



HAL
open science

Caractérisation du microbiome interdentaire des adolescents

Camille Inquimbert

► **To cite this version:**

Camille Inquimbert. Caractérisation du microbiome interdentaire des adolescents. Santé. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1026 . tel-02560082

HAL Id: tel-02560082

<https://theses.hal.science/tel-02560082v1>

Submitted on 1 May 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.



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1026

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205

École Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat :

Santé publique

Discipline :

Odontologie

Soutenue publiquement le 11/02/2020, par :

Camille INQUIMBERT

Caractérisation du microbiome interdentaire des adolescents

Devant le jury composé de :

Mme Valérie BERTAUD , Professeur des Universités, Université de Rennes	Rapportrice
M. Jean VALCARCEL , Professeur des Universités, Université de Montpellier	Rapporteur
M. Claude DUSSART , Praticien Hospitalier, Hospices Civils de Lyon	Examineur
Mme Delphine TARDIVO , Professeur des Universités, Université d'Aix Marseille	Examinatrice
M. Stéphane VIENNOT , Maître de Conférence des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	Examineur
Mme Florence CARROUEL , Maître de Conférence des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1	Directrice de Thèse

Université Claude Bernard – LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon-Est – Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud Charles. Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
UFR d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
UFR - Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOSNE
ESPE	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON

Remerciements

Je tiens à remercier vivement le Docteur Florence Carrouel, pour la confiance qu'elle m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Je lui suis reconnaissante de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de sa grande compétence, de sa rigueur intellectuelle, de son dynamisme, et de son efficacité certaine que je n'oublierai jamais. Soyez assurée de mon attachement et de ma profonde gratitude.

Merci à ceux qui en montrant de l'intérêt pour mes travaux m'ont beaucoup encouragés :

À mon co-directeur de thèse, le docteur Nicolas Giraudeau pour son intérêt permanent à mon égard et pour son soutien sur le plan humain.

Aux membres de mon jury de thèse, le Professeur Jean Valcarcel, le Professeur Valérie Bertaud, le Professeur Delphine Tardivo, le Docteur Stéphane Viennot et le Docteur Claude Dussart.

Un profond remerciement au Docteur Paul Tramini qui a suivi ce travail de thèse du début à la fin et qui m'a été d'un soutien sans faille.

Merci également au Professeur Denis Bourgeois qui a été à l'origine de ce doctorat et qui m'a tant appris ces trois dernières années.

À titre plus personnel, je remercie tous mes proches pour leur soutien et tout particulièrement Pierre pour sa patience, ses encouragements et sa confiance.

Caractérisation du microbiome interdentaire des adolescents

Résumé

La carie dentaire est l'une des pathologies chronique d'origine multifactorielle la plus répandue dans le monde. Elle résulte d'un changement dans la composition de la plaque dentaire, avec un passage d'un état de symbiose à un état de dysbiose.

Notre recherche clinique a permis de caractériser qualitativement et quantitativement, par réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, le microbiote interdentaire de 50 adolescents âgés de 15 à 17 ans en fonction du risque carieux. Parmi les 26 pathogènes analysées, aucune des bactéries cariogènes testées ne présentait de différences significatives selon le risque carieux. Seul 3 bactéries connues principalement pour leur implication dans les maladies parodontales (*Streptococcus sobrinus*, *Eikenella corrodens* et *Tannerella forsythia*) étaient significativement surexprimées chez les adolescents à risque carieux élevé.

Ces 3 bactéries orales apparaissent comme des marqueurs prédictifs du risque carieux. Leur quantification interdentaire, permettrait d'améliorer les classifications de risque carieux, de prévenir les lésions carieuses débutantes et de stabiliser les lésions déjà établies. De plus, certains agents pathogènes oraux dont *Eikenella corrodens* et *Tannerella forsythia* sont connus pour être des facteurs de risques, des facteurs d'aggravation voir des facteurs déclencheurs de certaines maladies systémiques. Ainsi, la mise en place d'une prophylaxie interdentaire quotidienne *via* les brossettes interdentaires semble primordiale dès l'adolescence pour rétablir la symbiose du microbiote, prévenir les maladies orales et systémiques comme nous l'avons démontré chez des adultes âgés de 18 à 35 ans.

Mots clés

Adolescents, Risque carieux, Microbiome oral, Microbiote interdentaire, Santé systémique

Laboratoire de rattachement

Laboratoire Parcours Santé Systémique EA4129

Faculté de Médecine Laennec

11 rue Guillaume Paradin

69372 Lyon Cedex 08

Characterization of adolescents' interdental microbiome

Abstract

Dental caries is one of the most common multifactorial chronic diseases in the world. It results from the change in the composition of dental plaque, with a transition from symbiosis to dysbiosis.

Our clinical research characterized, qualitatively and quantitatively by real-time chain polymerization reaction, the interdental microbiota of 50 adolescents aged from 15 to 17 years according to the carious risk. Among the 26 pathogens analyzed, none of the cariogenic bacteria tested showed significant differences according to the carious risk. Only 3 bacteria known mainly for their involvement in periodontal diseases (*Streptococcus sobrinus*, *Eikenella corrodens* and *Tannerella forsythia*) were significantly over-expressed in adolescents with high carious risk.

These 3 oral bacteria appear as predictive markers of carious risk. Interdental quantification would improve carious risk classifications, prevent early carious lesions and stabilize existing lesions. In addition, some oral pathogens including *Eikenella corrodens* and *Tannerella forsythia* are known to be risk factors, aggravating factors and triggers of some systemic diseases. The implementation of daily interdental prophylaxis by using interdental brushes seems essential from adolescence to restore the symbiosis of the microbiota, prevent oral and systemic diseases as we have shown in adults aged 18 to 35 years.

