spherical probe was driven downward at a constant speed. Once in contact with the formulation, force-displacement profiles were recorded. The probe stopped when its penetration depth was equal to half of the sample's height. It was then driven upward until the position was reached, at which the probe had had its first contact with the formulation. This position was held for 15 s before a second compression-traction cycle was run (which was identical to the first one). Figure 2b shows a typical force-time diagram obtained with this type of measurements. The reproducibility of these measurements is illustrated in Figure 5, showing the example of ISFI formulations containing 28% PLGA, 10% ATBC, and 10% HPMC. The same experiment was performed with 3 samples of identical composition. As it can be seen, the recorded forcetime profiles were similar. The partially observed negative forces can be explained by the sticking of the formulations to the spherical probe. Figure 6 shows the experimentally measured force-time curves for ISFI formulations containing 28% PLGA, 10% ATBC, 0 or 10% chlorhexidine dihydrochloride, and 0, 10 or 20% HPMC. For reasons of comparison, also Parocline and Chlo-site were studied. Note that in the case of Parocline, a shoulder was observed during the two compression cycles: This can be attributed to the fact that an outer, harder shell was formed, which cracked at a given time point (picture in Figure 6). This behavior was not observed with the other formulations. Based on these measurements, the hardness, springiness and resilience of the formulations were calculated (Figure 7). The hardness is defined as the "peak force that occurs during the first compression" (25). As it can be seen, Chlo-site showed the highest hardness of the investigated formulations (618 +/- 157 mN), whereas Parocline showed the lowest (232 +/- 30 mN). The ISFI formulations exhibited intermediate hardnesses, which was not very much affected by the presence/absence of 10 or 20% HPMC

or 10% drug. In practice, a formulation should not be too hard in order to allow the periodontal pocket to deform with time. Figure 7b shows the resilience of the investigated systems, which is defined as the ratio “upstroke energy of the first compression/downstroke energy of the first compression” (25). Since the displacement velocity was constant, this corresponds to the ratio “A2/A1” (Figure 2b). The resilience is, hence, a measure for “how well a product fights to regain its original height during the first cycle”, before the waiting period. As it can be seen in Figure 6, Chlo-site showed the highest, Parocline the lowest and the investigated ISFI formulations intermediate resilience values. Again, the presence/absence of HPMC and drug in the investigated ranges did not substantially affect the resilience of the ISFI formulations. Figure 7c shows the springiness of the systems, being defined as the “ratio of the displacement of the probe during the second compression divided by the displacement of the probe during the first compression” (25). Since the displacement velocity was constant, this corresponds to the ratio “t2/t1” (Figure 2b). The springiness is, hence, a measure for “how well a product physically springs back after it has been deformed during the first compression and has been allowed to wait for the target wait time between strokes”. Clearly, Chlo-site showed the lowest springiness, Parocline the highest and all ISFI formulations intermediate values (irrespective of the presence/absence of HPMC or drug). In practice, the resilience and springiness values of a formulation, which is administered into the periodontal pockets of a patient suffering from periodontitis, should not be too high, in order to allow the pocket to deform with time.



**Fig 5.** Reproducibility of the texture profile analysis: Three force-time plots obtained with the same formulation (ISFI: 28% PLGA, 10% ATBC, 10% HPMC, no drug) are shown.

### 3.3. “Adhesive” properties

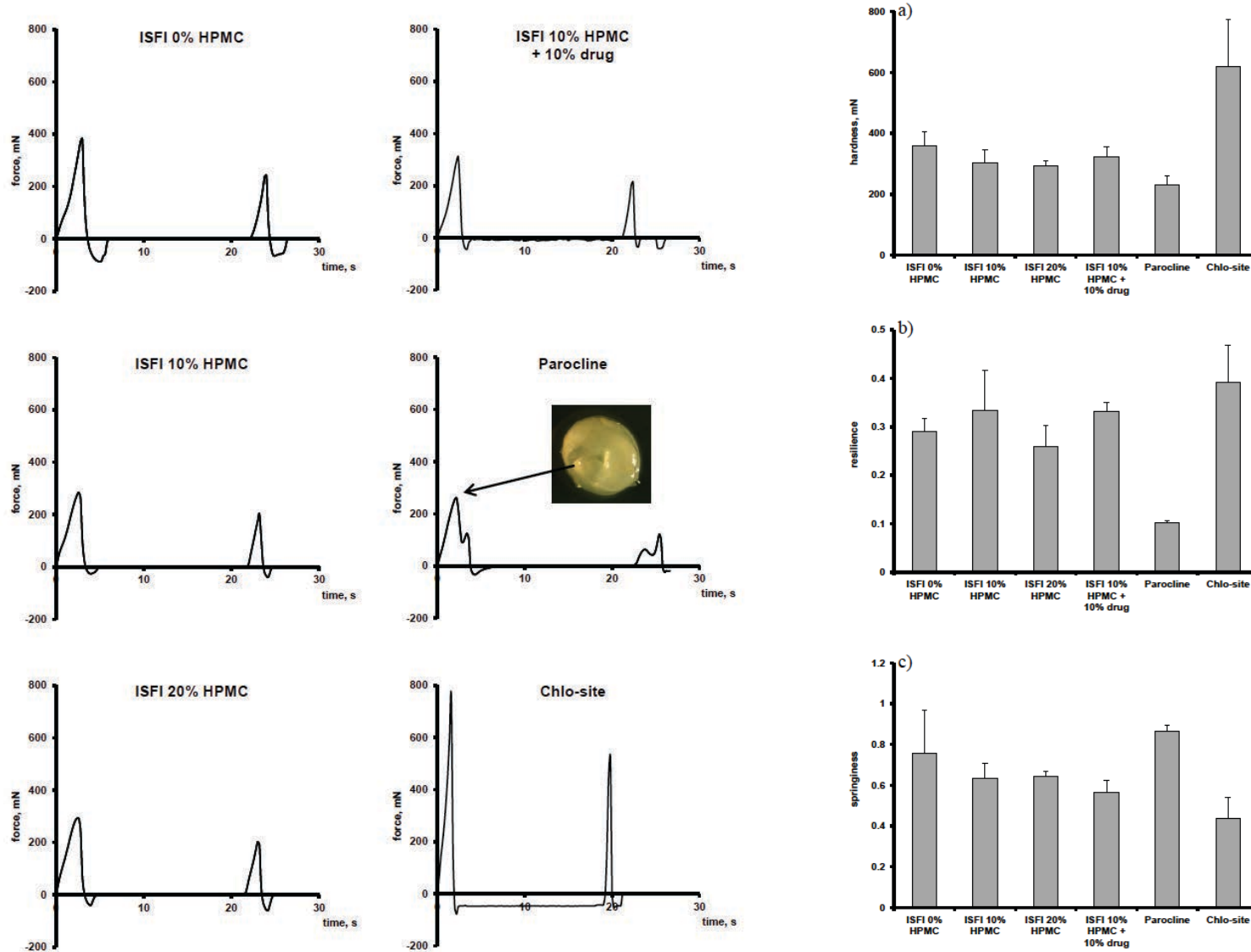
Two different experimental setups were applied to characterize the “adhesive” properties of the investigated formulations (ISFI and commercial products): One using entire teeth, one using tooth slabs. The aim was to measure how intensively these formulations stick to the teeth’ surface in the patient: Ideally, the formulations should intensively adhere to this surface, to assure that they stay in place during the entire drug release period. Premature and accidental expulsion from the dental pockets is one of the major practical problems, which has not yet been resolved. The “entire tooth” test setup is schematically illustrated in Figure 3: Briefly, an agarose gel with a hole in the middle was prepared in a flask. A tooth (which was fixed with a resin to the grip of a texture analyzer) was placed into this hole, leaving some space between the gel and the tooth. The gel should mimic the surrounding tissue, the open space the periodontal pocket. The investigated formulations were carefully injected into these “artificial” periodontal pockets. After 24 h at room temperature (allowing ISFI hardening), the tooth was driven upward and timedisplacement profiles were recorded. A maximum force of 6.2 N was measured with this setup. However, visual observation showed that the formulations did not detach from the tooth, but from the agarose gel, because the adhesion to the tooth’ surface was much stronger compared to the adhesion to the agarose gel. Consequently, these values cannot be used as a measure for the “adhesion to the tooth”. It has to be pointed out that in practice, the adhesion to the teeth’ surface is decisive for the success of the treatment. The adhesion of the formulation to the surrounding epithelium is less critical, because of the rapid renewal of the epithelial cells (thus, reliable, permanent attachment to this surface is very difficult to achieve). In order to avoid the detachment of the investigated formulations from the agarose gels occurring during measurements with the “entire tooth setup”, also another experimental technique was applied, using tooth slabs (29). The basic principle of this method is illustrated in Figure 4: Three tooth slabs were fixed at the bottom of a Petri dish, 3 other tooth slabs were fixed at a holder of a texture analyzer. The ISFI formulations (and commercial drug products) were carefully administered using syringes onto the surfaces of the tooth slabs in the Petri dish. Then, the upper tooth slabs were moved downward until a distance of 1 mm to the lower tooth slabs was reached. This assured that the entire teeth’ surfaces were in contact with the formulations and that no air was left between the upper and lower tooth slabs.

Subsequently, water was carefully introduced into the Petri dish, assuring that the tooth slab assembly was completely immersed. After 1 or 24 h incubation at 37 °C (during which ISFI formed), the holder with the upper tooth slabs was moved downward until a target force of 2 N was reached (“compression phase”). This assured a close contact between the formulations and the teeth’ surfaces. This position was held for 30 s. Afterwards, the upper tooth slabs were moved upward. Importantly, this type of setup avoided the detachment of the formulation from the agarose gel as critical step. A typical force-time profile obtained with this measurement technique is shown at the bottom of Figure 4: During the compression phase, a force of 2 N (here as a negative value) was held. Once the holder moved upward, a force in the opposite direction was measured, which was steadily increasing until a maximum value was reached. This is the force required to separate the teeth’ surfaces, held together by the formulations. After a peak was reached, the measured force declined again. But (except for Chlo-site) this decline was not due to the detachment of the formulation from the teeth’ surface, but to the deformation of the formulation itself, as illustrated in Figure 4 (cartoon at the bottom). Hence, also this force is not the “real adhesion force” of the formulations to the teeth’ surface (except for Chlo-site). Nevertheless, it can give an idea on how easy parts of the formulations can detach in the patient’s periodontal pockets upon exposure to mechanical stress (e.g., during tooth brushing or chewing). Also in practice the formulations do not necessarily completely detach from the teeth’ surface, but the formulations can be continuously lost in the form of smaller pieces. Consequently, also the area under the force-time curves illustrated at the bottom of Figure 4 can be helpful to get an idea on how easily (parts of) the formulations can get lost in a periodontal pocket. Note that not entire teeth have been used for this experimental setup, but tooth slabs. This was to assure a more reproducible and flat contact area and distance between the teeth’ surfaces. Also, 3 “tooth slab pairs” were used (and not only 1), in order to minimize the relative error of the force measurements. Figure 8a shows the maximum forces measured during the traction phase of the “tooth slab adhesion test”. The higher the force, the more difficult it is to deform the formulation (and detach pieces of it). In the case of Chlo-site, the maximum forces were the detachment forces of the implants from the teeth surfaces.

## CHAPITRE I

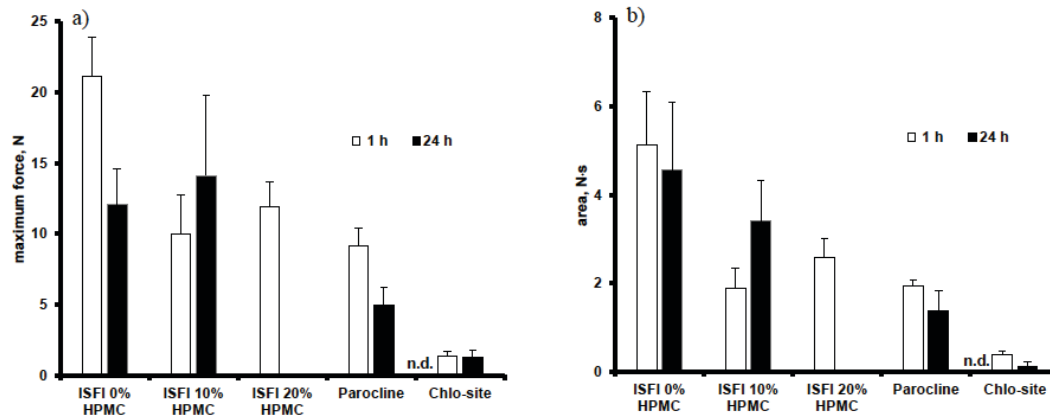
**Fig 6.** Texture profile analysis: plots obtained with different ISFI, Parocline and Chlo-site. The picture shows a Parocline implant with a crack in its outer shell.

**Fig 7.** (right) Mechanical key properties of the investigated formulations obtained by texture profile analysis: a) Hardness, b) Resilience, and c) Springiness.

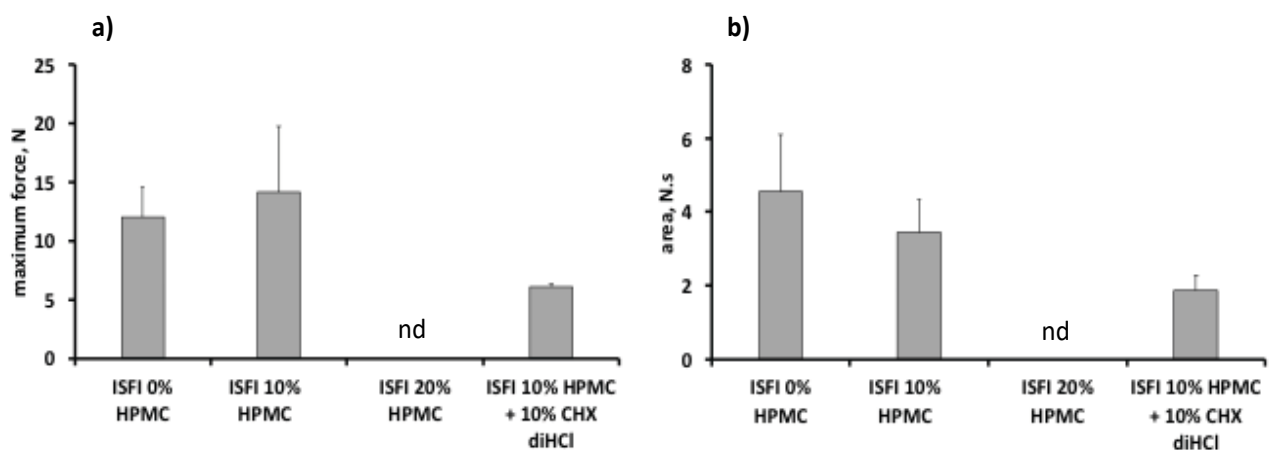




The white bars show values obtained after 1 h incubation, the black bars after 24 h incubation. Note that in the case of ISFI containing 20% HPMC the values were too high to be detectable with the applied setup ("n.d."). Clearly, the investigated ISFI formulations were more difficult to deform/detach than the two commercial drug products (Parocline and Chlo-site). Thus, the risk of accidental and premature loss of (parts of) the formulations from the periodontal pockets can be expected to be reduced. Figure 8b shows the respective areas under the force-time curves for the investigated formulations and incubation times. As it can be seen, the trends were very similar. Chlo-site showed the lowest maximum force and area under the curve values of all formulations, irrespective of the incubation time. This indicates that these xanthan gels exhibit a higher risk of accidental and premature loss from the site of action. The values for Parocline were higher, but decreased with increasing incubation time. This can probably be attributed to the fact that more and more water penetrates into these Eudragit RS/hydroxyl ethylcellulose hydrogels with time, reducing the mechanical stability of the system. This trend was also observed with HPMC-free PLGA ISFI formulations. But importantly, the opposite tendency was observed in HPMC-containing PLGA ISFI: The measured maximum forces and areas under the force-time curves were higher after 24 h incubation compared to only 1 h incubation. This can probably be explained by the fact that it takes some time for the implants to completely solidify (Do et al., 2015a, 2015b). In the case of ISFI formulations containing 20% HPMC, the forces were so high that they could not be measured with the applied experimental setup: In these cases, the upper tooth slabs detached from the holder fixed to the texture analyzer. Thus, the maximum forces to deform these formulations were even higher than those of ISFI formulations containing 10% HPMC. This clearly confirms the beneficial effect of adding HPMC to the ISFI formulations: In vivo, this can be expected to increase the residence time of the formulations in the periodontal pockets of the patients. As it can be seen in Figure 9 the drug loading slightly decreased the "adhesive" properties of the ISFI. This could be explained by a higher cross-link density of the polymer chains caused by increased interactions between the cationic drug and the carboxylate groups of the polymer. As reported in the literature, an increased cross-link density reduces the flexibility and hydration rate of the polymer leading to lower adhesive performance (30).



**Fig 8.** “Adhesive” properties of drug-free ISFI (and commercial drug products for reasons of comparison) measured using the “tooth slab setup” illustrated in Figure 4. Maximum forces and areas under the force-time curves are illustrated. The systems were incubated for 1 or 24 h (white and black bars, respectively) (n.d.: not detectable, the values were too high).



**Fig 9.** Effect of the drug loading on the “Adhesive” properties of the ISFI measured after 24h of incubation using the “tooth slab setup” illustrated in Figure 4. Maximum forces (a) and areas under the force-time curves (b) are illustrated. (n.d.: not detectable, the values were too high).