Keywords

Adolescents, Caries risk, Oral microbiome, Interdental microbiota, Systemic health

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, des cancers et des maladies chroniques respiratoires	18
Figure 2. Évolution des politiques de santé pour lutter contre les maladies non transmissibles	20
Figure 3. Évolution des politiques de santé pour lutter contre les maladies non transmissibles	20
Figure 4. Évolution des facteurs de risque des maladies non transmissibles en fonction de l'âge : une approche tout au long de la vie	21
Figure 5. Évolution de la prévalence (%) déclarée du brossage des dents plus d'une fois par jour chez les écoliers de 11 à 15 ans	36
Figure 6. Caries dentaires dans le monde	44
Figure 7. Déséquilibre associé aux lésions carieuses	53
Figure 8. Microbiote oral symbiotique et dysbiotique dans divers habitats de la cavité orale	57
Figure 9. Microenvironnement complexe du microbiote cariogène	60
Figure 10. Microbiote sous-gingival associé à l'apparition de la maladie parodontale	64
Figure 11. Différentes voies de dissémination dans l'organisme	67
Figure 12. Différentes pathologies systémiques en lien avec des pathologies orales	73
Figure 13. Vue sagittale des mâchoires d'une adolescente de 15 ans	92
Figure 14. Caractéristiques anatomiques déterminant la forme des papilles interdentaires	93
Figure 15. Classification de la hauteur des papilles dentaires de Nordland et Tarnow	94
Figure 16. Classification de la hauteur des papilles dentaires de Cardaropoli	95
Figure 17. Position de la papille interdentaire en fonction de la distance entre la crête osseuse et le point de contact	96
Figure 18. Quantification des microorganismes cariogènes chez l'adulte sain	102
Figure 19. Caractérisation du microbiote interdentaire parodontal de jeunes adultes sains	103
Figure 20. Répartition de 2806 espaces interdentaires chez 99 sujets âgés de 18 à 25 ans	108
Figure 21. Distribution des caractéristiques dans les sites interproximaux (30/sujet), en barres, chez 99 adultes	109
Figure 22. Photographies intra-orales chez une adolescente de 17 ans au niveau de l'arcade mandibulaire antérieure	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Méthode du double codage du Système International de Détection et d'Évaluation des lésions Carieuses _____	44
Tableau 2. Facteurs à prendre en compte lors de l'évaluation du risque de nouvelles lésions carieuses chez l'adolescent _____	49
Tableau 3. Formulaire d'évaluation du risque carieux (> 6 ans) _____	50
Tableau 4. Formulaire d'évaluation du risque carieux (> 6 ans) _____	51
Tableau 5. Formulaire d'évaluation du risque carieux chez les enfants et adolescents âgés de 6 ans et plus ____	54

LISTE DES ABBREVIATIONS

AAPD	<i>American Academy of Pediatric Dentistry</i> Académie Américaine de Dentisterie Pédiatrique
ADA	<i>American Dental Association</i> Association Dentaire Américaine
BID	Brossette InterDentaire
CAMBRA	<i>Caries Management by Risk. Assessment</i> Management des Caries par Évaluation des Risques
CAO	Nombre moyen de dents cariées, absentes pour carie et obturées en denture permanente.
ECR	Essais Cliniques Randomisés
ERC	Évaluation du Risque Carieux
HBSC	<i>Health Behaviour in School-Aged Children</i> Comportements liés à la santé chez les enfants scolarisés
IC	Intervalle de Confiance
ICDAS	<i>International Caries Detection and Assessment System</i> Système International de Détection et d'Évaluation des lésions Carieuses
IL	Interleukine
IPP	Indice de Présence Papillaire
JEC	Jonction Email-Cément
LPS	Lipopolysaccharide
OMS	Organisation mondiale de la Santé
OR	Odds Ratio
MNT	Maladie Non Transmissible
MP	Maladie Parodontale
MPOC	Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique
RC	Risque Carieux
RCI	Risque Carieux Individuel
RR	Risque Relatif
SPE	Substances Polymériques Extracellulaires
Th1	T helper 1

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	6
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	8
INTRODUCTION	12
SYNTHESE DE LA LITTERATURE	16
PARTIE 1 - SANTE ORALE, SANTE SYSTEMIQUE	17
I. CADRE POUR LA PREVENTION DES MALADIES NON TRANSMISSIBLES	17
II. SANTE BUCCO-DENTAIRE : APPROCHE TOUT AU LONG DE LA VIE	21
III. ASSOCIATION ENTRE MALADIES PARODONTALES ET MALADIES SYSTEMIQUES	23
1. Méta-analyse sur les maladies parodontales et les maladies cardiovasculaires	24
a. Association entre la maladie parodontale et l'infarctus du myocarde	24
b. Association entre la maladie parodontale et l'hypertension artérielle	24
c. Association entre la maladie parodontale et la maladie artérielle périphérique	24
d. Association entre la maladie parodontale et l'accident vasculaire cérébral ischémique	25
2. Méta-analyse sur les maladies parodontales et la maladie pulmonaire obstructive chronique	25
a. Association entre la maladie parodontale et la maladie pulmonaire obstructive chronique	25
b. Association entre la maladie parodontale et l'apnée obstructive du sommeil	26
3. Méta-analyse sur les maladies parodontales et le cancer	26
a. Association entre la maladie parodontale et le risque de cancer	26
b. Association entre la maladie parodontale et le cancer du pancréas	26
c. Association entre la maladie parodontale et le cancer du sein	27
d. Association entre la maladie parodontale et le cancer du poumon	27
e. Association entre la maladie parodontale et le cancer de la vessie	27
f. Association entre la maladie parodontale et les cancers de la cavité orale	27
g. Association entre la maladie parodontale et le cancer de la tête et du cou	28
4. Méta-analyse sur les maladies parodontales et les pathologies rénale	28
5. Méta-analyse sur les maladies parodontales et la grossesse	28
a. Association entre la maladie parodontale et les issues défavorables de la grossesse	28
b. Association entre la maladie parodontale et la pré-éclampsie	29
6. Méta-analyse sur les maladies parodontales et autres maladies systémiques	29
a. Association entre la maladie parodontale et la polyarthrite rhumatoïde	29
b. Association entre la maladie parodontale et le syndrome métabolique	29
c. Association entre la maladie parodontale et l'athérosclérose carotidienne	30
d. Association entre la parodontite chronique et les maladies dues au virus de l'herpès	30
e. Association entre la maladie parodontale et la dépression	31
f. Association entre la maladie parodontale et la maladie d'Alzheimer	31
g. Association entre la maladie parodontale et le surpoids / obésité chez les enfants et les adolescents	31
PARTIE 2 - SANTE ORALE DES ADOLESCENTS	32
I. INDICATEURS EUROPEENS DE LA SANTE ORALE	32
1. Brossage biquotidien avec un dentifrice fluoré	32
a. Brossage dentaire : Techniques et recommandations	32
b. Effet de la fréquence de brossage sur l'incidence de la carie	33
c. Brosse à dents électrique ou manuelle	33

d.	Déterminants socioéconomiques et comportementaux de la fréquence de brossage	34
2.	Prévalence des scellements de sillons	37
3.	Prise en charge des besoins en orthodontie	37
4.	Carie de la première molaire permanente	38
5.	Fluorose dentaire	39
6.	Consommation quotidienne de nourritures et de boissons	40
7.	Consommation de tabac	41
8.	Visite dentaire dans les 12 derniers mois et raison de la dernière visite	42
9.	Prévalence des lésions non traitées et l'évaluation de la sévérité des lésions	42
10.	Évaluation de la santé parodontale	45
11.	Érosion dentaire	45
II.	CLASSIFICATIONS DU RISQUE CARIEUX DES ADOLESCENTS	46
1.	Classification de l'Association Dentaire Américaine	49
2.	Classification de l'Académie Américaine de Dentisterie Pédiatrique	51
3.	Classification Management des Caries par Évaluation des Risques	52
PARTIE 3 - MICROBIOTE, SANTE ORALE ET SANTE GENERALE		56
I.	MICROBIOTE ORAL	56
II.	MICROBIOTE ORAL ET DYSBIOSE	57
1.	Microbiote oral et caries	58
a.	Composition du microbiote	58
b.	Mécanique de la dysbiose carieuse	59
2.	Microbiote oral et parodontites	63
a.	Composition du microbiote	63
b.	Mécanique de la dysbiose parodontale	63
III.	DISSEMINATION DU MICROBIOTE ORAL DANS L'ORGANISME	66
1.	Diffusion par voie sanguine	67
a.	Infection métastatique	67
b.	Lésions métastatiques	69
c.	Inflammation métastatique	69
2.	Diffusion par voie digestive	69
3.	Diffusion par voie respiratoire	71
a.	Aspiration de pathogènes oraux	71
b.	Modification des surfaces muqueuses par des enzymes salivaires associées à la maladie parodontale	72
c.	La destruction de pellicule salivaire protectrice par des bactéries orales	72
d.	Altérations de l'épithélium respiratoire par les cytokines	72
IV.	PRINCIPALES MALADIES SYSTEMIQUES EN LIEN AVEC LES PATHOLOGIES ORALES (ARTICLE 1)	73
PARTIE 4 - ESPACES INTERDENTAIRES : UNE NICHE ECOLOGIQUE PARTICULIERE		92
I.	ESPACES INTERDENTAIRES	92
1.	Caractéristiques anatomo-physiologiques	92
2.	Variabilités anatomiques	95
a.	Variabilités « physiologiques »	95
b.	Variabilités « pathologiques »	98
II.	CARACTERISTIQUES DU MICROBIOTE INTERDENTAIRE	100
III.	PROPHYLAXIE INDIVIDUELLE	103
1.	Fil dentaire	103
2.	Jets dentaires	105
3.	Brossettes interdentaires	107

RESULTATS DES ETUDES CLINIQUES SUR LE MICROBIOTE INTERDENTAIRE	112
Microbiote de l'espace interdentaire des adolescents en fonction du risque carieux : un protocole d'étude transversale (ARTICLE 2)	113
Le microbiome bactérien oral des surfaces interdentaires chez les adolescents en fonction du risque carieux (ARTICLE 3)	120
Quantification des pathogènes carieux dans le microbiote interdentaire de jeunes adultes indemnes de caries (ARTICLE 4)	146
Brossage interdentaire calibré pour la prévention de l'infection par des agents pathogènes parodontaux chez les jeunes adultes - un essai clinique contrôlé randomisé (ARTICLE 5)	167
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	181
BIBLIOGRAPHIE	186

INTRODUCTION

En 2017, les trois pathologies les plus courantes au niveau mondial concernent respectivement la santé orale (3,47 milliards, 95% UI 3,27–3,68), les troubles liés aux céphalées (3,07 milliards, 95% UI 2,90–3,27) et la tuberculose (1,93 milliard, 95% UI 1,71–2,20)(1). Parmi les pathologies orales, la carie et la maladie parodontale (MP) représentent les maladies humaines à médiation microbienne les plus répandues dans le monde (2).

La carie est une maladie multifactorielle, dynamique, due à un biofilm dépendant de la présence de sucre, qui entraîne la déminéralisation et la reminéralisation des tissus dentaires (3). La carie résulte de la dissolution des tissus minéralisés par une réduction du pH due à la fermentation prolongée de glucides par des bactéries organisées dans une structure de biofilm locale qui limite la capacité de la salive à laver ou à tamponner les produits métaboliques acides (4–6). La diversité des biofilms des surfaces dentaires est influencée par la consommation de glucides et par l'état de santé d'une surface (7). Les caries sont associées à une dysbiose du microbiote caractérisé par l'accumulation de bactéries aciduriques et acidophiles (8). Le déséquilibre entre les facteurs de risques et les facteurs protecteurs influence l'initiation et la progression des caries (3).