### 3.4. System swelling/shrinking

Another important practical aspect of formulations, which are administered into periodontal pockets, is their swelling/shrinking behavior: Intense swelling or pronounced shrinking is likely to favor premature and accidental expulsion from the site of action. For this reason, ISFI formulations (optionally containing 10 or 20% HPMC and 10% chlorhexidine

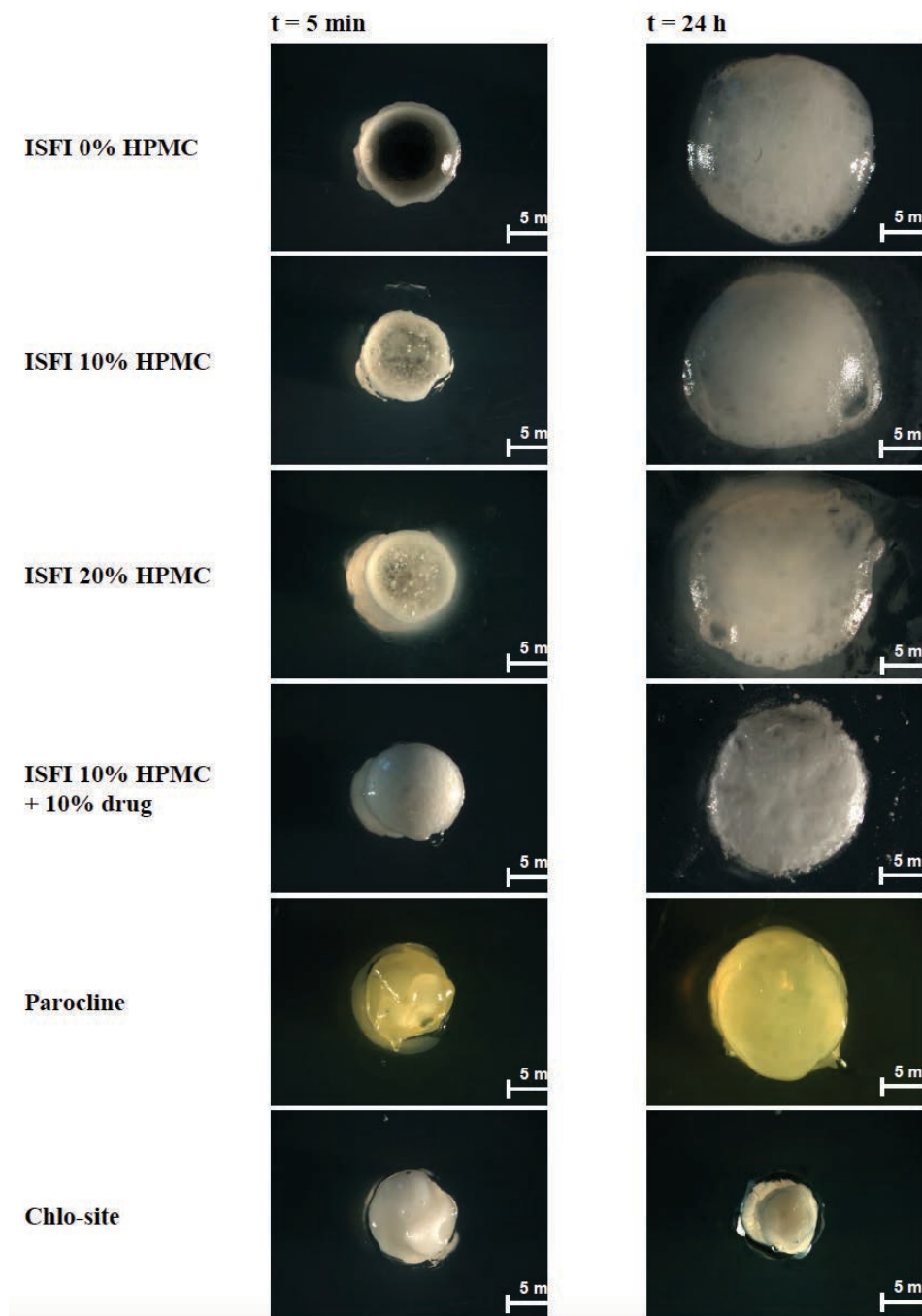
dihydrochloride) were injected into holes at the center of agarose gels in Petri dishes (as illustrated in the upper part of the cartoon in Figure 2). Parocline and Chlo-site were studied for reasons of comparison. After 5 min or 24 h incubation, macroscopic pictures of the formulations were taken (Figure 10: top view; Figure 11: side view). As it can be seen, the investigated ISFI were swelling to a certain extent. It has to be pointed out that the “top view” pictures in Figure 10 “tend to overestimate” system swelling, since only the “huts” of the “mushroom-like implants” are visible. Looking for instance at the “side view” picture at left hand side at the bottom of Figure 11, it becomes obvious that the overall ISFI swelling was limited. Also, the presence of the drug reduced the degree of ISFI swelling (Figure 9). When looking at the pictures obtained after 5 min incubation of ISFI formulations containing 0, 10 and 20% HPMC in Figure 10, it becomes obvious that the presence of HPMC remarkably accelerated implant hardening (due to facilitated water penetration into the system, leading to PLGA precipitation). This is very important from a practical point of view: HPMC-free formulations remain liquid during several minutes and can easily be expelled from the periodontal pockets. Figure 11 shows side views on ISFI, Parocline and Chlo-site implants after 24 h incubation at 37 °C (the ISFI contained 10% HPMC and 10% drug). Clearly, Chlo-site implants substantially shrank within only 1 d. This can be a major drawback in practice, facilitating premature accidental expulsion from the periodontal pockets. In contrast, Parocline implants significantly swelled. Major parts of the implants were expelled from the hole in the agarose gel. Furthermore, these implants were mechanically so weak that they could not be removed from the gel without breaking into little pieces. This is why the picture at the bottom of Figure 11 shows a Parocline implant in an agarose gel block. In practice, the substantial swelling and mechanical weakness of the Parocline implants can be expected to lead to premature expulsion from the periodontal pockets. Importantly, the ISFI containing 10% HPMC and 10% drug were mechanically sufficiently stable to be easily removed from the agarose gel and showed limited swelling. Combined with the above discussed promising adhesive properties of these implants to teeth surfaces, they can be expected to provide reliable and prolonged residence times in the periodontal pockets of the patients.

## **4. Conclusion**

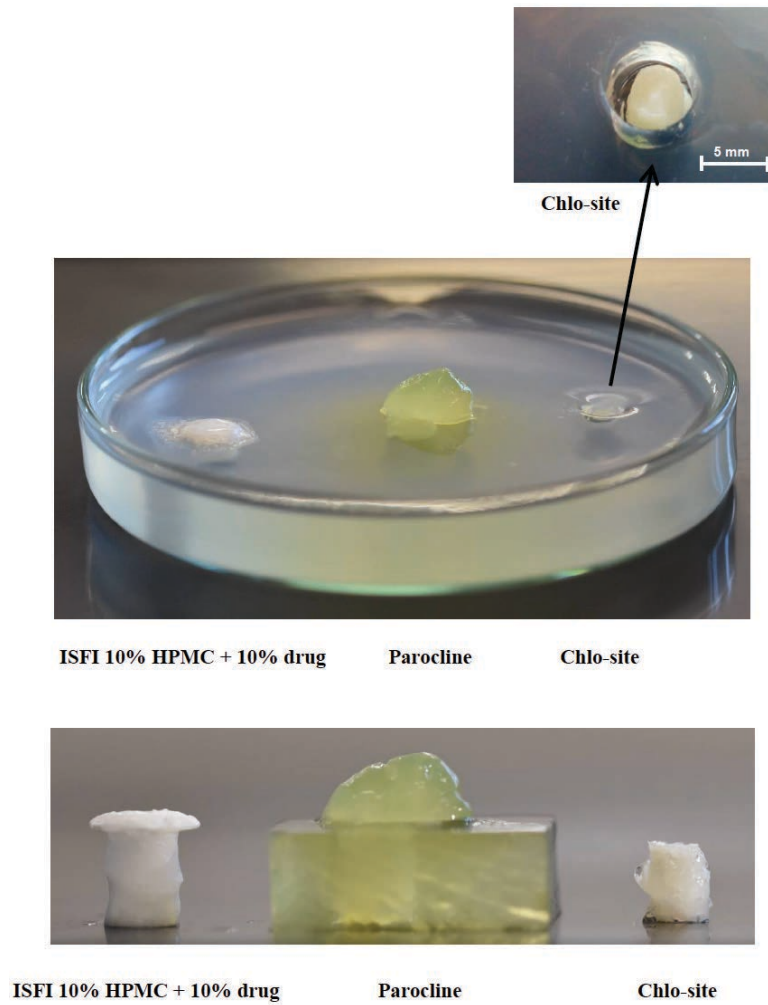
The physical key properties of the newly proposed chlorhexidine loaded in-situ forming implants for periodontitis treatment (being free of antibiotic drugs) are very promising: The risk of premature, accidental loss of the formulations from the site of action can be expected to be substantially reduced compared to commercial products available on the market. Future studies should address the resulting drug release kinetics and in vivo performance of these systems.

## **Acknowledgements**

The authors are very grateful to the ANR (The French National Research Agency) (N° ANR-14-CE16-0025-01) and to the INSERM (the French National Institute of Health and Medical Research) (“poste d’accueil 2016” for Kevimy Agossa) for their valuable support.



**Fig. 9** Macroscopic pictures (top views) of the investigated formulations after 5 min (left column) or 24 h (right column) incubation at 37 °C in agarose gels. The ISFI (28% PLGA, 10% ATBC, optionally containing 10 or 20% HPMC and 10% drug) and commercial drug products were injected into holes at the center of agarose gels in Petri dishes (top of Fig. 2a)



**Fig 10.** Macroscopic pictures (side views) of implants after 24 h incubation at 37 °C in agarose gels: ISFI (28% PLGA, 10% ATBC and 10% drug), Parocline and Chlo-site. The formulations were injected into holes at the center of agarose gels in Petri dishes, as illustrated at the top of Figure 2a. The picture at the bottom shows implants, which were removed from the gels for better visibility. The Parocline implants were mechanically so weak that they broke into pieces during removal, this is why a block of agarose was also cut out in this case.

**References**

1. Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Genco, R.J. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J. Dent. Res.* 2012 ;91 : 914-920.
2. Silva-Boghossian, C.M., Luiz, R.R., Colombo, A.P. Periodontal status, sociodemographic, and behavioral indicators in subjects attending a public dental school in Brazil: analysis of clinical attachment loss. *J. Periodontol.* 2009 ; 80, 1945-1954.
3. Silva-Boghossian, C.M., Neves, A.B., Resende, F.A., Colombo, A.P. Suppuration associated bacteria in patients with chronic and aggressive periodontitis. *J. Periodontol.* 2013 ;84, 9-16.
4. Holt, S.C., Ebersole, J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol.* 2000. 2005 ; 38, 72-122.
5. Pihlstrom, B.L., Michalowicz B.S., Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005 ; 366, 1809-1820.
6. Moore, W.E., Moore, L.V. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. 1994 ; 5, 66-77.
7. Kopytynska-Kasperczyk, A., Dobrzynski, P., Pastusiak, M., Jarzabek, B., Prochwicz, W. Local delivery system of doxycycline hyclate based on  $\epsilon$ -caprolactone copolymers for periodontitis treatment. *Int. J. Pharm.* 2015 ; 491, 335-344.
8. Kassem, A.A., Farid, R.M., Issa, D.A.E., Khalil, D.S., Abd-El-Razzak, M.Y., Saudi, H.I., Eltokhey, H.M., El-zamarany, E.A. Development of mucoadhesive microbeads using thiolated sodium alginate for intrapocket delivery of resveratrol. *Int. J. Pharm.* 2015 ; 487, 305-313.
9. Peerapattana, J., Ngamsupsiri, T., Cheucharoenwasuchai, N., Saikaew, C. Optimization of metronidazole sustained-release films using D-optimal design. *Int. J. Pharm.* 2015 ; 484, 1-7.
10. Zupancic, S., Baumgartner, S., Lic, Z., Petelin, M., Kristl, J. Local delivery of resveratrol using polycaprolactone nanofibers for treatment of periodontal disease. *JDDST.* 2015 ; 30, 408-416.

11. Hiltunen, A.K., Skogman, M.E., Rosenqvist, K., Juvonen, H., Ihalainen, P., Peltonen, J., Juppo, A., Fallarero, A. Bioactive glass combined with bisphosphonates provides protection against biofilms formed by the periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Int. J. Pharm.* 2016 ; 501, 211-220.
12. Schwach-Abdellaoui, K., Vivien-Castioni, N., Gurny, R. Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000 ; 50, 83-99.
13. Vyas, S.P., Sihorkar, V., Mishra, V. Controlled and targeted drug delivery strategies towards intraperiodontal pocket diseases. *J. Clin. Pharm. Ther.* 2000 ; 25, 21-42.
14. Do, M.P., Neut, C., Delcourt, E., Seixas Certo, T., Siepmann, J., Siepmann, F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2014 ; 88, 342-350.
15. Zandbergen, D., Slot, D.E., Cobb, C.M., Van der Weijden, F.A. The clinical effect of scaling and root planing and the concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole: a systematic review. *J. Periodontol.* 2013 ; 84, 332-351.
16. Matesanz-Pérez, P., García-Gargallo, M., Figuero, E., Bascones-Martínez, A., Sanz, M., Herrera, D. A systematic review on the effects of local antimicrobials as adjuncts to subgingival debridement, compared with subgingival debridement alone, in the treatment of chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 2013 ; 40, 227-241.
17. Jeffcoat, M.K., Bray, K.S., Ciancio, S.G., Dentino, A.R., et al. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J. Periodontol.* 1998 ; 69, 989-997.
18. Heasman, P.A., Heasman, L., Stacey, F., McCracken, G.I. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J. Clin. Periodontol.* 2001 ; 28, 90-95.
19. Paolantonio, M., D'Ercole, S., Pilloni, A., D'Archivio, D., et al. Clinical, microbiologic, and biochemical effects of subgingival administration of a Xanthan-based chlorhexidine gel in the treatment of periodontitis: a randomized multicenter trial. *J. Periodontol.* 2009 ; 80, 1479-1492.
20. Kempe, S., Maeder, K. In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J. Control. Release.* 2012 161, 668-679.



21. Kranz, H., Bodmeier, R. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2007 ; 332, 107-114.
22. Kranz, H., Bodmeier, R. Structure formation and characterization of injectable drug loaded biodegradable devices: in situ implants versus in situ microparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008 ; 34, 164-172.
23. Do, M.P., Neut, C., Metz, H., Delcourt, E., et al. Insitu forming composite implants for periodontitis treatment: How the formulation determines system performance. *Int. J. Pharm.* 2015 ; 486, 38-51.
24. Do, M.P., Neut, C., Metz, H., Delcourt, E., et al. Mechanistic analysis of PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for periodontitis treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2015 ; 94, 273-283.
25. Texture Technologies Corp and by Stable Micro Systems, Ltd., Hamilton, MA, USA; <http://texturetechnologies.com/texture-profile-analysis/texture-profile-analysis.php> (accessed 18 September 2016).
26. Jones, D.S., Woolfson, A.D., Djokic, J., Coulter, W.A. Development and mechanical characterization of bioadhesive semi-solid, polymeric systems containing tetracycline for the treatment of periodontal diseases. *Pharm. Res.* 1996 ; 13, 1734-1738.
27. Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., O'Neill, M.J. Mucoadhesive, syringeable drug delivery systems for controlled application of metronidazole to the periodontal pocket: In vitro release kinetics, syringeability, mechanical and mucoadhesive properties. *J. Control. Release.* 1997 ; 49, 71-79.
28. Jones, D.S., Irwin, C.R., Woolfson, A.D., Djokic, J., Adams, V. Physicochemical characterization and preliminary in vivo efficacy of bioadhesive, semisolid formulations containing flurbiprofen for the treatment of gingivitis. *J. Pharm. Sci.* 1999 ; 88, 592-598.
29. Roskos, K.V., Fritzing, B.K., Rao, S.S., Armitage, G.C., Heller, J. Development of a drug delivery system for the treatment of periodontal disease based on bioerodible poly(ortho esters). *Biomaterials.* 1995 ; 16, 313-317.
30. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):89-100.

**CHAPITRE II**

**NOVEL *IN-SITU* FORMING IMPLANTS WITH A DUAL ANTIMICROBIAL AND  
ANTI-INFLAMMATORY EFFECT FOR LOCAL PERIODONTITIS TREATMENT**

*K. Agossa<sup>1</sup>, A. Delepierre<sup>1</sup>, M. Lizambard<sup>1</sup>, E. Delcourt-Debruyne<sup>1</sup>, J. Siepmann<sup>1</sup>,  
F. Siepmann<sup>1\*</sup>, C. Neut<sup>2</sup>*

*1 Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008 - Controlled Drug Delivery Systems and  
Biomaterials, F-59000 Lille, France*

*2 Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U995 - LIRIC - Lille Inflammation Research  
International Centre, Lille, France.*

## **Abstract**

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammation of tooth supporting tissues, associated to bacterial dysbiosis and characterised by bone and soft tissue destruction, leading to finally tooth loss. Local antimicrobials delivery systems have been used as adjuvant to the conventional mechanical debridement in periodontal treatment. In practice, the major drawback of such local drug delivery systems administered into periodontal pockets is a premature expulsion from the site of action due to poor adhesive properties. PLGA-HPMC in-situ forming implants (ISFI) provide improved adhesive properties to human teeth compared to the commercial products. This is expected to improve the residence time of the system in periodontal pockets. In the present study we proposed a novel ISFI loaded with both chlorhexidine and ibuprofen providing a dual antimicrobial and anti-inflammatory activity. The aim was to assess the antibacterial activity of this formulation on periodontal pathogens and evaluate the effect of the drug loading on the drug release profile and the mechanical key properties including syringeability and textural parameters. The antimicrobial activity was studied and the potential impact of the addition of Ibu on the antimicrobial properties of Chx was investigated using agar-well diffusion test, time-kill study and growth curve method. A commercially available gel used for local periodontitis treatment and loaded with chlorhexidine was used for reason of comparison. The proposed novel ISFI shows a strong and rapid antibacterial activity on all the selected pathogens while maintaining suitable mechanical properties and a controlled release of both the incorporated drugs for many days. Interestingly the addition of ibuprofen did not reduce the desired antimicrobial effect of chlorhexidine.