Le risque de développer des caries chez les individus dépend de facteurs tels que le système immunitaire et le microbiote oral, eux-mêmes affectés par des déterminants environnementaux et génétiques (9). L'espace interdentaire est l'un des principaux sites à risque de carie. En effet, en raison de son organisation anatomique et de sa localisation, l'espace interdentaire est une micro-niche écologique protégée extérieurement par la gencive papillaire (4,10). A l'intérieur de chacun des espaces interdentaires, le biofilm va s'accumuler et se structurer (11). Chez les sujets en bonne santé, l'espace interdentaire a un diamètre compris entre 0,6 et 1,1 mm (4,10). La salive, en raison de contraintes d'accessibilité anatomiques, ne peut pas circuler facilement. Ainsi, sans salive adéquate, la clairance orale des aliments sucrés ou acides sera plus longue et il y aura moins d'urée disponible pour aider à augmenter le pH du biofilm de la plaque (12). De plus, l'accès aux espaces interdentaires par les méthodes conventionnelles de prophylaxie individuelle est limité. Si le brossage des dents est optimal pour nettoyer les surfaces occlusale, vestibulaire et linguale / palatine, aucune des méthodes de brossage des dents n'est efficace pour éliminer la plaque dentaire interproximale ou désorganiser le biofilm (13). L'efficacité de l'élimination de la plaque après le brossage a été estimée à environ 42% (14).

L'adolescence est étroitement associée à un risque carieux élevé. Au total, 67% des adolescents américains présentaient une carie dentaire, avec une carie non traitée dans 20% des cas (15). Les faces interproximales des molaires sont les faces principalement touchées (16). Les lésions de l'émail au niveau des surfaces proximales représentent plus de 80% de toutes les lésions carieuses chez les jeunes Suédois de 16 ans (17). Il existe très peu d'études épidémiologiques chez les

adolescents en France. Les dernières données de 2017, concernaient un échantillon de 925 élèves de 14 à 15 ans et parmi eux, la prévalence carieuse était de 32% (18). Mais l'étude ne détaille pas la méthodologie de recueil des données, ni le seuil de détection de la carie. De nos jours, l'utilisation d'indicateur clinique comme le Système International de Détection et d'évaluation des lésions Cariées (ICDAS) permet d'assurer une prévention et une prise en charge optimale des caries dès leur stade initial (19). À l'adolescence, les changements d'habitudes alimentaires associés à une consommation excessive de glucides, de sodas ou boissons sucrées, énergisantes, d'aliments et de collations pourraient contribuer à modifier l'équilibre du microbiote oral (20,21). Certes, la déminéralisation peut être inhibée par des composants salivaires, des agents antibactériens et du fluor ou inversée par la reminéralisation, ce qui nécessite du calcium, du phosphate et du fluor (22). Cependant, au niveau de l'espace interdentaire, l'apport topique de fluor *via* le dentifrice n'a qu'une action très limitée. De plus, l'hygiène orale et le brossage des dents ne sont pas toujours une priorité durant cette période, considérée à risque (23).

Bien que la carie réponde favorablement à une logique préventive, l'accès aux interventions de prévention communautaires visant à promouvoir la santé bucco-dentaire des adolescents, c'est-à-dire les politiques, les activités éducatives, les programmes de prévention, est plus compliqué car ils concernent principalement la petite enfance et l'enfance (24). En développant la prévention, on peut agir en amont sur les principaux déterminants des maladies et de leurs facteurs de risque. Mais aujourd'hui, les conditions d'intégration de la prévention dans la pratique des professionnels de santé ne sont pas réunies (25). Le processus clinique classé comme stade carieux précoce peut être réduit voir inversé en pratiquant une bonne hygiène bucco-dentaire (26). Cela soulève la problématique du risque carieux ou plus particulièrement de ou des classifications du risque carieux de l'adolescent. Classer un adolescent selon son risque répond à une logique opérationnelle fondée principalement sur les déterminants. En l'occurrence, agir sur les facteurs de risque permet de réduire la probabilité d'apparition de l'événement carieux, de permettre une réduction du niveau de risque et surtout de mettre en avant des valeurs prédictives d'apparition de la maladie. Classer un adolescent selon son risque correspond également à une logique clinique fondée sur la prise en charge des lésions carieuses de manière précoce. Avec un triptyque (patient, praticien, soin) qui a évolué au cours du temps, lié principalement à l'évolution des connaissances, on est passé d'une dentisterie invasive à une dentisterie prédictive.

Bien que le microbiote soit le facteur étiologique majeur et indispensable à l'apparition de lésions carieuses, les recherches liées à la détermination des profils bactériens interdentaires sont extrêmement limitées. On ignore encore quels micro-organismes ont un impact positif ou négatif sur les patients en ce qui concerne les considérations cliniques (27). Alors que des travaux récents

ont caractérisé le microbiote interdentaire parodontal de l'adulte sain (28), aucune étude fondée sur l'utilisation de la technique de PCR en temps réel a analysé le microbiote interdentaire des jeunes de 15 à 17 ans.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un thème de recherche multidisciplinaire de l'équipe EA 4129 Parcours Santé Systémique de l'Université de Lyon, focalisée sur l'espace interdentaire de populations sans lésions cliniques bucco-dentaires. Multidisciplinaire puisque qu'il regroupe des équipes issues de la microbiologie, de la biologie moléculaire, de la clinique, d'épidémiologistes, de santé publique, de cariologistes et de parodontistes. Il propose pour chaque catégorie d'âge, les adolescents et les jeunes adultes, une connaissance bactérienne détaillée du microbiote interdentaire *via* l'utilisation de la technique de PCR en temps réel. Il contribue dans un deuxième temps au développement, à l'efficacité et à la valorisation d'outils de prophylaxie individuelle dont l'objectif est la désorganisation du biofilm interdentaire. Enfin, il évalue cliniquement dans le cadre d'essais cliniques randomisés l'impact des dits outils sur la réduction de l'inflammation et le rétablissement symbiotique du microbiote interdentaire. Notre recherche est la première contribution apportée sur le microbiote interdentaire des adolescents. Elle identifie qualitativement et quantitativement les bactéries carieuses et parodontales des espaces interdentaires des adolescents en fonction de leurs risques carieux.

SYNTHESE DE LA LITTERATURE

PARTIE 1 - SANTE ORALE, SANTE SYSTEMIQUE

I. CADRE POUR LA PREVENTION DES MALADIES NON TRANSMISSIBLES

Les maladies non transmissibles (MNT), principalement les maladies cardiovasculaires, les cancers, le diabète et les maladies pulmonaires chroniques, représentent 70% de tous les décès dans le monde, soit plus que toutes les autres causes combinées. L'Organisation mondiale de la Santé (OMS) estime que 40 millions de personnes meurent chaque année des suites de MNT, dont 15 millions de personnes prématurément (29). De nombreux risques pour le développement des MNT ont leur origine au début de la vie (Figure 1). La malnutrition prénatale et l'insuffisance pondérale à la naissance créent une prédisposition à l'obésité, à l'hypertension artérielle, aux maladies cardiaques et au diabète, et les conditions de grossesse, telles que l'obésité maternelle et le diabète gestationnel, sont associées à des maladies cardiovasculaires et au diabète chez la mère et l'enfant (30–35). De plus, les facteurs de risque sont souvent liés. Par exemple, l'usage du tabac et l'exposition à la fumée secondaire contribuent à l'obésité, au diabète et aux maladies infectieuses, ainsi qu'à l'asthme, aux cancers et aux maladies cardiovasculaires chez les fumeurs et les non-fumeurs (36–38).

L'adolescence est une période de développement physique, neurologique, social et sexuel rapide, marquée par l'importance croissante des réseaux sociaux, des choix comportementaux individuels et une prise de risque accrue (39). Il est dit classiquement que l'adolescent est indestructible. Il s'agit d'une période charnière pour le développement des MNT, dont la prévention peut générer un triple avantage : pour les adolescents d'aujourd'hui, pour leur future vie d'adulte et pour la génération suivante (40). Cependant, bien que près de 35% de la charge mondiale de morbidité trouve son origine dans l'adolescence et que plus de 3000 adolescents meurent chaque jour, principalement de MNT, de blessures intentionnelles et non intentionnelles, les adolescents sont généralement oubliés dans les discussions internationales (41).

Les MNT ont des effets considérables sur les enfants et les adolescents. Tout d'abord, l'incidence des MNT augmente chez les enfants. La charge de plus en plus lourde de l'obésité, du diabète et d'autres MNT est peut-être la menace la plus grande qui pèse sur des millions de jeunes dans le monde aujourd'hui (42,43). Le diabète de type 2, qui touchait presque uniquement les adultes, s'observe désormais également chez les enfants (44). Les enfants et les adolescents des pays à revenu faible ou intermédiaire atteints de MNT décèdent souvent prématurément en raison

d'un diagnostic tardif (45). Enfin, parmi les adolescents de 10 à 19 ans, une part importante du fardeau mondial des MNT est due aux maladies mentales. La dépression est la troisième cause de morbidité et d'incapacité chez les adolescents, et l'automutilation, qui comprend à la fois le suicide et la mort accidentelle résultant d'une automutilation sans intention de suicide, est la troisième cause de décès chez les adolescents de 15 à 19 ans (41).

Alors que les profils de facteurs de risque pour le développement des MNT chez les adolescents varient considérablement en fonction du sexe et des pays et des régions, de nombreuses MNT sont associées à des comportements initiés et établis pendant l'enfance ou l'adolescence, notamment la consommation de tabac et d'alcool, les régimes alimentaires malsains et les modes de vie sédentaires. En outre, près de la moitié des troubles mentaux commencent à l'âge de 14 ans, mais le plus souvent ne sont ni identifiés ni traités (46).

Les causes sous-jacentes des MNT sont, d'une part, les déterminants sociaux, économiques et environnementaux, notamment la pauvreté, le chômage, la discrimination, l'absence d'éducation, et des politiques commerciales ; et, d'autre part, les facteurs de risque communs tels que la consommation de tabac et d'alcool, l'absence d'activité physique, et une alimentation déséquilibrée riche en sel, en gras saturés et en sucres ajoutés (Figure 1)(47). Les maladies bucco-dentaires partagent toutes ces déterminants sous-jacents et facteurs de risque avec les autres grandes MNT (48).

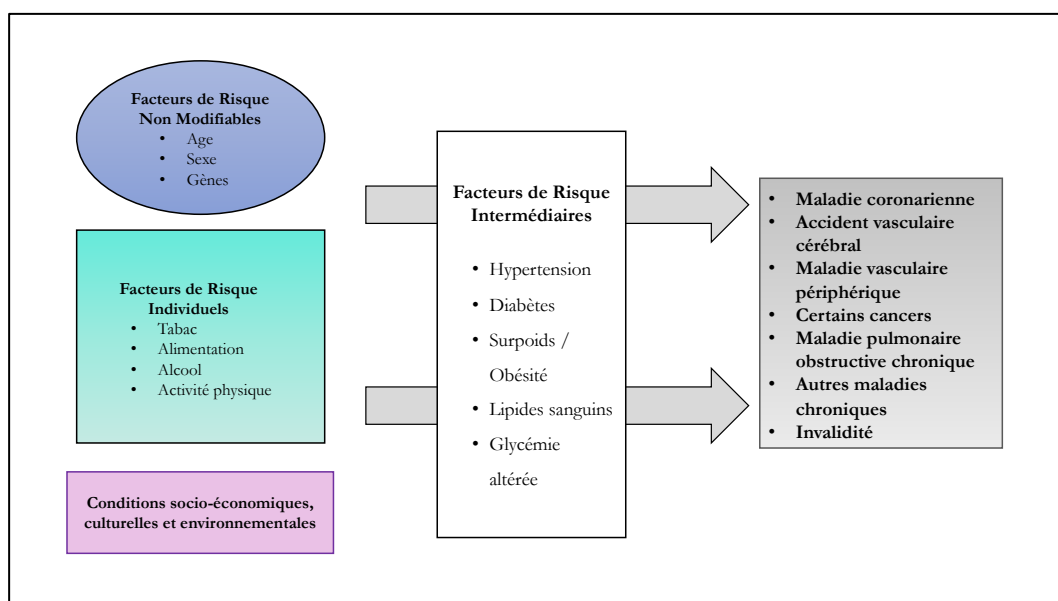


Figure 1. Les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, des cancers et des maladies chroniques respiratoires (49).