Keywords: in-situ forming implant; antimicrobial properties; periodontitis; local controlled drug release; PLGA

## 1. Introduction

Periodontitis is a chronic multifactorial inflammation of tooth supporting tissues, associated to bacterial dysbiosis and characterised by bone and soft tissue destruction, leading to finally tooth loss (1). Despite considerable progress has been achieved in the past few decades in the prevention and treatment of oral conditions, the global burden of periodontal diseases remain high since periodontitis comes to the 6th place of the most prevalent diseases worldwide (2). Eke *et al.* reported that over 47% of the adults in the United States (64.7 million subjects) likely had periodontitis in 2009/2010 including 15% of severe and generalized forms of the disease (3). The impact of periodontitis at individual and public health level is considerable. In fact, periodontitis is the first cause of tooth loss in adults and is responsible for a major portion of the 442 billion USD/year cost for oral diseases (4-6).

The oral microbiota includes a large community superior to 700 phylotypes that plays a critical role in the pathogenesis of periodontal diseases (7). Bacteria forming biofilms covering the dental root surface in the subgingival area are considered as the primary cause of periodontal diseases (8-10). Cluster analysis demonstrated that pathogens in the subgingival plaque are structured in complexes, consisted of tightly related groups of bacteria which can contribute in different way to the pathogenicity of the microbial community through a broad range of complex interactions (11,12). Certain species such as *Streptococcus spp.* and *Actinomyces spp* initiate the biofilm formation by interacting directly with the salivary pellicle on newly available tooth surfaces. Moreover, they provide unique receptor sites for later more pathogenic bacteria such as *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis* which is considered as the “keystone” pathogen in periodontal diseases (7,11,12).

The basic aim of the treatment of periodontitis is to control the infection by lowering the bacterial count in periodontal pockets, thus promoting the resolution of the inflammation. For this purpose, systemic and local antimicrobials especially antibiotics have been used as adjuvant to the conventional mechanical debridement of the periodontal pockets (13,14). Unfortunately, drug partitioning into the contents of periodontal pockets, is limited when using systemic administration routes. Consequently, high drug doses are required, resulting in considerable drug concentrations in the rest of the human body and an important risk of undesired side effects. In addition, the use of antibiotics during prolonged periods of time

can lead to the formation of bacterial resistances against these drugs. This is highly undesirable in the context of the growing inefficiency of more and more antibiotic drugs against life-threatening diseases due to bacterial resistances. To avoid this drug delivery systems, which release a non-antibiotic active agent directly at the site of action are desirable. Antiseptics such as chlorhexidine offer an interesting potential to achieve this goal (15-17).

Recently, a better understanding of the contribution of the host-immune inflammatory response in the progression of periodontal tissue destruction has increased the investigation of the use of anti-inflammatory and immunomodulating drugs as adjunctive therapy to the periodontal treatment (18,19). Promising results have been reported in preclinical and clinical studies by using antiproteinases, inhibitors of bone resorption, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), statins and specialized pro-resolving mediators (18-22). *In vitro* and *in vivo* studies support the ability of NSAIDs to reduce prostanoïd production by inhibiting cyclooxygenases, leading to a suppression of osteoclast differentiation and, consequently, a decreased alveolar bone resorption which is the primary cause of tooth loss in patients suffering from periodontitis (18,19, 22-24).

In practice, one of the major drawback of drug delivery systems administered into periodontal pockets is a premature, accidental expulsion from the site of action due to mechanical stress generated during tooth brushing or chewing. PLGA-HPMC in-situ forming implants (ISFI) may help to overcome this barrier. In fact, they provide improved textural properties and bioadhesion to human teeth compared to commercial products (25-28). The risk of undesirable loss of the formulations from the site of action can be expected to be substantially reduced. We recently proposed a novel ISFI loaded with chlorhexidine dihydrochloride and Ibuprofen to provide a dual antibacterial and anti-inflammatory activity. The aim of this study was to: (i) assess the antibacterial activity of these novel ISFI while evaluating the effects of potential interactions between Chx and Ibu, (ii) assess the impact of the drug loading on the syringeability, textural properties, swelling behavior and drug release of the implants.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA, Resomer RG 502H; Evonik, Darmstadt, Germany) ; acetyltributyl citrate (ATBC; Morflex, Greensboro, NC, USA); hydroxypropyl methylcellulose (HPMC, Methocel, E50; Colorcon, Dartford, UK); N-methyl pyrrolidone (NMP, 99%; Acros94organics, Geel, Belgium); chlorhexidine dihydrochloride (Evonik, Hanau, Germany); ibuprofène (Ibu; BASF, Ludwigshafen, Germany); agarose (GenAgarose LE; Genaxxon BioScience, Ulm, Germany); Columbia agar base and agar (Oxoid, Basingstoke, UK); defibrinated horse blood (E&O Laboratories, Burnhouse, UK); Chlo-site (1% chlorhexidine dihydrochloride; 0.5% chlorhexidine digluconate, xanthan gum; Ghimas, Casalecchio di Reno, Italy);

### 2.2. Preparation of liquid in-situ forming implant formulations

PLGA (28% w/w, based on the total liquid formulation without drug) was dissolved in NMP at room temperature for 30 min under stirring in a glass vial. ATBC (10% w/w, based on the PLGA mass) and HPMC (10 or 20% w/w, based on the PLGA mass) were added and the mixture was vortexed for 3 min, followed by standing for 3 h at room temperature. Subsequently, chlorhexidine dihydrochloride and Ibuprofen (0.5% ; 2% ; 8% w/w, based on the total liquid formulation without drug) was added, and the mixture vortexed for 15 min, followed by standing for 3 h at room temperature. The formulations were stored at 2-8 °C in a refrigerator and protected from light to avoid drug degradation until further use.

### 2.3. Microbiological tests

For these tests, the pure bacterial strains (*Streptococcus spp.*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) and clinical samples studied were provided from the collection of the Laboratory of Bacteriology of the College of Pharmacy, University of Lille, France obtained from patients suffering from periodontitis.

#### 2.3.1. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC)

The broth microdilution method was used to determine the bacteria minimal inhibitory concentration (MIC) to Chx and Ibu. Briefly a 24-well flat bottom microplate was used with

an assay volume of 2mL/well. Ten concentrations of each drug (1 to 512 µg/mL) were used. First, Wilkins-West liquid medium (WWL) was added (1.6 mL/well) to each well. The Chx (or Ibu) 5120µg/mL was serially diluted two-fold in distilled water and, 0.2 mL was added to the corresponding well. Finally, the microplates were inoculated with 0.2 mL/well of fresh bacteria culture at a concentration of 10<sup>6</sup> cells/mL and incubated at 37°C under anaerobic condition. The MIC was defined as the lowest concentration that inhibit the visible growth of bacteria (turbidity) after 48h. The minimal bactericidal concentration (MBC) was determined by the subculture of 100 µL from the wells with no visible bacterial growth. The lowest drug concentration with no bacterial growth after 48h was defined as MBC.

### 2.3.2. Agar well diffusion

The in vitro efficacy of the investigated implants (Chx/Ibu %: 0; 0.5; 2; 8) and the marketed product (Chlo-Site) against bacteria associated with periodontitis was assessed using the agar-well diffusion method. Briefly, the following bacteria suspension *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus constellatus*, *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella dispar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium naviforme*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* (and clinical samples) were inoculated (300 µL, 10<sup>5</sup> cells/mL) onto Columbia agar or defibrinated horse blood enriched Columbia agar (5% v/v) casted into Petri dishes (16x16 cm). A cylindrical hole (diameter = 6 mm) was subsequently made at the center of the agar, and filled with 50µL of liquid formulation using a standard syringe. Upon solvent exchange, the implants formed in situ. The Petri dishes were incubated for four days under optimum culture conditions (35 °C, anaerobic atmosphere) (Whitley A85 workstation, Don Whitley Scientific, West Yorkshire, UK). The diameter of the observed bacteria growth inhibition zones around the center of the Petri dishes was measured. To evaluate the effect of the presence of blood on the bacteria growth inhibition zone, the same experiment was conducted on three different bacteria (*S. sanguinis*, *V. Dispar*, *F. nucleatum*) using both media (Columbia agar and blood enriched Columbia agar) and a range of concentration of Chx (1.25; 12.5; 25; 50; 100; 200; 400 mg/L). Each experiment was conducted in triplicate.

### 2.3.3. Time Kill Study

To determine the time-dependent rate of reduction of the bacteria by the investigated implants and the marketed product, a time-kill kinetics assay was performed (29). The bacteria surviving population was counted after exposure to the investigated implants (Chx/Ibu %: 0.5; 2; 8) and the marketed product (Chlo-Site) at five different time points (1, 2, 3, 6 and 24h) and compared to the placebo (drug-free ISFI). Five tubes (Falcon ref) were prepared each containing 1mL of the investigated implant (or Chlo-Site) pre-incubated for 24h at 37°C with WWL to allow the implants hardening by solvent exchange. After 24h the liquid was removed, 8mL of fresh WWL media was added and each tube was inoculated with 1mL of bacteria suspension (10<sup>4</sup>-10<sup>6</sup> bacteria/mL). One hundred (100 µL) of tenfold dilution in RC diluent was plated on Columbia agar at the different time points indicated above. Colonies were counted after 24 hours of incubation at 37°C. Results are expressed as log CFU/mL. Each experiment was conducted in triplicate.

### 2.3.4. Growth Curves

To investigate the effect of the addition of Ibu on the antimicrobial activity of Chx at inhibitory and subinhibitory concentrations (4xMIC, MIC, MIC/4) the growth curve method was performed (29). Eight tubes (control, 4xMIC, MIC, MIC/4, Ibu, 4xMIC+Ibu, MIC+Ibu, MIC/4+Ibu) were prepared, each containing 8mL of WWL medium (BH), 1mL of bacterial suspension, and 1mL of the corresponding drug concentration. The concentration of Ibu (50 µg/mL) was defined according to the drug release profile of the investigated implants. The tubes were incubated at 37°C. One hundred microliter (100 µL) of each tube were sampled after 2, 4, 6, 7, and 24 hours, and plated on Columbia agar after tenfold serial dilutions. Colonies were counted after incubation at 37°C for 24 h and counts are expressed as log CFU/mL. The experiment was conducted in triplicate.

## 2.4. Syringeability

The syringeability of ISFI was measured as previously described (28). For reasons of comparison, the syringeability of water was also studied. Briefly, a 2 mL Emdogain syringe (Straumann, Malmoe, Sweden 19G cannula, 35 mm length) was filled with 1.5 mL formulation or pure water. The cylindrical probe (6 mm in diameter) of a texture analyzer



was used to drive its piston 10 mm downward (load cell: 50 kg, TA.XT.Plus; Stable Micro Systems, Surrey,116UK). Force-distance profiles were recorded and the work required to expulse the liquid formulation was calculated. The experiments were conducted in triplicate.

## **2.5. Texture profile analysis**

The experimental setup applied for these measurements was previously publised (28). Briefly, an agarose gel was cast into a Petri dish, a cylindrical hole (diameter = 6 mm) was created at its center and filled with 250  $\mu$ L formulation ISFI. Incubation for 24 h at 37°C allowed for hardening of the in-situ forming implant. Then, two compression-traction cycles were run with a texture analyzer (TA.XT.Plus, load125cell: 1 kg): A spherical probe (diameter = 6 mm) was driven downward at a constant speed (2 mm/s). Once in contact with the formulation, force-displacement profiles were recorded. The probe stopped when its penetration depth was equal to half of the sample's height. It was then driven upward (2 mm/s) until the position was reached, at which the probe had had its first contact with the formulation. This position was held for 15 s before a second compression-traction cycle was run, which was identical to the first one. Based on these measurements, the hardness, springiness and resilience of the formulations were calculated. All tests were performed in triplicate at room temperature.

## **2.6. Swelling/shrinking behavior**

ISFI formulations (and Chlo-site for reasons of comparison) were injected into holes (diameter: 6 mm) at the center of agarose gels in Petri dishes. After 5 min or 24 h at 37 °C, macroscopic pictures were taken with an optical image analysis system (Nikon SMZ-U, Nikon, Tokyo, Japan), equipped<sup>184</sup>with a Zeiss camera (AxioCam ICc 1, Zeiss, Jena, Germany) in a side view modus.

## **2.7. Drug release measurements**

One hundred microliter of the respective formulation was injected at the bottom of an Eppendorf vial using a standard syringe. One milliliter preheated (37 °C) deionized water was carefully added using a pipette, initiating solvent exchange and implant formation. The vials were horizontally shaken at 37 °C at 80 rpm (GFL 3033; Gesellschaft fuer Labortechnik,

Burgwedel, Germany). Every 24h, the bulk fluid was completely withdrawn and replaced with fresh deionized water. The drug content in the samples was determined using HPLC-UV (Waters Alliance 2695 separation module, Waters 2489 UV/vis detector). Each experiment was conducted in triplicate, and the results are presented as mean values  $\pm$  standard deviation.

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Microbiological tests**

The antibacterial activity of an intra-pocket drug delivery system is obviously a key parameter to control the infection in the affected sites. In this study, we first evaluated the susceptibility (MIC and MBC) of different periodontal pathogens to the drugs (Chx and Ibu), then we compared the antibacterial activity of different ISFI (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8, or drug-free) to Chlo-Site, a Chx loaded marketed product. Two tests were applied: an agar-well diffusion test (comparing the diameters of the bacterial growth inhibition zones – BGI), and a kill-time test (counting the surviving bacteria after incubation for 1, 2, 3, 6 and 24 h. The potential effect (antagonism, addition, synergism) of the addition of Ibu on the antimicrobial activity of Chx was also studied by comparing the bacterial growth curves at inhibitory and subinhibitory concentrations (4xCMI, CMI, CMI/4) of Chx alone or Chx + Ibu solutions. All the bacteria were isolated from periodontal pockets of patients suffering from periodontitis. Pure strains and multispecies clinical samples were used.

##### **3.1.1. Minimal inhibitory (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC)**

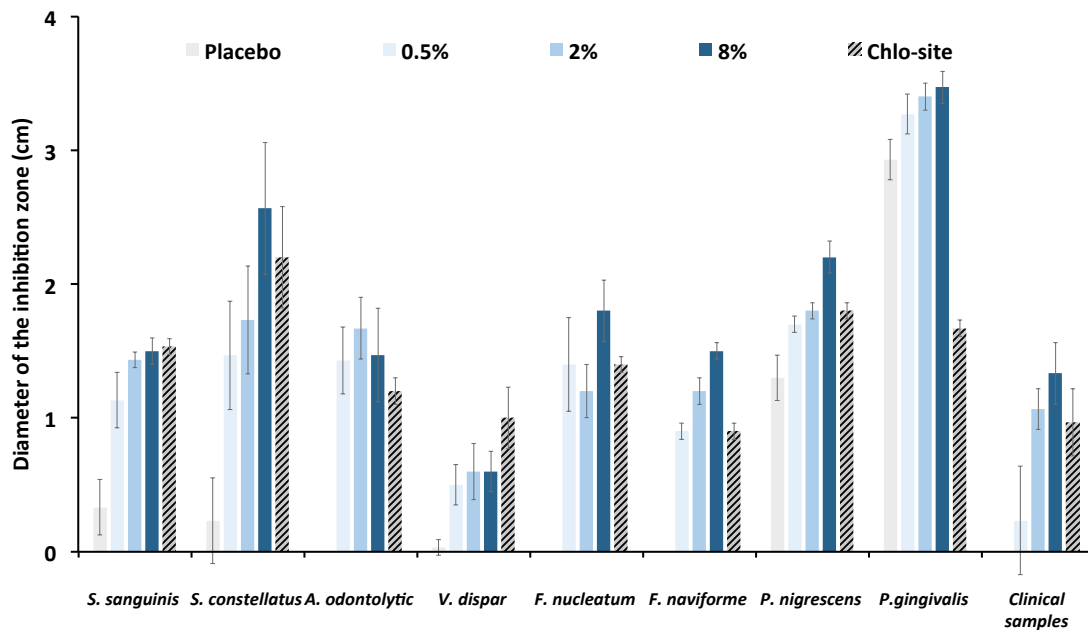
Table 1 shows the MIC and MBC concentrations of Chx for the selected periodontal pathogens. All the bacteria strains were inhibited or killed by low concentrations of Chx ranging from 2 to 32 mg/L. This confirms the large spectrum of antimicrobial activity of this drug. Ibuprofen showed no antimicrobial effect at the concentrations studied.

**Table 1.** MIC and MBC values of the selected bacteria obtained by broth microdilution method. The MIC was not determined (nd) for *P. gingivalis* because the turbidity can not be observed in blood-supplemented medium.