La prévention et la maîtrise des MNT se fondent sur l'intégration de l'approche basée sur des facteurs de risque communs et sur des actions traitant les déterminants sociaux communs plus larges de la santé (50).

Historiquement, la santé bucco-dentaire et la médecine dentaire ont cherché à être reconnues comme des spécialités distinctes de la santé et de la médecine générale. On convient aujourd'hui que cette volonté ancrée et délibérée d'une « identité » distincte est l'une des raisons de la faible priorité et de la négligence de la santé bucco-dentaire dans les agendas sanitaires internationaux (51).

Dans la mesure où les maladies bucco-dentaires partagent les mêmes facteurs de risque et déterminants, il est logique d'intégrer les objectifs de santé bucco-dentaire aux stratégies orientées vers l'ensemble des MNT. De même, dans la mesure où la plupart des déterminants à la fois de la santé bucco-dentaire et de l'état de santé général restent hors du champ d'influence directe des systèmes sanitaires, il est nécessaire d'adopter une action intersectorielle complète pour améliorer la santé. Chaque opportunité doit être saisie pour défendre l'inclusion de « la santé bucco-dentaire dans toutes les politiques ».

À ce titre, le paragraphe 19 de la Déclaration politique des Nations Unies en 2011 sur la prévention et la maîtrise des MNT énonce de manière explicite que les maladies bucco-dentaires partagent les mêmes déterminants que les autres MNT (52).

De même, l'Assemblée mondiale de la Santé de l'OMS a adopté en 2013 un plan d'action mondial afin d'arriver à diminuer la charge mondiale de morbidité des MNT : « *Il est essentiel de promouvoir en permanence l'intégration des maladies bucco-dentaires dans ces plans d'action nationaux pour pouvoir diminuer les inégalités en santé bucco-dentaire et alléger la charge de morbidité des maladies bucco-dentaires* » (Figure 2 et 3)(53).

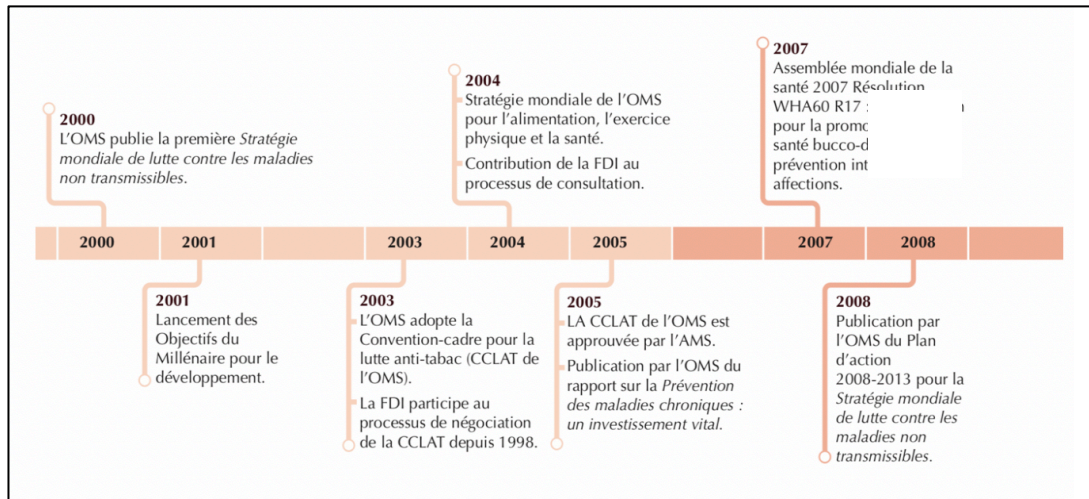


Figure 2. Évolution des politiques de santé pour lutter contre les maladies non transmissibles (53).
Plan d'action mondial de l'Organisation mondiale de la Santé de 2000 à 2008.