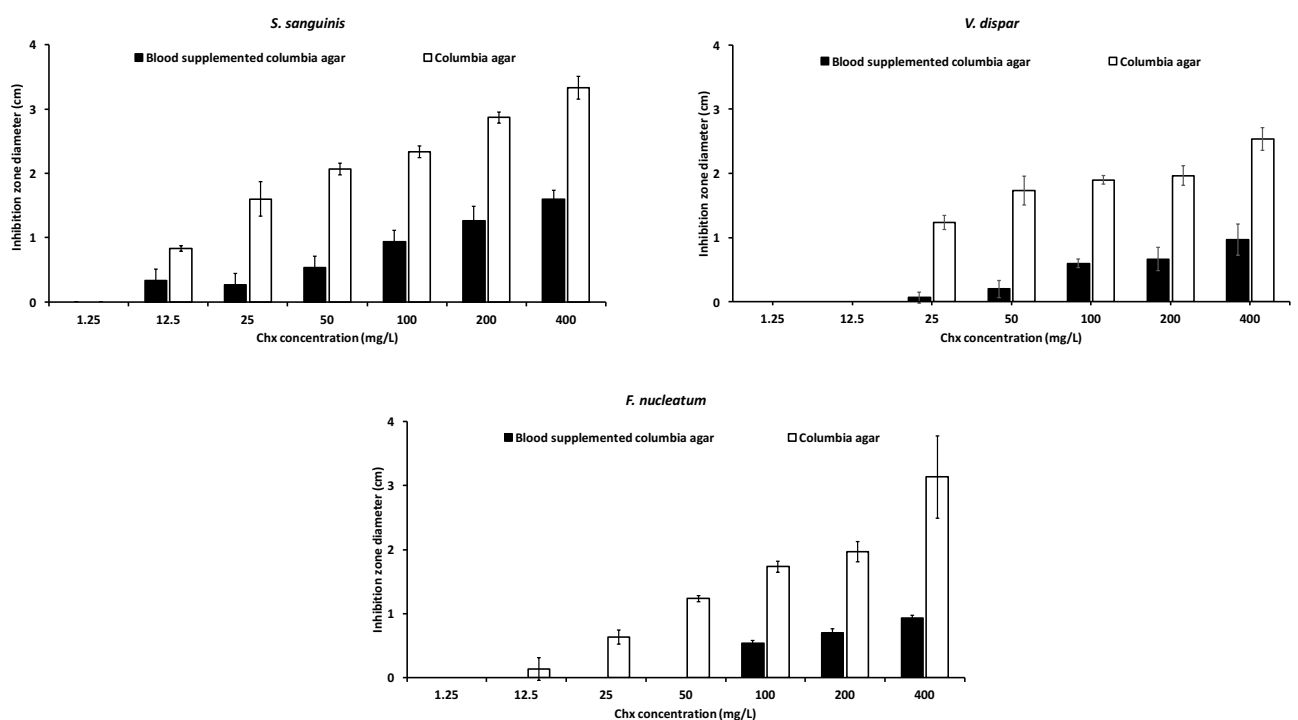
Bacteria	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. constellatus</i>	<i>V. dispar</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>P. gingivalis</i>
MIC (mg/L)	8	8	2	1	nd
MBC (mg/L)	16	16	4	2	32

### 3.1.2. Agar well diffusion

Fig 1. shows the bacterial growth inhibition zone observed with the ISFI (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8, or drug-free), Chlo-Site (a Chx loaded marketed product) and the placebo (drug-free ISFI). All the investigated drug-loaded systems clearly inhibit the bacterial growth on all the selected pure bacterial strains and the clinical multispecies samples also. The diameters of the inhibition zones correlated well to the Chx loading of the systems. The placebo (drug-free ISFI) did not show any inhibition of bacteria growth except for *P. nigrescens* and *P. gingivalis*, which are two strictly anaerobic and fastidious bacteria. A potential intrinsic antibacterial activity of the polymer (PLGA) and/or the solvent (NMP) or the exposure to small amount of oxygen during the experiment may explain this result. Fig 2. shows the effect of the presence of blood on the antibacterial activity of the Chx. Briefly, differently concentrated Chx solutions were injected into cylindrical hole made on Columbia or blood-enriched Columbia agar inoculated with bacteria. The Chx shows a clear dose-dependant activity. Importantly, the presence of blood significantly reduced (2 to 3-fold) the diameter of the bacterial growth inhibition zone, indicating a strong reduction of the antimicrobial effect of Chx in presence of blood probably due to a protein binding interaction (30). Based on the diffusion test, all the investigated ISFI loaded with both Chx and and Ibu (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8) were at least as effective as the marketed product, a gel based on xanthan gum, containing 1.5% antiseptic agent (Chx digluconate + Chx dihydrochloride). To further understand the kinetic of the antimicrobial effect, time kill study was performed.



**Fig 1.** Agar well diffusion: diameters of the bacterial growth inhibition zone for different ISFI formulations (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8) on bacteria isolated from periodontal pockets. A chlorhexidine loaded marketed gel (Chlo-Site<sup>®</sup>) and a drug-free ISFI were used as controls.



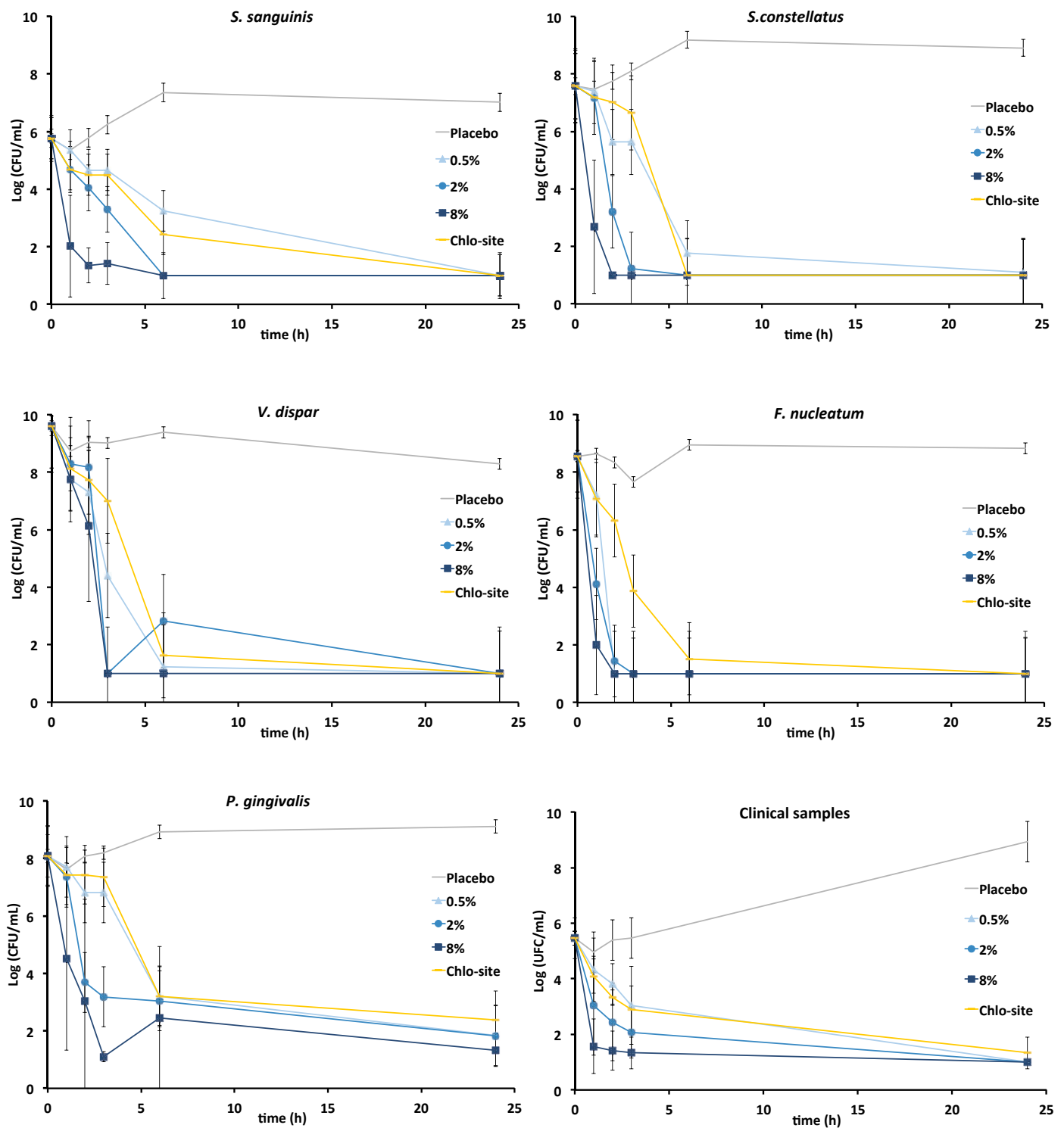
**Fig 2.** Agar well diffusion test. Effect of blood on the activity of chlorhexidine. The diameters of the bacterial growth inhibition zone are presented for differently concentrated chlorhexidine solutions (from 1.25 to 400 mg/L) on three different bacteria inoculated on columbia agar plates (white bars) or blood supplemented columbia agar (black bars).

### 3.1.3. Time Kill Study

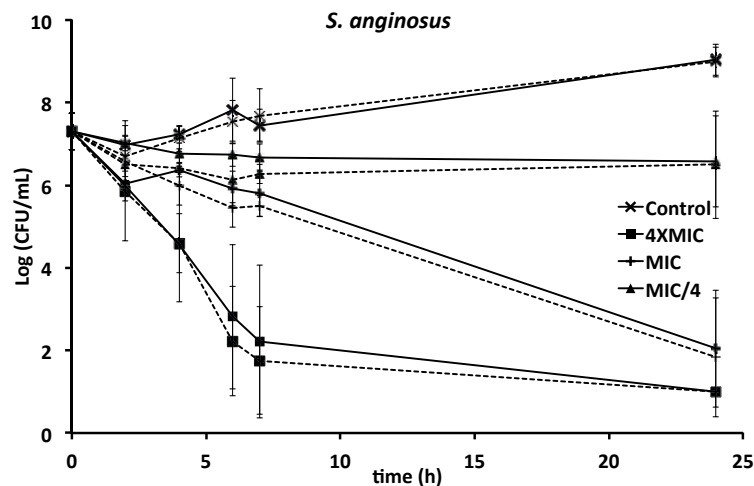
An effective and rapid control of the bacteria infection into periodontal pockets may help to a faster wound healing and clinical periodontal pocket closure. We compared the kinetics of the bactericidal effect of different ISFI formulations (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8, or drug-free) to Chlo-Site, a Chx loaded marketed product and drug-free ISFI as a negative control. Fig 3 shows the kill-time curves of five different bacteria from the subgingival microflora of periodontal patients including *P. gingivalis* considered as the “key-stone” pathogen in periodontal diseases (7). Clinical multispecies samples from patients suffering from periodontitis were also used. The faster reduction of the bacterial population was observed very clearly with % Chx/Ibu: 2% and 8% ISFI. A strong decrease ( $\geq 6$  log CFU/mL) of the bacterial population count was observed within 1 to 4 hours in all bacteria and the clinical samples. The drug-free ISFI showed no bactericidal effect. The bacteria count reached the limit of detectability (<10 bacteria/mL) within 6 and 24h for % Chx/Ibu: 0.5 ISFI and Chlo-Site. Interestingly, the PLGA-HPMC based ISFI loaded with % Chx/Ibu: 0.5 shows a similar or more rapid bactericidal effect than the marketed product, a xanthan gel loaded with 1.5% of Chx digluconate and dihydrochloride. This may be due to a different drug release profile related to the polymer or an improvement of the activity of Chx by the addition of Ibu.

### 3.1.4. Growth Curves

The proposed ISFI contains both Chx and Ibu to provide a dual antibacterial and anti-inflammatory activity. Such a combination of different types of drugs has never been studied and the potential effect of Ibu on the antimicrobial effect of Chx (antagonism, addition, synergism) is unknown. To evaluate a potential interaction between Chx and Ibu, three inhibitory and subinhibitory concentrations of Chx (4xMIC, MIC, MIC/4) were tested alone or in presence of Ibu (4xMIC+Ibu, MIC+Ibu, MIC/4+Ibu) for their effect on the growth of a bacteria isolated from periodontal pocket (*S. anginosus*). The concentration of Ibu (50  $\mu\text{g/mL}$ ) was defined according to the drug release profile of the investigated implants. Ibuprofen alone and distilled water were used as positive and negative control. The results are showed in Fig 4. At the MIC and 4xCMI a decrease in bacterial population counts was observed, showing the bactericidal effect of Chx in accordance with the kill-time study. Importantly, the addition of Ibu did not alter the antimicrobial activity of Chx.



**Fig 3.** Kill-time kinetic. The effect of different ISFI formulations (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8) on the bacterial count of single periodontal pathogens over 24 hours is presented. Clinical samples (a mix of bacteria) directly collected from patients were also used. A chlorhexidine loaded marketed gel (Chlo-Site<sup>®</sup>) and a drug-free ISFI were used for reason of comparison.



**Fig 4.** The presented growth curves show the effect of the chlorhexidine alone (full line) or combined to ibuprofen (dotted line) on the bacterial count of *S. anginosus*. Different concentrations of chlorhexidine corresponding to 4xMIC, MIC and MIC/4 of the bacteria studied were used (full line). The dotted curves correspond to the addition of a pre-defined concentration of ibuprofen (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) determined according to the release profile ISFI.

### 3.2. Syringeability

The syringeability is a key mechanical parameter to be considered in practice by the clinician. If the forces required to inject the formulation into periodontal pockets are high, the treatment becomes time-consuming. As shown in Fig 5a, when the drug load is increased, the force required to expulse the formulation increased also. This is consistent with our previous results on PLGA-HPMC ISFI loaded with Chx alone (28). The observed drug loading-dependent syringeability variation can be due to the poor solubility of the chlorhexidine which is dispersed in the polymeric solution. An increased drug ratio may have increased the viscosity of the liquid formulation. Importantly, the force required to inject the different liquid formulations remains similar or lower than the reported values for two commercially available drug products for periodontitis treatment: Parocline and Chlo-site (21).

### 3.3. Texture profile analysis

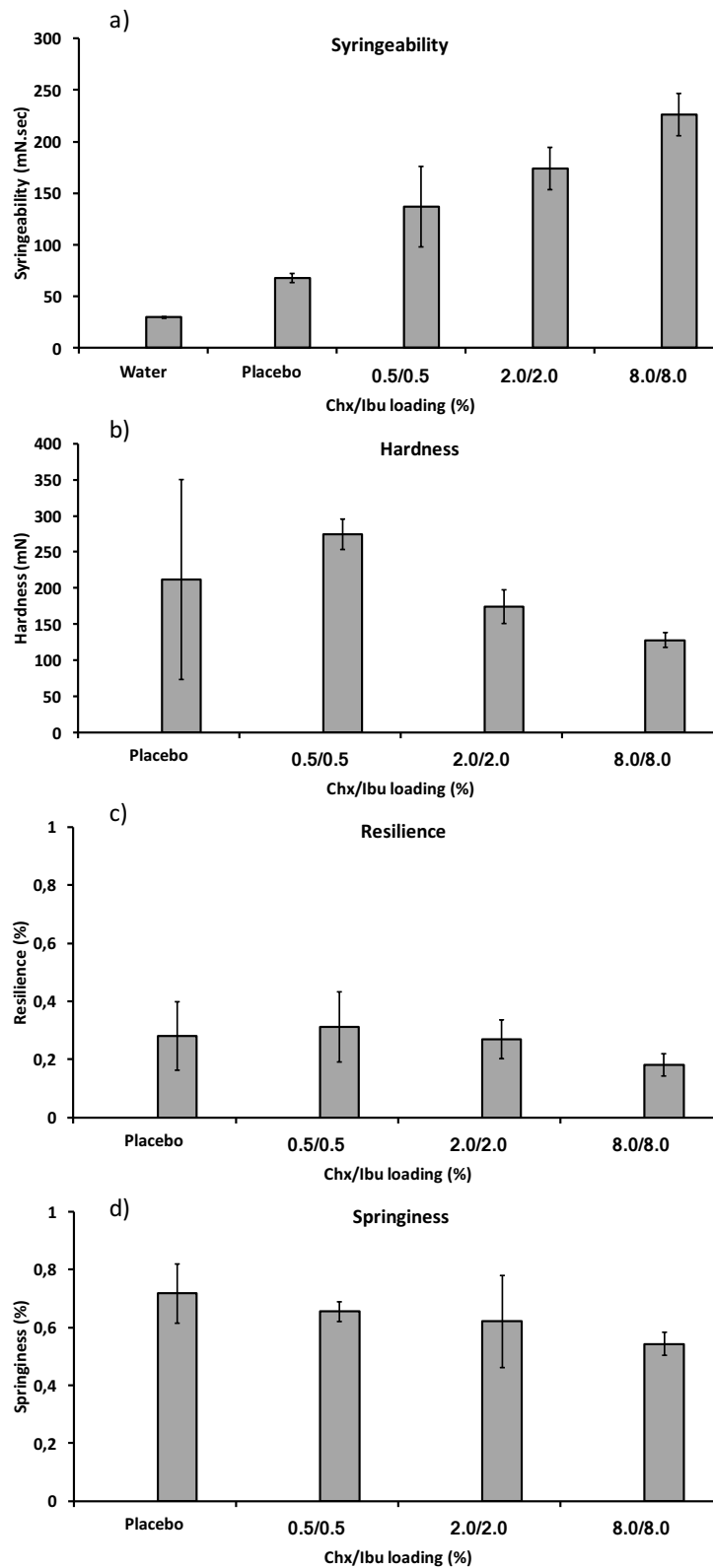
The proposed PLGA-HPMC liquid formulations harden into the periodontal pocket to form a customized solid implant which fit exactly the dimensions of the pocket. Textural properties of the solid form are crucial to assure a reliable residence time and avoid premature

expulsion from the site of action. For this reason, a texture profile analysis, based on a double compression-relaxation cycles using the spherical probe of a texture analyser (TA.XT.Plus) was performed in this study. The hardness, springiness and resilience of the solid implants were calculated based on the force-time plot obtained during the test. As it can be seen in Fig 5., the hardness of the ISFI generally decreased when the drug load increased. In practice, the hardness should not be too high to allow the periodontal pocket to deform with time during tissue healing. The springiness and the resilience give an idea of the plasticity/elasticity of the solid implants. In practice, the formulations administered into the periodontal pockets should also exhibit moderate resilience and springiness values, in order to allow the pocket dimension changes during tissue healing. As it can be seen, resilience and springiness of the proposed implants were not very much affected by the drug loading. The measured resilience and springiness values are remarkably consistent with those previously reported for ISFI loaded with Chx alone at different concentration of drug (10% and 20%) and with addition of 10 or 20% of HPMC (28). This suggests that the drug did not substantially affect the plastic/elastic behaviour of the PLGA implants.