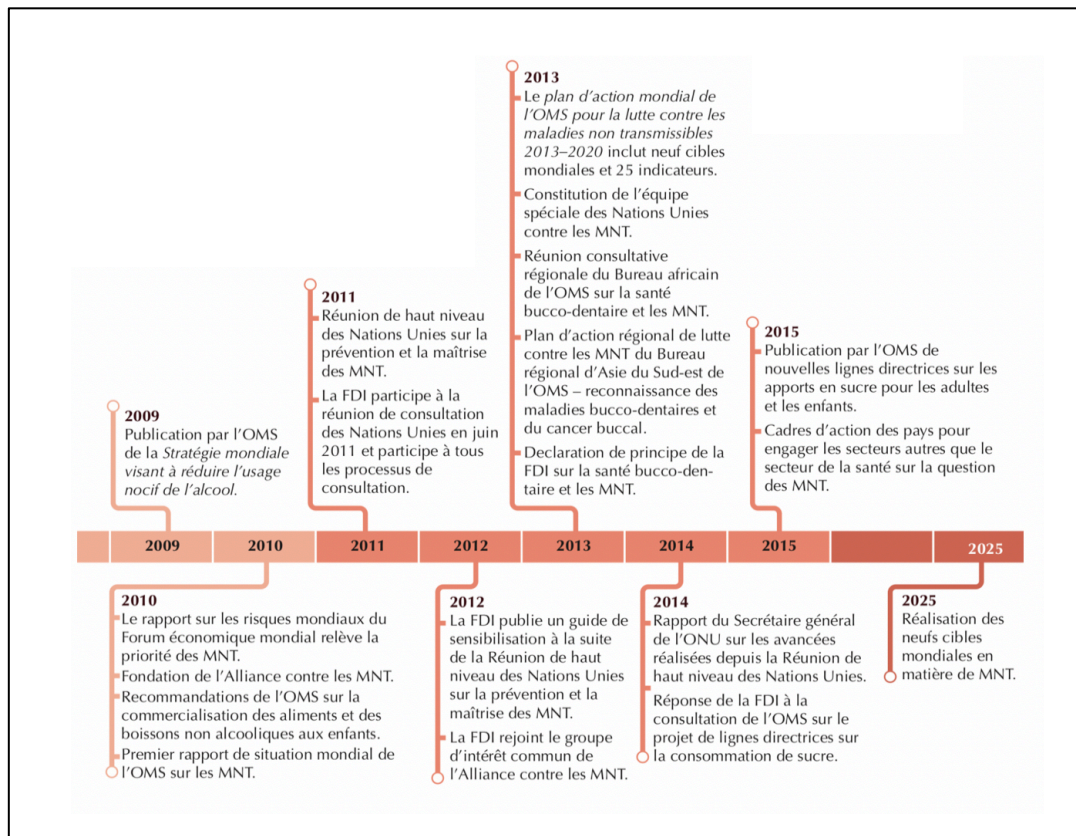


Figure 3. Évolution des politiques de santé pour lutter contre les maladies non transmissibles (53).
Plan d'action mondial de l'Organisation mondiale de la Santé de 2009 à 2025.

Il existe enfin un consensus sur les stratégies et les approches nécessaires pour promouvoir des comportements sains pendant l'adolescence afin de prévenir les MNT.

Une approche du cycle de vie, qui reconnaît que les possibilités de prévention et de promotion de comportements sains se produisent à différentes étapes du cycle de vie, du début de la vie, à l'enfance et à l'adolescence jusqu'à l'âge adulte (Figure 4)(54).

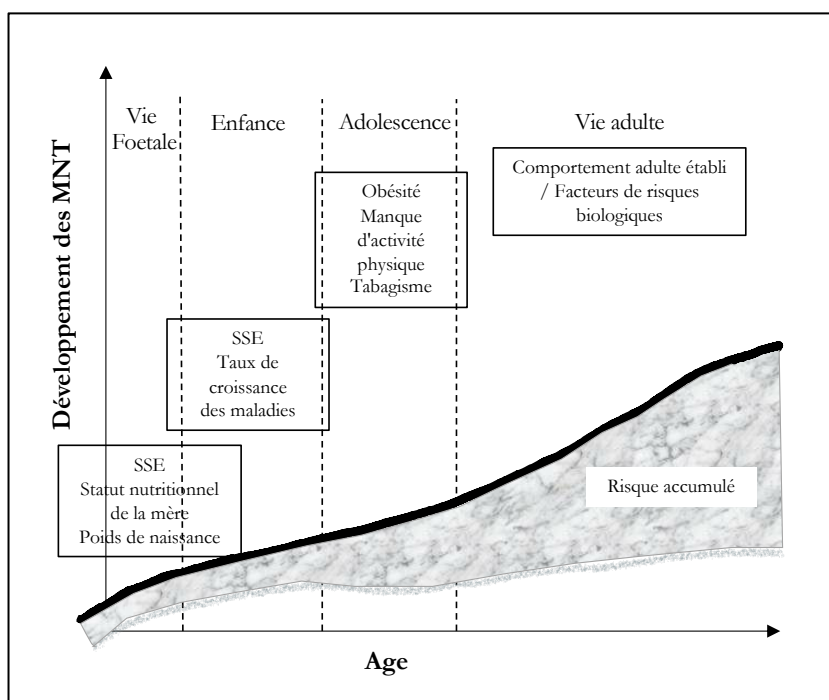


Figure 4. Évolution des facteurs de risque des maladies non transmissibles en fonction de l'âge : une approche tout au long de la vie (49).

SSE : Statut Socio-Economique, MNT : Maladies Non Transmissibles

Une approche intégrée, complète et normalisée de la santé des adolescents et de la prestation de services qui va au-delà de la grossesse chez les adolescentes et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) pour répondre à tous les besoins des adolescents en matière de santé et de développement, y compris les problèmes de santé mentale (41). Une approche multisectorielle et multipartite comprenant un large engagement du secteur public dans les domaines de la santé, de l'éducation, du développement des jeunes, du commerce et des finances, de la planification urbaine, ainsi que de la société civile et du secteur privé pour s'attaquer aux déterminants comportementaux, sociaux et environnementaux de risque (55,56).

II. SANTE BUCCO-DENTAIRE : APPROCHE TOUT AU LONG DE LA VIE

Les maladies bucco-dentaires ont un impact majeur sur l'état général et sur la qualité de vie (57). Une dentition en bonne santé et en bon état est importante à toutes les étapes de la vie pour les fonctions humaines essentielles, telles que parler, manger, sourire et s'engager dans des activités sociales. Des dents saines sont de la plus haute importance pour la santé et le bien-être tout au long de la vie (58). De même, de bonnes pratiques d'hygiène bucco-dentaire et des soins dentaires professionnels, associés à un mode de vie sain et à la suppression des risques tels qu'une

consommation élevée de sucre et une consommation de tabac permettent de conserver une dentition en bon état pendant toute sa vie.

L'amélioration de l'espérance de vie, et l'accroissement de la population de personnes plus âgées qui en résulte, accentuent l'importance d'une approche tout au long de la vie pour la santé bucco-dentaire. Ainsi, la relation bidirectionnelle très étroite entre santé bucco-dentaire et état général, offre une base conceptuelle solide pour intégrer les soins bucco-dentaires aux soins généraux. En effet, les interventions curatives ne sont ni réalistes ni durables pour alléger la charge de morbidité de la carie dentaire. Il est essentiel de mettre davantage l'accent sur la promotion de bonnes habitudes alimentaires et sur la réduction de la consommation de sucre (51).