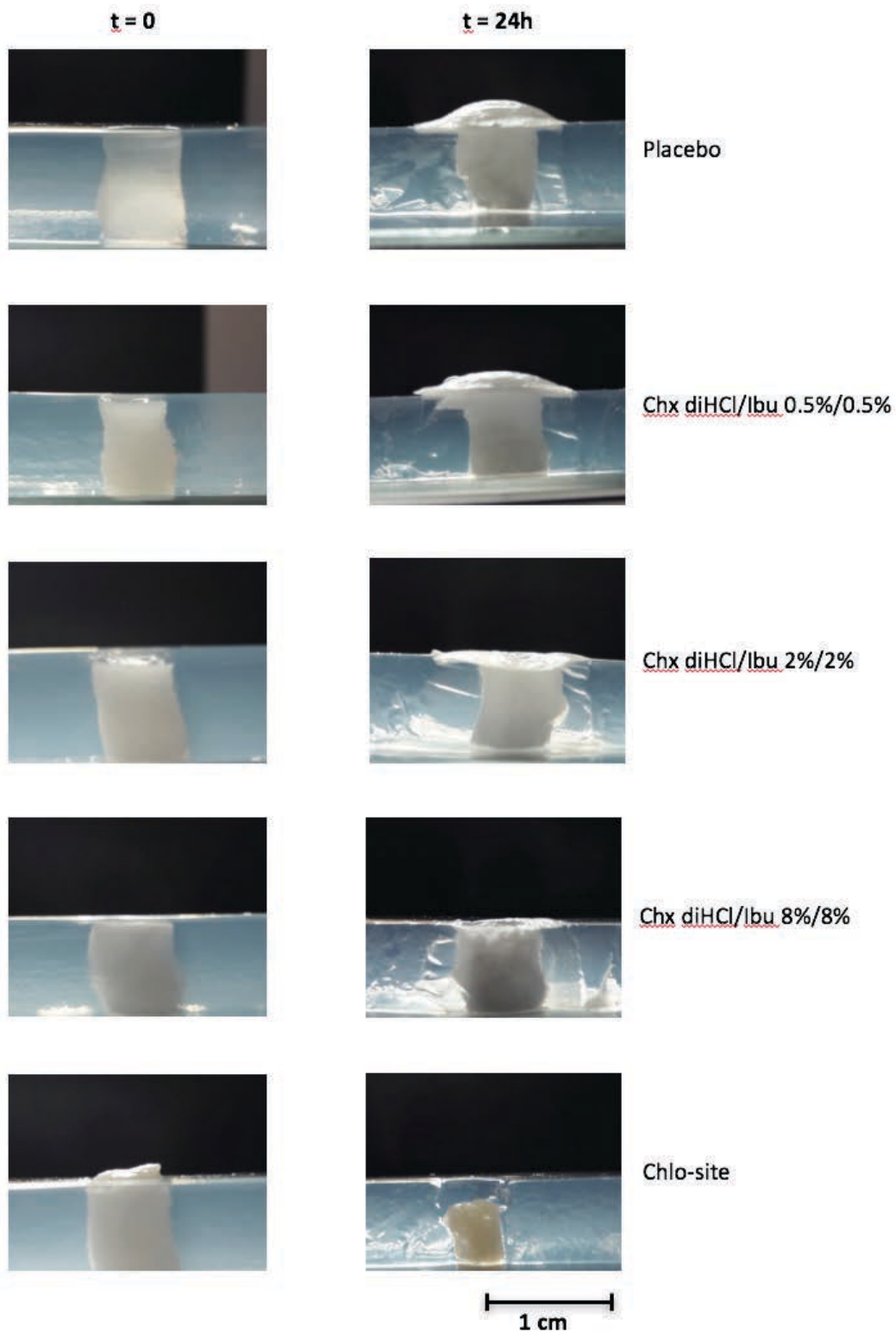
### **3.4. Macroscopic swelling/shrinking**

The swelling/shrinking behaviour is a critical aspect for formulations administered into periodontal pockets, since major changes of the dimension of the implants are likely to increase the risk of premature expulsion from the site of action. To compare the swelling/shrinking of the proposed ISFI and Chlo-site the commercially available gel, macroscopic pictures of the formulations injected into hole at the center of agarose gels were taken after 5 min and 24h incubation at 37°C in a side view modus. After 24h drug-free ISFI shows a moderate swelling but, when the drug loading increased, the swelling is remarkably reduced (Fig 6.). Conversely, the marketed gel (Chlo-Site) collapses substantially after 24h incubation. This feature has been previously reported and is likely to increase the risk of undesirable expulsion from the periodontal pocket over time (28).





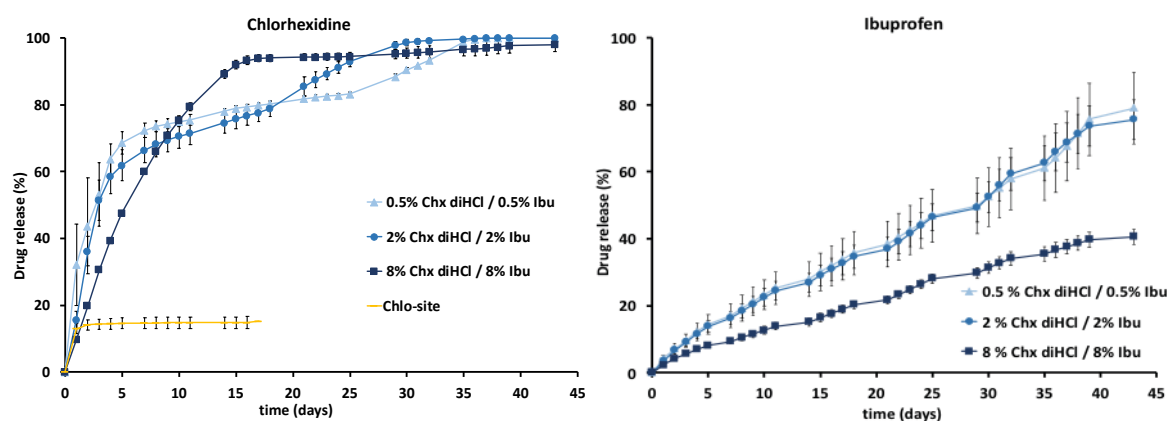
**Fig 5.** Mechanical key properties of the investigated ISFI formulations (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8) obtained by a) syringeability test and texture profile analysis: b) Hardness, c) Resilience, and d) Springiness.



**Fig 6.** Macroscopic pictures (side views) of implants at baseline ( $t = 0$ ) and after 24 h incubation at 37 °C in agarose gels: ISFI (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8), drug-free ISFI (placebo) and Chlo-site. The formulations were injected into holes at the center of agarose gels in Petri dishes.

### 3.5. Drug release measurements

The drug release kinetics of the proposed implants is crucial since the desired pharmacological effect depends logically on the effective release of the drugs. Figure 7 presents the drug release kinetics of the ISFI (%ChX/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8) and a marketed chlorhexidine gel (Chlo-site). The set-up used was a “static model” in which the bulk fluid was completely withdrawn and replaced with fresh medium every 24h to simulate the crevicular fluid flux *in vivo*. Both the drugs (Chx and Ibu) were effectively released for up to 40 days. The 0.5% and 2% ISFI presented an initial burst attributable to the solvent exchange during the implant formation and the swelling of the system. Indeed, the swelling increased the water content of the system and may favour the release of the drug entrapped in the matrix through the water pores. ISFI (%Chx/Ibu: 8/8) presented a slower chlorhexidine release at early times (before 10 days) when compared to 0.5% and 2% ISFI. This may be due to the saturation of the medium. Moreover, the presence of high amounts of ibuprofen makes the system more lipophilic, leading to a better control of the release. For Chlo-site, an initial burst occurred in the first 24h followed by a plateau phase. Only limited amounts of chlorhexidine were released (less than 20%) when compared to the theoretical drug loading of the system. This is probably due to an interaction between the xanthan gum and the chlorhexidine which prevent the drug release. Indeed, the antimicrobial activity observed with the kill-time test suggests that the chlorhexidine is still present in the gel but is probably entrapped into the polymer matrix. The Ibuprofen was released at constant rate with no burst release. The drug release rate was consistent with the limited solubility of the drug.



**Fig 7.** Drug release kinetics (chlorhexidine on the left and ibuprofen on the right) of the ISFI loaded with different concentrations of drugs (% Chx/Ibu: 0.5/0.5; 2/2; 8/8). Chlo-site, a commercial gel loaded with chlorhexidine was studied for reason of comparison.

## 4. Conclusion

The proposed ISFI loaded with both Chx and Ibu are very promising and should contribute in practice to the control of bacterial infection in periodontal pockets, since they show an effective antimicrobial activity against periodontal pathogens and provide appropriate mechanical properties as well as a simultaneous controlled release of both the incorporated drugs. In the future studies the *in vivo* effect will be investigated and the mechanisms underlying the drug release kinetics will be further elucidated.

## Acknowledgements

The authors are very grateful to the ANR (The French National Research Agency) (N° ANR-385 14-CE16-0025-01) and to the INSERM (the French National Institute of Health and Medical Research) (“poste d’accueil 2016” for Kevimy Agossa) for their valuable support.

---

**References**

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 19 2005;366(9499):1809-20.
2. Tonetti MS, Jepsen S, Jin L, Otomo-Corgel J. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *J Clin Periodontol*. 2017;44(5):456-62.
3. Eke, P.I., Dye, B.A., Wei, L., Thornton-Evans, G.O., Genco, R.J. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J. Dent. Res.* 2012 ;91 : 914-920.
4. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*. 2014;93(11):1045-53.
5. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global Burden of Severe Tooth Loss: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*. 2014;93(7 Suppl):20S-28S.
6. Listl S, Galloway J, Mossey PA, Marcenes W. Global Economic Impact of Dental Diseases. *J Dent Res*. 2015;94(10):1355-61.
7. Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*. 2012;27(6):409-19.
8. Loe H, Theilade E, Jensen SB. experimental gingivitis in man. *j periodontol*. 1965;36:177-87.
9. Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis. *Science*. 1 1988;239(4835):55-7.
10. Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol*. 2009;24(6):469-77.

11. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
12. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(2):83-101.
13. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2001;25:77-88.
14. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000.* 2017;75(1):152-88.
15. Jeffcoat, M.K., Bray, K.S., Ciancio, S.G., Dentino, A.R., et al. Adjunctive use of a subgingival controlled-release chlorhexidine chip reduces probing depth and improves attachment level compared with scaling and root planing alone. *J. Periodontol.* 1998 ; 69, 989-997.
16. Heasman, P.A., Heasman, L., Stacey, F., McCracken, G.I. Local delivery of chlorhexidine gluconate (PerioChip) in periodontal maintenance patients. *J. Clin. Periodontol.* 2001 ; 28, 90-95.
17. Paolantonio, M., D'Ercole, S., Pilloni, A., D'Archivio, D., et al. Clinical, microbiologic, and biochemical effects of subgingival administration of a Xanthan-based chlorhexidine gel in the treatment of periodontitis: a randomized multicenter trial. *J. Periodontol.* 2009 ; 80, 1479-1492.
18. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000.* 2017;75(1):317-29.
19. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000.* 2018;76(1):131-49.
20. Tonetti MS, Chapple ILC, Working Group 3 of Seventh European Workshop on Periodontology. Biological approaches to the development of novel periodontal therapies--consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38 Suppl 11:114-8.
21. Meza-Mauricio J, Soto-Peñaloza D, Peñarrocha-Oltra D, Montiel-Company JM, Peruzzo DC. Locally applied statins as adjuvants to non-surgical periodontal treatment for chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2018;22(7):2413-30.

22. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007;43:294-315.
23. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:85-101.
24. Agossa K, Morand DN, Tenenbaum H, Davideau JL, Huck O. Systemic Application of Anti-inflammatory Agents in Periodontal Treatment. *Clin Anti-Inflamm Anti-Allergy Drugs*. 2015;2(1):3-13.
25. Do MP, Neut C, Delcourt E, Seixas Certo T, Siepman J, Siepman F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *Eur J Pharm Biopharm*. 2014;88(2):342-50.
26. Do MP, Neut C, Metz H, Delcourt E, Siepman J, Mäder K, et al. Mechanistic analysis of PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for periodontitis treatment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;94:273-83.
27. Do, M.P., Neut, C., Metz, H., Delcourt, E., et al. Insitu forming composite implants for periodontitis treatment: How the formulation determines system performance. *Int. J. Pharm*. 2015; 486, 38-51.
28. Agossa K, Lizambard M, Rongthong T, Delcourt-Debruyne E, Siepman J, Siepman F. Physical key properties of antibiotic-free, PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for local periodontitis treatment. *Int J Pharm*. 15 2017;521(1-2):282-93.
29. Abedini A, Roumy V, Mahieux S, et al. Rosmarinic Acid and Its Methyl Ester as Antimicrobial Components of the Hydromethanolic Extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:604536.
30. Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res Suppl*. 1973;12:11-6.

**CHAPITRE III**

**EFFECTS OF AN *IN SITU* FORMING IMPLANT ON GINGIVAL WOUND HEALING  
IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PERIODONTITIS**

*F. Batool<sup>1</sup>, K. Agossa<sup>2</sup>, M. Lizambard<sup>2</sup>, IM. Bugueno<sup>1</sup>, N. Benkirane-Jessel<sup>1</sup>,  
H. Tenenbaum<sup>1</sup>, J. Siepmann<sup>2</sup>, F. Siepmann<sup>2</sup>, O. Huck<sup>1</sup>*

*1 INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR  
1260, Regenerative NanoMedicine (RNM), FMTS, 67000 Strasbourg, France*

*2 Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, U1008 - Controlled Drug Delivery Systems and  
Biomaterials, F-59000 Lille, France*



## Abstract

Periodontitis is a destructive bacteria-induced process mediated by a dysregulated inflammatory response which affect the tooth supporting tissues. Recent findings suggest that the inflammation that occur in the early phases as a response to the bacterial challenge contribute to the shift in the subgingival microbiota and the selection of inflammophilic pathogens. Consequently, a better understanding of the role of inflammation in periodontal tissue destruction can offer new opportunities for the treatment of the disease by modulating the host immune response and controlling the bacterial infection as well. We recently developped a novel PLGA-HPMC based in situ forming implant loaded with both chlorhexidine (Chx) and Ibuprofen (Ibu) to provide a dual antibacterial and anti-inflammatory activity. *In vitro*, the novel ISFI presented improved mechanical properties compared to commercial products, an effective antimicrobial activity, and an appropriate drug release kinetics. The aim of the present study was to assess the *in vivo* effect of our system by using an experimental model of periodontitis in mice. This was investigated trough histomorphometric analysis. Experimental periodontitis was treated with intra-pocket administration of different ISFI (% Chx/Ibu 0%, 0.5% and 2%) on the treated sides, whereas, the control sides were left untreated. Mice were sacrificed at 7 and 15 days and the epithelial attachment, fibrous connective tissue level and bone loss were measured. At 7 and 15 days, the ISFI clinically improved periodontal soft tissue healing with a significant increase of the connective tissue attachment level and a corresponding shorter epithelial attachment. The alveolar bone level was not much affected by the ISFI placement

Keywords: in-situ forming implant; animal study; periodontitis; local controlled drug release; PLGA

## 1. Introduction

Periodontitis is a destructive bacteria-induced process mediated by a dysregulated inflammatory response which affects the tooth supporting tissues (1). Since bacteria are considered as the etiological factor of periodontal diseases, the control of the infection by reducing the total bacterial load is the backbone of the periodontal treatment. This is carried out by mechanical removal of the adherent biofilm on dental root surfaces and the adjunctive use of antibiotics or antiseptics. In most the cases, this simple anti-infective strategy is enough to achieve a clinical success with the reduction of the symptoms (gum redness and bleeding, periodontal pocket) and the stability of the disease (2,3). However, periodontal diseases can no longer be considered, and should not be managed merely as an infection leading to tissue destruction. Recent findings suggest that the inflammation that occurs in the early phases as a response to the bacterial challenge contributes to the shift in the subgingival microbiota and the selection of inflammophilic pathogens (4). Furthermore, inflammation and microbial dysbiosis positively reinforce each other because the dysbiotic microbiota requires inflammation to provide nutrients from tissue breakdown (4,5). A better understanding of the pivotal role of inflammation in periodontal tissue destruction can offer new opportunities for the treatment of the disease. In fact, the control of inflammation by modulating the host immune response seems to be a promising way to control the bacterial infection as well (6). The host modulation therapy is based on the use of several anti-inflammatory agents to target specific pathways of inflammation involved in the development of periodontitis (6,7). Among the large variety of molecules involved in the inflammatory cascade, arachidonic acid (AA) metabolites mainly prostaglandins participate in the early phases of inflammation (8). The stimulation by lipopolysaccharide (LPS) a major virulence factor of GRAM-negative periodontal pathogens induces the conversion of AA into prostaglandins via cyclooxygenase (COX) pathways. Higher expression of COX results in increased levels of prostanoids including prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 have been shown to have proinflammatory effects including increased vasodilatation, release of collagenase by inflammatory cells and activation of osteoclasts (8-10). An increase of PGE2 levels was reported in gingival tissues and crevicular fluid of patients suffering from periodontitis and, correlated to the severity of the disease (6,7). Many experiments have shown that the systemic or local administration of non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs) result in

a significant reduction of PGE2 in periodontal tissues. NSAIDs in particular selective inhibitors of the COX isoforms 2 (COX-2) was reported to reduce the magnitude of the inflammatory response and protect from alveolar bone loss (6,7, 11-13). However, local application of NSAIDs have shown less side effects and equal benefits than the systemic route. Thus, this mode of administration should be preferred for periodontal treatment (11). Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) *in-situ* forming implants (ISFI) have been proposed as a vehicle for local drug delivery into periodontal pockets (14,15). These are liquid formulations, which can be easily injected into periodontal pockets, and then generate semi-solid depots with customized geometry (16-18). We recently developed a novel ISFI loaded with both chlorhexidine (Chx) and Ibuprofen (Ibu) to provide a dual antibacterial and anti-inflammatory activity. *In vitro*, the novel ISFI presented improved mechanical properties compared to commercial products (16-18). The risk of premature accidental loss of the formulations from the site of action can be expected to be reduced which is the main shortcoming of current drug delivery systems for periodontitis treatment. Our system additionally provided an effective antimicrobial activity on bacteria isolated from periodontal pockets of patients and showed a controlled release of Chx and Ibu for many weeks. Such ISFI should effectively contribute to control the affected periodontal sites but *in-vivo* correlations are required to further establish its therapeutic efficacy. Pre-clinical animal models can help to better understand the complex cellular and tissue reactions that occur in response to the delivered system (19). The insertion of *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) -infected ligatures in the gingival sulcus of mice has been proposed as a reproducible model of experimental periodontitis showing a tissue breakdown similar to periodontal defects in humans (20). Recent data based on this model showed that a polycaprolactone fibrous membrane loaded with ibuprofen could control inflammatory and migratory gingival cell responses and potentially promote periodontal regeneration (21). The aim of the present study is to assess the *in vivo* effect of a PLGA-ISFI developed to provide a dual antibacterial and anti-inflammatory activity in periodontal pockets through histomorphometric analysis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Experimental periodontitis induction in mouse model

To avoid any potential effects of estrogen, only male mice C57BL/6J (n =32) aged 8 weeks were used in this study. All animals were regularly fed and kept in separate cages. All procedures were approved by the local ethical committee and performed according to the regulations for animal experimentation. Mice were examined to evaluate pain and stress and their weights were monitored daily. Periodontitis was induced in mice by *P. gingivalis*-infected ligatures as described by Saadi-thiers *et al.* (20). The day before induction, sterile black braided (6-0) silk threads were pre-incubated in a culture medium (haemin -5mg/mL- and menadione -1mg/mL- supplemented brain heart infusion medium) containing *P. gingivalis* under anaerobic conditions. On the day of induction, a mixture of ketamine and xylazine was used for anesthesia (0.1ml per 10 grams body weight). After anesthesia, *P. gingivalis* infected silk ligatures were placed around maxillary first molars in the palatal sulcus. To make the first ligature placement easier, an intrasulcular incision to the bone crest contact was made along the first and second molars. The ligature was fixed in place with a drop of glass ionomer cement (Fugii II GC, GC France, Bonneuil sur Marne, France). The intervention was repeated thrice a week for up to 40 days. The quantity of anesthesia being injected was reduced gradually over subsequent inductions for the well-being of the mice.

### 2.2. Treatment of periodontal defect

A sulcular incision was performed along the 1st and 2nd molars and extended a little anteriorly for raising efficiently the flap to gain surgical access. Experimental periodontitis was treated with intra-pocket administration of IBU CHX/PLGA *in-situ* forming depots (placebo, 0.5% and 2%) on the treated sides, whereas, the control sides were left untreated. Mice were euthanized at 7 days (n=16) and 15 days (n=16).

### 2.3. Tissue preparation

Mice were euthanized with an intraperitoneal lethal injection of pentobarbital (100mg/kg) (Centravet). Tissue fixation was performed by intra-cardiac perfusion with a solution containing 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS (pH 7.4). Afterwards, maxillae were dissected and post-fixed by immersion in the same fixative solution overnight at 4 °C. After rinsing

with PBS for 24 hours, the specimens were demineralised at 4°C in 15% EDTA at pH 7.4 for 3 weeks with a regular solution renewal every 2 days. After extensive washing in PBS, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and toluene before finally embedding in paraffin (Paraplast plus, Sigma). 7 µm thick serial frontal paraffin sections of the maxilla were cut with a microtome.

#### **2.4. Histomorphometric analysis**

The prepared sections were deparaffinized, rehydrated, and stained with hematoxylin. After dehydration, slides were mounted with distrene–plasticizer–xylene (DPX) resin (Sigma) and computerized images were captured on a microscope (RM 2145 DMRB microscope, Leica, Rueil-Malmaison, France). Palatal root areas of the first molars were analyzed to examine the extension of epithelial down growth, connective tissue attachment and alveolar bone loss. For histomorphometric analysis: Epithelial attachment (EA) is measured from the cemento-enamel junction (CEJ) to the apical limit of epithelium and the alveolar bone loss (BL) measured from CEJ to alveolar bone crest (ABC) using imaging software (Image J).

### **3. Results and discussion**

The epithelial attachment, fibrous connective tissue level and bone loss were measured at 7 and 15 days after the placement of the ISFI (Figure 1 and Figure 2). At 7 days, a dose-dependent clinical attachment gain was observed in the ISFI-treated lesions with a significant increase of the connective tissue attachment level ( $p < 0.05$  for ISFI 0.5 and 2%) and a corresponding shorter epithelial attachment ( $p < 0.05$  for ISFI 2%) (Fig. 1). At 15 days, only the 0.5% ISFI revealed a significant improvement on the soft tissue healing ( $p < 0.05$ ). The alveolar bone level was not much affected by the ISFI placement. In the present study, the placement of *P. gingivalis* soaked ligatures effectively induces periodontal lesions in mice and support the validity of the model used. An improvement was observed in soft tissue wound healing at 7 and 15 days. This suggests that *in vivo* the Chx/Ibu loaded PLGA-ISFI was able to release optimal doses of drugs contributing to the expected pharmacological effect. These results are consistent with previous animal studies on either NSAIDs intragingival injection or the placement of NSAIDs-containing scaffolds and further support the local use of NSAIDs to control the inflammation in periodontal pockets (21-25). The ISFI provided a

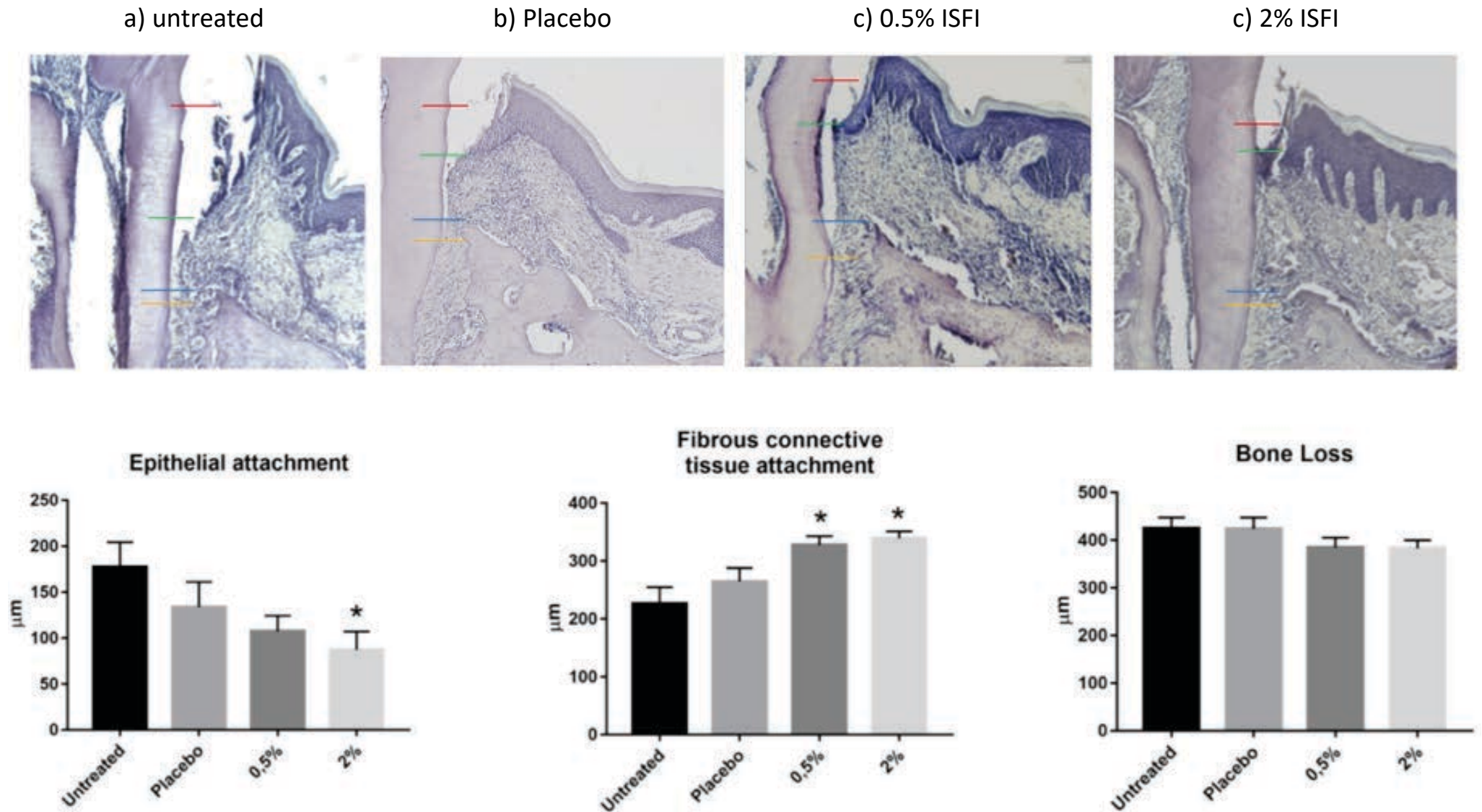
dose-dependent benefit on clinical attachment gain at 7 days but at 15 days, only the 0.5% ISFI revealed a significant improvement on the tissue attachment height. This might be explained by a shorter residence time of the 2% ISFI leading to a less pronounced pharmacological effect. In fact, our *in vitro* study showed that the addition of the drug can decrease the adhesive properties of the ISFI (Chapter I, 3.3. Adhesive properties). This can be explained by a higher cross-link density of the polymer chains caused by increased interactions between the drug and the polymer. In fact, an increased cross-link density reduces the flexibility and hydration rate of the polymer leading to lower adhesive performance (26). However, it should be kept in mind that in mice, periodontal pockets are very shallow and may contain only a small volume of formulation. Consequently, the pockets were probably over-filled when injecting the liquid formulation. This may contribute to a premature accidental expulsion from the site of action due to chewing. It could be assumed that the residence time of the ISFI in patients should be improved since a higher volume of liquid formulation may be accurately administered. No significant bone level improvement was observed following the ISFI placement but this was anticipated. Given the short observation period, no potential effect on bone healing could be measured.

## 5. Conclusion

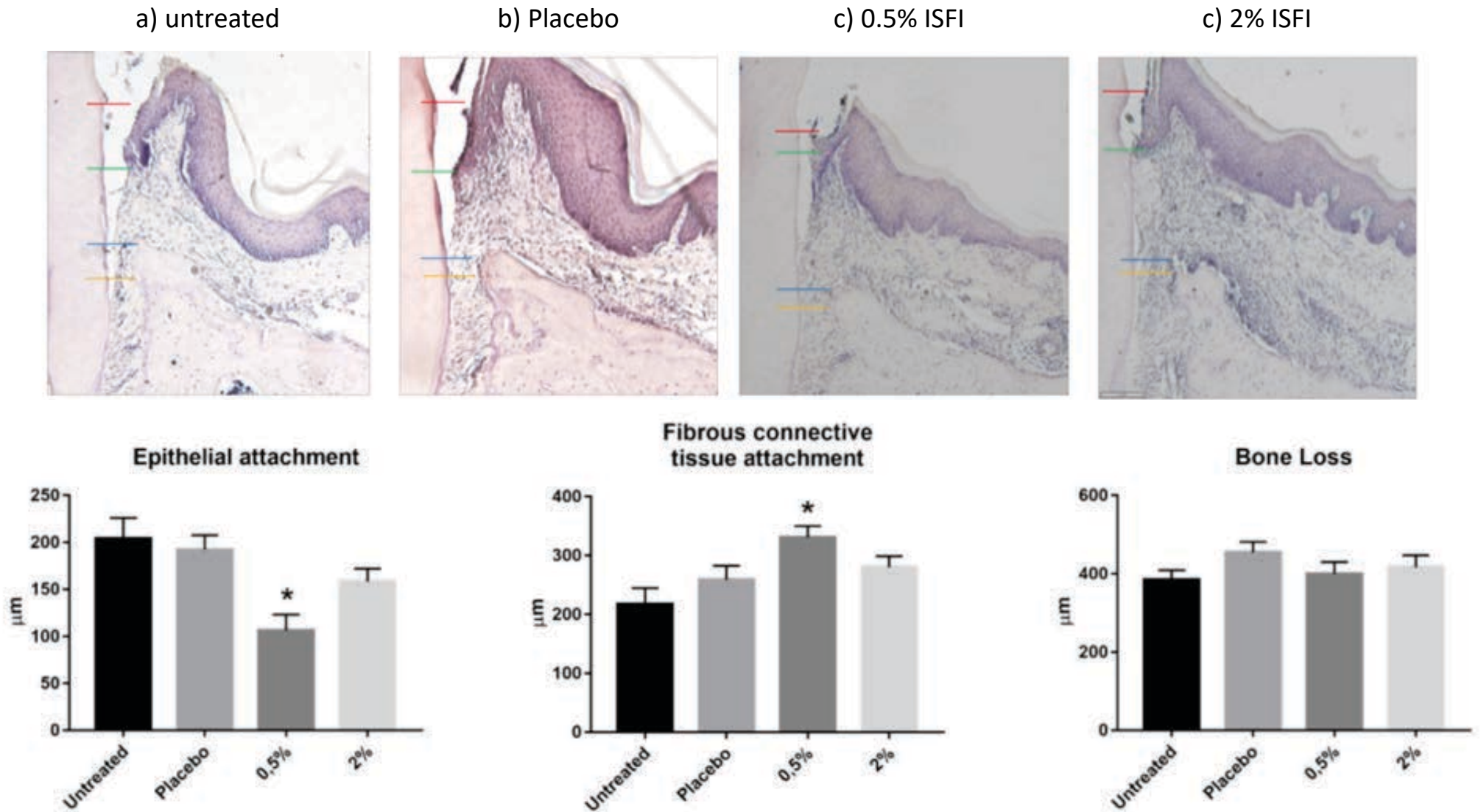
The *in vivo* results obtained with the proposed dual Chx/Ibu loaded ISFIs are very promising since the implants clinically improved periodontal soft tissue healing. This indicates that our system can effectively control inflammatory and migratory gingival cell responses and promote clinical attachment gain. In agreement with our preliminary *in vitro* results, these data further support the benefit of a local administration of a combination of antiseptics and NSAIDs in periodontal pocket, while confirming the PLGA-HPMC ISFI as an appropriate scaffold for this purpose. Further research should focus on elucidating the underlying molecular interaction between the active agents and the gingival or bacterial cells to better understand its antimicrobial and anti-inflammatory activity.

## Acknowledgements

The authors are very grateful to the ANR (The French National Research Agency) (N° ANR-385 14-CE16-0025-01) and to the INSERM (the French National Institute of Health and Medical Research) (“poste d’accueil 2016” for Kevimy Agossa) for their valuable support.



**Fig 1.** Histologic views of the first maxillary molars at 7 days: palatal root aspect frontal sections. The levels of attachment (green line = epithelial attachment level, yellow = fibrous connective tissue attachment) and alveolar bone crest (blue line) were measured from the CEJ (red line) and compared in the different groups ISFI (% Chx/Ibu: 0, 0.5, 2). The untreated sites were used as controls.



**Fig 2.** Histologic views of the first maxillary molars at 15 days: palatal root aspect frontal sections. The levels of attachment (green line = epithelial attachment level, yellow = fibrous connective tissue attachment) and alveolar bone crest (blue line) were measured from the CEJ (red line) and compared in the different groups ISFI (% Chx/Ibu: 0, 0.5, 2). The untreated sites were used as controls.



**References**

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 19 2005;366(9499):1809-20
2. Drisko CH. Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2001;25:77-88.
3. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000*. 2017;75(1):152-88.
4. Hajishengallis G. Immuno-microbial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and the host response. *Trends Immunol*. 2014;35(1):3-11.
5. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):30-44.
6. Mark Bartold P, Van Dyke TE. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. *Periodontol 2000*. 2017;75(1):317-29.
7. Preshaw PM. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):131-49.
8. Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J Clin Periodontol*. 1981;8(4):359-67.
9. Offenbacher S, Heasman PA, Collins JG. Modulation of host PGE2 secretion as a determinant of periodontal disease expression. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):432-44.
10. Zhang F, Engebretson SP, Morton RS, Cavanaugh PF, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. The overexpression of cyclo-oxygenase-2 in chronic periodontitis. *J Am Dent Assoc*. 2003;134(7):861-7.
11. Agossa K, Morand DN, Tenenbaum H, Davideau JL, Huck O. Systemic Application of Anti-inflammatory Agents in Periodontal Treatment. *Clin Anti-Inflamm Anti-Allergy Drugs*. 2015;2(1):3-13.
12. Kirkwood KL, Cirelli JA, Rogers JE, Giannobile WV. Novel host response therapeutic approaches to treat periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2007;43:294-315.
13. Noguchi K, Ishikawa I. The roles of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2007;43:85-101.
14. Kranz, H., Bodmeier, R. A novel in situ forming drug delivery system for controlled parenteral drug delivery. *Int. J. Pharm*. 2007 ; 332, 107-114.

15. Kempe, S., Maeder, K. In situ forming implants - an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J. Control. Release.* 2012 161, 668-679.
16. Do MP, Neut C, Delcourt E, Seixas Certo T, Siepmann J, Siepmann F. In situ forming implants for periodontitis treatment with improved adhesive properties. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;88(2):342-50.
17. Do MP, Neut C, Metz H, Delcourt E, Siepmann J, Mäder K, et al. Mechanistic analysis of PLGA/HPMC-based in-situ forming implants for periodontitis treatment. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;94:273-83.
18. 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.* 15 2017;521(1-2):282-93.
19. Sculean A, Chapple ILC, Giannobile WV. Wound models for periodontal and bone regeneration: the role of biologic research. *Periodontol 2000.* 2015;68(1):7-20.
20. Saadi-Thiers K, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre J-E, Tenenbaum H, et al. Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol.* 2013;84(3):396-406.
21. Batool F, Morand D-N, Thomas L, Bugueno IM, Aragon J, Irusta S, et al. Synthesis of a Novel Electrospun Polycaprolactone Scaffold Functionalized with Ibuprofen for Periodontal Regeneration: An In Vitro and In Vivo Study. *Materials (Basel).* 10 2018;11(4).
22. Queiroz-Junior CM, Pacheco CMF, Maltos KLM, Caliani MV, Duarte IDG, Francischi JN. Role of systemic and local administration of selective inhibitors of cyclooxygenase 1 and 2 in an experimental model of periodontal disease in rats. *J Periodontal Res.* 2009;44(2):153-60.
23. Vardar-Sengul S, Buduneli E, Turkoglu O, Buduneli N, Atilla G, Wahlgren J, et al. The effects of selective COX-2 inhibitor/celecoxib and omega-3 fatty acid on matrix metalloproteinases, TIMP-1, and laminin-5gamma2-chain immunolocalization in experimental periodontitis. *J Periodontol.* 2008;79(10):1934-41.
24. Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E, Baylas H, Atilla G, Lappin D, et al. Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on serum interleukin-

- 1beta, osteocalcin, and C-reactive protein levels in rats. *J Periodontol.* 2006;77(4):657-63.
25. Vardar S, Buduneli E, Baylas H, Berdeli AH, Buduneli N, Atilla G. Individual and combined effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitor and omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol.* 2005;76(1):99-106.
26. Shaikh R, Raj Singh TR, Garland MJ, Woolfson AD, Donnelly RF. Mucoadhesive drug delivery systems. *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(1):89-100.

# Conclusion

Les stratégies de prévention et de traitement mises en œuvre ces dernières décennies ont considérablement amélioré l'état bucco-dentaire et la qualité de vie orale dans les populations occidentales. Cependant, les maladies parodontales conservent une prévalence élevée (un adulte sur deux) probablement liée à leur caractère multifactoriel et à la part essentielle de l'observance individuelle dans le succès thérapeutique. En plus de leurs conséquences au niveau buccal, de nombreuses études mettent en évidence le lien entre les parodontites sévères et la santé générale et soulignent l'importance médicale de leur prise en charge. Il est donc nécessaire de continuer à faire progresser les outils thérapeutiques pour contrôler la progression de cette maladie. Ce travail a contribué à la mise au point d'une forme galénique innovante, l'implant formé *in-situ*, proposée comme adjuvant au traitement mécanique des poches parodontales. Ce dispositif à base de polymères biodégradables et biocompatibles est injectable sous forme liquide dans la lésion parodontale où il forme un dépôt solide sur mesure parfaitement adapté à l'anatomie du site. Nos objectifs ont été d'évaluer *in vitro* les propriétés mécaniques et l'action antimicrobienne du système qui contribuent à son efficacité clinique. En effet, l'expulsion précoce du site d'action et le rapport avantages/inconvénients du principe actif sont deux problématiques récurrentes des systèmes actuels de libération contrôlée dans la poche parodontale. L'effet du dispositif sur la cicatrisation des tissus parodontaux a également été étudié *in vivo* grâce à un modèle de parodontite expérimentale chez l'animal.

Dans la première partie de l'étude, des systèmes contenant différentes doses de chlorhexidine et différents ratios de polymères ont été étudiés pour mieux comprendre l'effet de la formulation sur le comportement mécanique de l'IFIS. L'analyse des propriétés de texture (dureté, résilience, élasticité) et de l'injectabilité de la formulation liquide a été effectuée à l'aide de techniques conventionnelles de caractérisation des semi-solides. Les propriétés adhésives, essentielles au maintien de l'implant dans la poche, ont été étudiées grâce à un modèle d'adhésion aux surfaces dentaires développé pour ce faire. Nos résultats montrent la supériorité de l'IFIS sur deux produits commerciaux utilisés comme contrôles et suggèrent en pratique un maintien prolongé de l'IFIS dans la poche.

Le deuxième chapitre est consacré à la caractérisation *in vitro* d'IFIS chargés à la fois en chlorhexidine et en ibuprofène. Nous y avons étudié l'effet de la combinaison inédite de deux principes actifs très différents au sein du même système sur les caractéristiques de celui-ci. Une attention particulière a été accordée à l'étude de l'interaction possible des

principes actifs entre eux et avec le contenu de la poche parodontale en particulier le sang. Nos résultats montrent un effet bactéricide rapide des implants sur des souches isolées à partir de poches parodontales et l'absence d'effet inhibiteur de l'ibuprofène sur l'activité de la chlorhexidine. De plus, les propriétés mécaniques de l'IFIS chargé à la fois en chlorhexidine et en ibuprofène demeurent supérieures à celles du produit contrôle. Ainsi, ce système devrait contribuer efficacement au contrôle de l'infection dans la poche parodontale.

La dernière partie du travail étudie *in vivo* l'effet de l'implant sur la cicatrisation tissulaire dans un modèle de parodontite expérimentale chez la souris. L'analyse histomorphométrique montre un effet positif des IFIS sur les tissus mous (épithélium et conjonctif). En effet les IFIS chargés en principes actifs améliorent la réduction de la poche parodontale et sont associés à une meilleure cicatrisation tissulaire par rapport aux contrôles. Un effet osseux n'a pas pu être observé sur la période d'observation choisie. Ces résultats pré-cliniques confortent les données *in vitro*. Ils suggèrent que l'implant permet effectivement, *in vivo*, d'administrer des doses efficaces de principes actifs qui entraînent l'effet pharmacologique attendu.

Deux caractéristiques essentielles de l'IFIS à savoir la cinétique de libération et l'effet cellulaire (toxicité, action anti-inflammatoire) n'ont pas été abordées dans ce travail. Elles font l'objet de travaux complémentaires en cours dans le cadre du projet Imperio et seront présentées séparément. Ce travail appelle logiquement comme perspectives des études pré-cliniques et cliniques complémentaires. L'utilisation d'autres principes actifs et/ou solvants sont des voies possibles d'optimisation du système. *In vitro*, la mise au point d'un modèle de biofilm bactérien multi-espèces et l'amélioration du modèle de bioadhésion pourront compléter avantageusement cette étude. Ils contribueront dans le futur à la caractérisation de systèmes destinés à la poche parodontale et à d'autres sites de la cavité buccale.

# Résumé en français

Les maladies parodontales sont des pathologies chroniques inflammatoires multifactorielles, associées à une dysbiose bactérienne, qui affectent les tissus de soutien des dents. Du point de vue clinique, on distingue les gingivites, caractérisées par des lésions réversibles du parodonte superficiel, des parodontites qui sont des atteintes irréversibles de l'ensemble des tissus parodontaux. Les maladies parodontales sont extrêmement fréquentes dans la population générale. Les formes sévères de parodontite sont considérées comme la sixième maladie humaine la plus fréquente au monde et entraînent un impact sanitaire et économique considérable. Elles représentent la première cause de perte dentaire chez l'adulte et peuvent également aggraver l'évolution de pathologies systémiques telles que les diabètes et certaines cardiopathies. La pathogénèse des maladies parodontales repose sur des interactions complexes entre une flore commensale et la réponse immune de l'hôte. Ces interactions et leur traduction clinique sont modulées par des facteurs de risque généraux et locaux qui exercent un effet aggravant ou protecteur sur l'évolution de la pathologie. Le biofilm bactérien est l'étiologie primaire des maladies parodontales. Selon les concepts actuels, le passage de la santé à la pathologie est caractérisé par le basculement d'une communauté microbienne compatible avec la santé, vers une flore dysbiotique. L'inflammation et sa persistance résultent de l'action synergique d'une coopérative de symbiontes devenus pathobiontes sous l'influence de pathogènes « clé de voûte » ou à la faveur d'une défaillance immunitaire de l'hôte. L'intensité de la réponse inflammatoire de l'hôte face au challenge bactérien joue un rôle clé dans la susceptibilité individuelle à la maladie parodontale. Les mécanismes mis en jeu ne sont que partiellement élucidés. Ils font intervenir un grand nombre d'acteurs cellulaires (polynucléaires, lymphocytes) et de médiateurs humoraux (cytokines, chimiokines) qui concourent à la progression de la destruction tissulaire ou au contraire à la résolution de l'inflammation.

Le traitement des maladies parodontales repose sur la mise en œuvre simultanée de stratégies médicales, comportementales et mécanistiques qui ont pour buts respectifs : (i) le contrôle des facteurs systémiques associés à l'état parodontal, (ii) l'acquisition pérenne de comportements favorables à la santé bucco-dentaire et (iii) le contrôle de l'accumulation du biofilm bactérien par des approches individuelles et professionnelles, non chirurgicales ou chirurgicales. Les adjuvants chimiques, notamment les agents antimicrobiens sont largement mis à contribution dans les stratégies mécanistiques qui visent le contrôle de l'infection. En effet, le succès du traitement passe par la réduction de la charge bactérienne totale et le



retour à un état d'homéostasie tissulaire. La mise en œuvre de mesures d'hygiène rigoureuses et le débridement mécanique professionnel des poches parodontales suffisent le plus souvent à atteindre cet objectif. C'est pourquoi cette approche mécanique est considérée comme la référence du traitement des maladies parodontales. Cependant, certains sites ne répondent pas suffisamment à la thérapeutique mécanique du fait de (i) l'accès limité aux lésions profondes et/ou d'anatomie complexe (55), (ii) la présence de pathogènes spécifiques et (iii) la persistance de niches bactériennes extra parodontales qui facilitent la recontamination. Les adjuvants chimiques antimicrobiens ont pour but de pallier les limites de l'action mécanique. Les deux principaux types d'antimicrobiens utilisés pour ce faire sont les antibiotiques (par voie systémique ou locale) et les antiseptiques (topiques ou en libération prolongée).

Le bénéfice des antibiotiques systémiques, en particulier la combinaison amoxicilline/métronidazole, en complément du débridement mécanique est établi avec un haut niveau de preuve. Cependant, la faible biodisponibilité au niveau des tissus parodontaux contraint à l'usage de doses importantes par voie générale, ce qui augmente les effets secondaires et le risque de résistances bactériennes. Les antibiotiques locaux permettent de pallier ces insuffisances mais leur bénéfice clinique est plus limité. Les antiseptiques permettent de limiter le recours aux antibiotiques en parodontologie et contribuent à contrôler le développement de résistances bactériennes. La chlorhexidine est la molécule antiseptique la plus utilisée en odontologie. Son action antimicrobienne à large spectre et son faible coût en expliquent le succès. Utilisée sous forme de bains de bouche, elle est efficace dans la totalité de la cavité buccale avec une rémanence de plusieurs heures mais un accès limité en sous gingival. Administrée sous forme à libération prolongée dans la poche parodontale, elle montre un effet significatif sur la réduction de la charge bactérienne du site et un gain clinique modeste. Aux concentrations usuelles sous forme topique (0,10 – 0,2%) les effets secondaires sont transitoires et limités à la cavité buccale (colorations dentaires réversibles et dysgueusie).

La meilleure compréhension du rôle central de l'inflammation dans la destruction tissulaire et du lien bidirectionnel entre inflammation et dysbiose a modifié les approches diagnostiques et thérapeutiques en parodontologie. Elle constitue le rationnel du concept de modulation de la réponse de l'hôte, basé sur l'usage d'agents anti-inflammatoires et immunomodulateurs pour limiter l'ampleur et les conséquences délétères de

l'inflammation. Parmi le grand nombre de molécules impliquées dans la cascade inflammatoire, les dérivés de l'acide arachidonique notamment les prostaglandines participent aux phases initiales de l'inflammation. La stimulation des cellules épithéliales par les bactéries induit la production de prostaglandines par la cyclooxygénase (COX) une enzyme constitutionnelle présente dans les tissus gingivaux. La surexpression de COX entraîne notamment une augmentation des niveaux de prostaglandine E2 (PGE2) qui possède des effets pro-inflammatoires (vasodilatation, synthèse de collagénases, activation des ostéoclastes). Dans les tissus gingivaux et le fluide crévulaire, l'augmentation du niveau de PGE2 est corrélée à la sévérité de la maladie. L'inhibition des isoformes de COX par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) sélectifs ou non a été proposée comme adjuvant du débridement mécanique en parodontologie. De nombreuses études montrent que l'administration systémique ou locale d'AINS réduit les signes cliniques et biologiques de l'inflammation parodontale chez l'animal et chez l'Homme. Toutefois, la voie locale présente une meilleure sécurité d'utilisation et un bénéfice similaire à celui de la voie systémique. Ces données soutiennent l'utilisation d'AINS locaux dans le traitement parodontal.

La libération contrôlée a pour but d'améliorer l'efficacité clinique des principes actifs en contrôlant différents paramètres qui conditionnent l'efficacité finale tels que : (i) le site d'action, (ii) le temps d'exposition, (iii) la dose délivrée et (iv) la cinétique de libération. Les applications des systèmes de libération contrôlée sont nombreuses en médecine en général et en parodontologie en particulier. En effet, la poche parodontale peut servir de réservoir naturel pour la libération prolongée et *in-situ* de doses efficaces de principes actifs. Les dispositifs disponibles sont nombreux et se présentent sous la forme de fibres, films, ciments, strips, inserts, microsphères, microcapsules microparticules et gels. Compte tenu des spécificités du site parodontal, le système optimal devrait être (i) facile à mettre en place et rétentif sur le site, (ii) biocompatible et résorbable, (iii) conçu pour libérer les principes actifs de façon prolongée et à des concentrations efficaces et (iv) facile et peu coûteux à produire. Les systèmes actuellement disponibles sur le marché ne répondent que partiellement à ces attentes. Leur inconvénient majeur est le manque d'adhésion aux parois de la poche parodontale qui explique un trop faible temps de résidence sur le site et un effet clinique très limité. Les implants formés *in-situ* pourraient permettre de pallier ces insuffisances. Par ailleurs, la majorité des systèmes commercialisés sont chargés en antibiotiques. La contribution des antibiotiques locaux à la sélection d'espèces bactériennes

résistantes reste mal évaluée. Pour contrôler ce risque potentiel, l'utilisation d'antiseptiques est à privilégier dans les systèmes de libération prolongée destinés à la cavité buccale.

Les implants formés *in-situ* (IFIS) sont des formulations administrées sous forme liquide par voie parentérale qui ont la capacité de former des dépôts solides ou semi-solides au niveau du site d'administration. Ce système trouve de nombreuses applications en ophtalmologie, en oncologie et en ingénierie tissulaire. Il permet la libération prolongée de principes actifs et limite considérablement le nombre de répétition de l'administration. Par rapport aux autres formes locales utilisées en parodontologie, l'administration des IFIS est simple, rapide, peu invasive et leur fabrication peu coûteuse. La transition de la phase liquide à la phase solide permet la formation d'un dépôt parfaitement adapté à l'anatomie du site et rétentif. On distingue trois grandes familles d'IFIS en fonction du mécanisme de formation de l'implant (146) : (i) la réticulation, (ii) la solidification d'organogel et (iii) la séparation de phase. Parmi les IFIS formés par séparation de phase, ceux étudiés dans ce travail sont obtenus par échange de solvant. Le principe consiste à dissoudre un principe actif et un polymère biodégradable dans un solvant commun. Le mélange, à l'état liquide, est facilement déposé à l'aide d'une seringue dans la poche parodontale. Au contact des fluides biologiques, la diffusion du solvant entraîne la précipitation du polymère (qui est non soluble dans l'eau) et emprisonne le principe actif qui sera progressivement libéré par diffusion à travers les pores aqueux et par érosion lors de la dégradation de l'implant. Du fait de la biodégradabilité du polymère, le retrait du dispositif est inutile. Cette technologie est déjà utilisée en parodontologie (Atridox<sup>®</sup>) pour un système à base d'acide poly(D,L-lactide) chargé en antibiotique (Doxycycline) qui libère le principe actif sur une période de 7 jours.

Ce travail s'inscrit dans le cadre du projet Imperio financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-14-CE16-0025) qui a pour but le développement, la caractérisation et l'optimisation d'une forme galénique à libération contrôlée destinée au traitement des lésions parodontales. Sur la base des résultats de travaux précédents réalisés au sein du laboratoire nous proposons un IFIS innovant destiné au traitement des poches parodontales. Il est composé de deux polymères : (i) l'acide Poly(D,L-lactic-co-glycolique) (PLGA) choisi pour ses propriétés physico-chimiques, son excellente biocompatibilité et sa vitesse de dégradation lente (1 à 2 mois) et (ii) l'hydroxypropyl méthylcellulose (HPMC) dont l'addition améliore les propriétés adhésives des IFIS à base de PLGA. Le solvant choisi est le N-méthyl pyrrolidone (NMP) communément utilisé pour dissoudre de nombreux polymères,

relativement peu toxique et déjà utilisé pour l'Atridox®. Compte tenu de la dualité inflammatoire et infectieuse des maladies parodontales, l'administration concomitante d'antimicrobiens et d'anti-inflammatoires semble une piste intéressante. C'est pourquoi notre système contient à la fois un antiseptique, la chlorhexidine et un anti-inflammatoire non stéroïdien l'ibuprofène. Il est important de souligner que la combinaison de deux principes actifs de nature différente au sein d'un même système de libération contrôlée n'a encore jamais été étudiée en parodontologie. Un plastifiant, l'acetyltributyl citrate (ATBC) est enfin ajouté pour sa capacité à améliorer la plasticité des IFIS à base de PLGA et leurs propriétés adhésives.

Les principaux objectifs de ce travail étaient : (i) préparer et évaluer *in vitro* les propriétés mécaniques, notamment d'adhésion, de différents IFIS aux surfaces dentaires, (ii) évaluer *in vitro* l'activité antimicrobienne des IFIS sur des bactéries isolées à partir de prélèvements cliniques de poches parodontales, et (iii) évaluer *in vivo* l'effet de l'administration de l'IFIS sur la cicatrisation parodontale à l'aide d'un modèle de parodontite expérimentale chez la souris.

**Le premier chapitre** est consacré à l'étude du comportement mécanique de l'IFIS qui conditionne sa rétention dans la poche parodontale et par conséquent son efficacité finale. Différentes formulations d'IFIS à base de PLGA-HPMC ont été préparées comme décrit dans des travaux précédents (Do *et al.*, 2014). Afin d'étudier l'effet de la combinaison de polymères sur les propriétés étudiées, différents ratios d'HPMC (0, 10 ou 20 % w/w de la masse de PLGA) ont été comparés. Un seul principe actif, le dichlorhydrate de chlorhexidine (Chx diHCl 0, 5 ou 10 % w/w) est étudié dans cette première partie. La quantité de plastifiant (ATBC) est fixée à 10 % w/w de la masse de PLGA. Deux gels commercialisés pour une administration dans les poches parodontales (Parocline et Chlo-Site) ont également été évalués à titre de comparaison. Les paramètres étudiés sont : (i) le gonflement macroscopique, (ii) l'injectabilité, (iii) le profil de texture et (iv) les propriétés adhésives.

#### (i) gonflement macroscopique

*Méthode* : les échantillons (IFIS à l'état liquide, Parocline et Chlo-site) sont injectés dans des puits réalisés au centre d'un gel d'agarose préparé dans une boîte de Pétri. Afin de mimer les conditions *in vivo*, les formulations sont incubées à 37°C durant 24H et leurs aspects macroscopiques à 5min et 24H sont comparés.

*Résultats* : les trois formulations présentent un aspect macroscopique très différent. Parocline et Chlo-site montrent respectivement un gonflement important et une forte rétractation. L'IFIS présente un gonflement plus modéré que celui de Parocline et qui est encore réduit lorsque l'IFIS est chargé en principe actif. La concentration d'HPMC (10 ou 20 % w/w de la masse de PLGA selon la formulation) ne semble pas avoir d'effet sur le gonflement du système. Cependant, l'augmentation de la concentration d'HPMC accélère la formation de l'implant.

(ii) injectabilité

*Méthode* : elle est estimée par le travail nécessaire pour éjecter la formulation de son contenant. Un analyseur de texture (TA.XT.Plus; Stable Micro Systems, Surrey, UK) calibré à l'aide d'une cellule de 50 kg est utilisé pour exprimer le contenu d'une seringue à travers une aiguille de calibre connu en exerçant une compression sur le piston de la seringue à l'aide d'une sonde cylindrique de 6 mm de diamètre. La distance parcourue par la sonde est de 10 mm à une vitesse constante de 1 mm/s. Les variations de force et de distance sont enregistrées au cours du temps. L'injectabilité de l'IFIS, de Parocline et Chlo-Site sont comparées entre elles et à l'injectabilité de l'eau.

*Résultats* : l'IFIS liquide présente une bonne injectabilité c'est à dire une faible résistance à l'injection, très proche de celle de l'eau. Chlo-site et Parocline, conditionnés sous forme de gels préformés, sont respectivement 2 et 8 fois plus difficiles à injecter.

(iii) analyse du profil de texture

*Méthode* : l'analyse a été effectuée à l'aide d'un analyseur de texture (TA.XT.Plus, cellule de calibration: 1 kg). Le test utilisé est le TPA (Texture Profile Analysis), validé dans la littérature pour l'étude des propriétés texturales des semi-solides à base de polymères. Il est effectué sur les IFIS (ou les gels du commerce) après 24 h d'incubation à 37°C dans des puits réalisés au sein de gels d'agarose. Deux cycles de compression-relaxation à vitesse constante (2 mm/s) sont appliqués par une sonde sphérique (diamètre = 5 mm) au centre des échantillons à 15 s d'intervalle. A chaque compression la sonde s'enfonce de 50% de la hauteur de l'échantillon et maintient cette position durant 15 s. Les forces exercées sur la sonde et son déplacement au contact de l'échantillon sont mesurés au cours du temps. La courbe force-temps obtenue permet le calcul de la dureté, l'élasticité et la résilience du système.

*Résultats* : Le test de TPA montre une bonne reproductibilité sur tous les produits testés. L'IFIS, Parocline et Chlo-site présentent des profils de texture distincts. La courbe typique de Parocline présente un double pic lors de chaque cycle compression relaxation, caractéristique de la rupture d'une « coque » qui se forme à la surface de l'échantillon. L'ajout d'HPMC et de principe actif (CHX diHCl) a peu d'effet sur les propriétés texturales de l'IFIS-PLGA. Pour tous les paramètres étudiés (dureté, élasticité et résilience), Chlo-site et Parocline présentaient les valeurs les plus extrêmes et l'IFIS des valeurs intermédiaires.

#### (iv) propriétés adhésives

*Méthode* : du fait du renouvellement rapide des cellules de la paroi épithéliale de la poche parodontale et du « lavage » constant par le fluide gingival, l'adhésion à la paroi radiculaire, inerte et plus stable nous a semblé plus pertinente que la mucoadhésion. Deux méthodes ont été utilisées pour évaluer les propriétés adhésives de l'IFIS à la surface radiculaire et les comparer à celles de deux produits du marché. La première consiste à créer une alvéole artificielle dans un gel d'agarose et à y introduire la racine d'une dent monoradiculée. L'espace libre entre la racine de la dent et les parois de l'alvéole est rempli en y injectant l'IFIS à l'état liquide (ou les gels préformés servant de comparaison). Après 24H à température ambiante et formation de l'implant, la dent est déplacée à vitesse constante (0,5 mm/s) en direction coronaire afin de « l'extraire » de l'alvéole. Les forces exercées et la distance parcourues sont mesurées au cours du temps. Le deuxième modèle consiste à utiliser des échantillons dentaires normalisés, de formes rectangulaires et de surface plane obtenus par coupe à l'aide d'une micro tronçonneuse. Les échantillons sont sélectionnés par paires et fixés les uns en face des autres, d'une part au bras mobile de l'analyseur de texture, d'autre part au fond d'une boîte de Pétri maintenue sur le plateau fixe de l'analyseur de texture. Le produit à tester (IFIS, Parocline ou Chlo-site) est déposé à l'aide d'une seringue sur la surface des coupes inférieures (100 µL par coupe). Les coupes supérieures sont lentement descendues au contact de la formulation de façon à ménager un espace de 1 mm entre les coupes supérieures et inférieures et un contact de toutes les coupes avec l'échantillon. La boîte de Pétri est remplie d'eau afin d'immerger les coupes et le système est incubé à 37°C durant 1h ou 24h. Après incubation, les coupes supérieures sont déplacées d'abord vers le bas (phase de compression) à vitesse constante (1 mm/s) de façon à exercer une compression contrôlée (Force cible = 2 N) sur le gel durant 30 s puis vers le haut (phase

de traction) à vitesse constante (2 mm/s) afin de « détacher » les coupes les unes des autres. Les forces exercées et la distance parcourue sont mesurées au cours du temps.

*Résultats* : Avec la première méthode, une rupture est observée à l'interface entre l'IFIS et le gel d'agarose tandis que l'IFIS reste fermement attaché à la surface radiculaire. Les valeurs mesurées ne traduisent donc pas la force nécessaire pour rompre l'interface entre la surface radiculaire et l'IFIS. Cependant, ce test suggère une adhésion substantielle de l'IFIS à la dent, supérieure à celle entre le gel d'agarose et l'IFIS. Avec la deuxième méthode, la courbe contrainte déformation obtenue reflète, durant la phase de traction, le comportement du matériau face à des forces de « décollement ». Une diminution des propriétés adhésives est observée entre 1h et 24h pour les gels commerciaux (Parocline et Chlo-Site) et l'IFIS sans HPMC. L'addition d'HPMC inverse la tendance et améliore la pégosité de l'IFIS. Après 24h l'IFIS avec HPMC est 2 à 20 fois plus difficile à décoller des surfaces dentaires que Parocline et Chlo-site respectivement. L'adjonction de principe actif diminue les propriétés adhésives de l'IFIS mais elles restent cependant supérieures à celles des produits sur le marché.

*Conclusions* : Les IFIS à base de PLGA/HPMC chargés en Chlorhexidine présentent des propriétés mécaniques supérieures à celles des deux produits commerciaux utilisés comme contrôles. Ces résultats suggèrent en pratique une meilleure rétention de l'IFIS dans la poche parodontale.

**Le deuxième chapitre** est consacré à la caractérisation *in vitro* des propriétés antimicrobiennes et mécaniques d'IFIS chargés à la fois en chlorhexidine et en ibuprofène. L'effet de la combinaison inédite de deux principes actifs différents au sein du même système sur les caractéristiques de celui-ci y a été étudié. Une attention particulière a été accordée aux interactions possibles des principes actifs entre eux (synergie, indifférence ou antagonisme) et avec le contenu de la poche parodontale en particulier le sang. Pour évaluer l'effet antimicrobien des tests de diffusion (*agar well diffusion test*) et de cinétique d'activité antimicrobienne (*kill-time test*) ont été réalisés. Trois formulations différentes d'IFIS (Chx DiHCl/Ibu 0,5% - 2% - 8%) ont été testées sur des souches sauvages isolées chez des patients atteints de parodontites actives. Un gel commercial à base de xanthane, chargé en chlorhexidine (Chlo-Site) et un placebo (IFIS sans principe actif) ont été utilisés comme contrôles positif et négatif. Les paramètres mécaniques (gonflement, injectabilité, profil de texture) ont été étudiés suivant la méthodologie décrite ci-dessus.

### (i) Tests de diffusion

*Méthode* : Des souches isolées (*S. sanguinis*, *S. constellatus*, *A. odontolyticus*, *V. dispar*, *F. nucleatum*, *F. naviforme*, *P. nigrescens*, *P. gingivalis*) ou des prélèvements cliniques multi-espèces sont ensemencés sur des géloses Columbia enrichies ou non au sang. Des puits sont réalisés au sein des géloses et remplis avec les formulations à tester (IFIS ou gel commercial). Après incubation à 37°C pendant 48 à 72h, le diamètre de la zone d'inhibition définie autour des puits permet d'estimer l'activité antimicrobienne de la formulation testée. Pour étudier l'effet du sang sur l'activité de la chlorhexidine, le test est également réalisé avec une gamme croissante de solutions de chlorhexidine de concentrations connues, sur gélose classique ou supplémentée en sang.

*Résultats* : Tous les IFIS chargés en principes actifs et le Chlo-Site présentent une activité anti bactérienne sur les souches pures et les prélèvements multi-espèces. Une corrélation entre la dose d'actifs et le diamètre d'inhibition est observée mais les différences retrouvées sont faibles. Le produit du commerce (Chlo-site) présente une activité inférieure ou comparable à l'IFIS chargé à 2% de principes actifs. La présence de sang réduit très significativement l'activité antimicrobienne de la chlorhexidine. Les diamètres d'inhibition mesurés sont au moins 2 fois plus faibles.

### (ii) Tests de cinétique antibactérienne

*Méthode 1* : La cinétique de réduction de la charge bactérienne au contact des formulations testées (IFIS ou Chlo-Site) est étudiée à l'aide d'un test de *kill-time*. Des dénombrements successifs sont effectués à différents temps d'incubation (1, 2, 3, 6 et 24h) pour estimer le nombre de bactéries vivantes dans le milieu. Les cinétiques de croissance/décroissance bactérienne obtenues sont comparées entre elles.

*Résultats 1* : La rapidité d'action antibactérienne est corrélée à la dose de principe actif. Pour les IFIS 2% et 8% le seuil de détection est atteint en 1-3h (entre 3 et 24h pour IFIS 0.5%) sur les souches pures. La cinétique d'action du Chlo-Site est comparable à celles des IFIS chargés à 0.5%. Sur des prélèvements cliniques le Chlo-Site semble présenter une moins bonne efficacité que les IFIS (0.5%, 2% et 8%).

*Méthode 2* : L'effet potentiel (antagonisme/synergie ou indifférence) de l'addition de l'ibuprofène sur l'activité de la chlorhexidine est étudié à l'aide de courbes de croissances. Les bactéries sont ensemencées dans un milieu liquide contenant des concentrations sous-antimicrobiennes ou inhibitrices de chlorhexidine seule ou combinée à de l'ibuprofène. Des



dénombrements successifs sont effectués à différents temps d'incubation (2, 4, 6, 7 et 24h) pour estimer le nombre de bactéries vivantes dans le milieu. Les cinétiques de croissance/décroissance bactérienne obtenues sont comparées entre elles.

*Résultats 2* : l'addition d'ibuprofène ne semble pas modifier l'activité antimicrobienne de la chlorhexidine.

### (iii) Propriétés mécaniques

*Méthodes* : l'injectabilité, la texture (dureté, élasticité, résilience) et le gonflement ont été comparés pour différents IFIS chargés ou non en principes actifs (0,5%, 2%, 8%) et le produit commercial. Le protocole expérimental utilisé est décrit ci-dessus.

*Résultats* : La force nécessaire pour injecter les formulations d'IFIS est corrélée à la viscosité de celle-ci et croit lorsque la dose de principes actifs augmente. La dureté serait corrélée à la teneur en PLGA et diminue lorsque la dose d'actifs augmente. L'élasticité et la résilience ne sont pas affectées par la quantité d'actifs incorporés au système. Le gonflement semble être modifié par la teneur relative en PLGA. En effet, le gonflement est plus faible lorsque la teneur relative en PLGA diminue (et que la concentration de principes actifs augmente réciproquement).

*Conclusions* : *In vitro*, les IFIS ont une action bactéricide rapide sur des pathogènes isolés à partir de prélèvements de poches parodontales. Quelle que soit la dose de principes actifs incorporés, cette efficacité est équivalente ou supérieure à celle du produit commercial utilisé comme contrôle. L'addition d'ibuprofène ne semble pas altérer l'activité de la chlorhexidine. Enfin, les propriétés mécaniques de l'IFIS chargé en chlorhexidine et en ibuprofène demeurent supérieures à celles du produit contrôle. Ces résultats suggèrent que les IFIS proposés devraient contribuer efficacement au contrôle de l'infection dans la poche parodontale.

**Le dernier chapitre** est une étude préclinique menée à l'aide d'un modèle de parodontite expérimentale chez la souris. L'effet de la mise en place de l'implant sur la cicatrisation des lésions parodontales est évalué par une analyse histomorphométrique.

*Méthode* : Une parodontite expérimentale est induite chez des souris mâles C57BL/6J (n =32) âgées de 8 semaines par insertion sous gingivale de ligatures infectées par *Porphyromonas gingivalis* autour des premières molaires maxillaires. La manœuvre est répétée 3 fois/semaine pendant 40 jours pour permettre la formation de lésions

parodontales stables. Les IFIS (placebo, 0.5% and 2%) sont administrés de façon aléatoire dans les sites malades et les animaux sont sacrifiés à 7 jours et à 15 jours post-traitement. Les maxillaires sont prélevés, fixés, décalcifiés, déshydratés, inclus en blocs de paraffine et des sections (de 7  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) sont réalisées. Les coupes histologiques obtenues sont colorées et analysées au microscope. La hauteur de l'attache épithéliale et conjonctive ainsi que le niveau osseux sont mesurés à partir de repères anatomiques fixes.

*Résultats* : A 7 jours, les IFIS chargés en principes actifs (0,5% et 2%) montrent un effet positif sur la régénération des tissus mous avec la restauration d'un épithélium de jonction court et d'une attache fibreuse plus importante. A 15 jours, seul l'IFIS chargé à 0,5% de principes actifs montre le même effet. Aucun effet significatif n'est observé sur le niveau de l'os alvéolaire.

*Conclusions* : *In vivo*, les IFIS chargés en chlorhexidine et en ibuprofène montrent à court terme un effet positif sur la cicatrisation des tissus mous parodontaux.

Pour conclure, ce travail a contribué à la mise au point et à l'optimisation d'une forme galénique prometteuse, l'IFIS à base de polymères biocompatibles et résorbables, conçu pour le traitement des poches parodontales et contenant à la fois un antiseptique et un anti-inflammatoire. Les résultats obtenus *in vitro* montrent la supériorité de l'IFIS en termes de propriétés mécaniques et antimicrobiennes sur des produits commercialisés pour le même usage. Les données pré-cliniques confirment les tendances observées *in vitro* et montrent un effet positif sur la cicatrisation de la poche parodontale. Tous ces résultats plaident pour l'IFIS à base de PLGA-HPMC comme support adapté à la libération contrôlée de principes actifs dans la poche parodontale. Par ailleurs, la combinaison d'un antiseptique et d'un anti-inflammatoire au sein du même système de libération locale est une option prometteuse pour le traitement parodontal. Elle pourrait permettre de répondre à la dualité infectieuse et inflammatoire des parodontites tout en limitant le recours aux antibiotiques dans un contexte préoccupant d'augmentation des résistances bactériennes. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour l'optimisation de systèmes de libération contrôlée pour le traitement des parodontites et d'autres affections de la cavité buccale.

# Articles et communications

**Articles acceptés/publiés ou en révision**

- Agossa K., Morand DN., Tenenbaum H., Davideau J-L., Huck O. Systemic applications of anti-inflammatory agents in periodontal treatment. *Clinical Anti-inflammatory & Anti-Allergy Drugs* 2015; 2(1): 1-11 (Review)

- 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; 15(1-2):282-293

**Articles en préparation**

- Agossa K., Delepierre A., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann J., Siepmann F., Neut C. Novel in-situ forming implants with a dual antimicrobial and anti-inflammatory effect for local periodontitis treatment. (en attente pour soumission)

- Batool F., Agossa K., Lizambard M., Bugueno IM., Benkirane-Jessel N., Tenenbaum H., Siepmann J., Siepmann F., Huck O. Effects of an *in-situ* forming implant on gingival wound healing in an experimental model of periodontitis. (en préparation)

**Communications orales [C.O.] ou affichées [C.A.]**

- [C.O.] Agossa K., Delcourt-Debruyne E., Rongtong T., Siepmann J., Siepmann F. Mise au point d'un modèle d'évaluation de l'adhésion d'un implant formé in situ pour le traitement des poches parodontales. Congrès national de la Société Française de Parodontologie et d'Implantologie Orale (SFPIO), Lyon, 2016

- [C.A.] Agossa K., Delcourt-Debruyne E., Rongtong T., Lizambard M., Siepmann J., Siepmann F. Textural properties and bioadhesion of an *in-situ* implant for the treatment of periodontal pocket. 4th Congress on Innovation in Drug Delivery Site-Specific Drug Delivery, Antibes-Juan-les-Pins (France), September 2016

- [C.A.] Agossa K., Delepierre A., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann F., Neut C. Antimicrobial activity of novel in situ forming implants for periodontitis treatment. CED-IADR/NOF Oral Health Research, Vienna (Austria), 2017

- [C.A.] Agossa K., Delepierre A., Pawlak G., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann J., Siepmann F., Neut C. Antimicrobial activity of novel in-situ forming implants for periodontitis treatment. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada (Spain), March 2018

- [C.A.] Agossa K., Antunes D., Lizambard M., Delcourt-Debruyne E., Siepmann J., Siepmann F. In-situ forming implants for periodontitis treatment: How the drug loading & form affect the mechanical properties. 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada (Spain), March 2018

- [C.A.] Batool F., Agossa K., Lizambard M., Bugueno IM., Benkirane-Jessel N., Tenenbaum H., Siepmann J., Siepmann F., Huck O. A novel chlorhexidine and ibuprofen loaded *in-situ* forming depot for periodontal regeneration: a proof of concept study. IADR/PER General session & exhibition, London (UK), July 2018