Le sucre est l'un des principaux facteurs de risque de la carie et réduire sa consommation dans le cadre d'une alimentation saine permet d'améliorer la santé bucco-dentaire et peut contribuer à limiter le diabète, l'obésité et d'autres MNT. D'autre part la consommation de tabac est la principale cause mondiale évitable de décès et de maladies, y compris des maladies bucco-dentaires. Enfin, la consommation excessive d'alcool est l'un des principaux facteurs de risque de plus de 200 maladies, dont le cancer oral et les MP. Elle doit être traitée dans le cadre d'une approche globale de toutes les MNT. « *La charge de morbidité liée à l'alcool, ainsi que son poids social et économique, risquent encore de s'alourdir à moins que des politiques de prévention efficaces et des mesures basées sur les meilleures données probantes disponibles ne soient déployées à l'échelle mondiale.* » a déclaré Oleg Chestnov, sous-directeur général du Programme des maladies non transmissibles et santé mentale de l'OMS en 2014.

La santé orale apparaît ainsi prioritaire de développer un plan d'action pour la promotion de la santé bucco-dentaire, se fondant sur le principe que les MNT les plus répandues comme le diabète, les maladies cardiaques et respiratoires, et certaines formes de cancer entraînent également des maladies buccodentaires. L'« Approche par les Facteurs de Risque Communs » vise à réduire les facteurs de risques communs à plusieurs MNT (59). La santé bucco-dentaire peut bénéficier des stratégies de lutte contre les MNT, en particulier des réponses apportées aux facteurs de risque communs (60) ; en retour, les stratégies visant à améliorer la santé bucco-dentaire peuvent aussi contribuer de manière importante aux cibles des MNT mondiales définies pour 2025 (61).

À ce titre, il est important de connaître les associations étroites existant entre santé bucco-dentaire, plus particulièrement la santé parodontale, et la santé générale, et d'y être sensibilisé, et de

garantir la collaboration entre les professionnels de santé bucco-dentaire et les professionnels en santé générale, pour pouvoir fournir des soins holistiques.

III. ASSOCIATION ENTRE MALADIES PARODONTALES ET MALADIES SYSTEMIQUES

Des preuves solides montrent l'association de MP à des maladies chroniques telles que les maladies cardiovasculaires, le diabète et les issues défavorables d'une grossesse (62). Les conditions parodontales ont fait l'objet de nombreuses études depuis plus d'un siècle et de nombreuses études ont été menées pour lutter contre ces maladies (63). Il existe suffisamment d'informations pour permettre un contrôle efficace des formes courantes de la maladie (64). Enfin, si le domaine de la recherche parodontale a généré plus de questions que de réponses au cours des quatre dernières décennies, c'est une conséquence inévitable des progrès réalisés : plus nous comprenons, plus nous en savons (65).

L'identification d'une association potentielle avec les maladies chroniques est un aspect majeur de la prévention et du traitement des MP. Par conséquent, la prévention et la prise en charge des MP influencent la qualité de vie de nombreuses personnes. La période de l'adolescence est directement concernée par cette problématique dans la logique du cycle tout au long de la vie abordée précédemment (66).

L'objectif de ce chapitre est de produire une synthèse de l'association potentielle de maladies systémiques et de MP en identifiant les méta-analyses récentes et disponibles, 2015-2019.

Les recherches sur PubMed, Embase et la Cochrane Library restreinte à l'anglais ont été finies en septembre 2019 à l'aide du terme MeSH (Medical Subject Headings), « meta-analysis » ET « periodontal diseases » ET « periodontitis », et de 20 termes de recherche différents pour « chronic diseases » : « cardiovascular diseases », « metabolic syndrome », « obstructive sleep apnea », « myocardial infarction », « overweight », « obesity », « arterial hypertension », « atherosclerosis », « chronic obstructive pulmonary disease », « rheumatoid arthritis », « cancer », « diabetes », « chronic diseases », « chronic kidney disease », « rheumatoid arthritis », « pregnancy », « pre-eclampsia », « mental health », « depression », « Alzheimer's disease ». Sont présentés dans cette synthèse un résumé de méta-analyses comprenant les principaux résultats et les conclusions des auteurs tels qu'ils figurent dans les publications retenues.

1. Méta-analyse sur les maladies parodontales et les maladies cardiovasculaires

a. Association entre la maladie parodontale et l'infarctus du myocarde (67)

Vingt-deux études observationnelles portant sur 4 cohortes, 6 études transversales et 12 études cas-témoins incluant 129 630 participants ont été retenues. Les patients atteints de MP ont un risque accru d'infarctus du myocarde (Odds Ratio (OR) = 2,02 ; IC (Intervalle de Confiance) 95% = 1,59-2,57). Une hétérogénéité substantielle des estimations du risque a été révélée. Des analyses de sous-groupes ont montré qu'un risque plus élevé d'infarctus du myocarde existait chez les patients atteints de MP à la fois dans les études transversales (OR = 1,71 ; IC 95% = 1,07-2,73) et les études cas-témoins (OR = 2,93 ; IC 95% = 1,95-4,39) mais aussi plus légèrement dans les études de cohorte (OR = 1,18 ; IC 95% = 0,98-1,42). De plus, les méta-analyses de sous-groupes en fonction du lieu, de l'exposition à la MP, du nombre de participants et de la qualité de l'étude ont montré que la MP était associée de manière significative à un risque élevé d'infarctus du myocarde. Cependant, la relation de cause à effet entre la MP et l'infarctus du myocarde n'est toujours pas établie sur la base des estimations combinées d'études observationnelles. D'autres études sont nécessaires.

b. Association entre la maladie parodontale et l'hypertension artérielle (68)

Seize études évaluant l'association entre les MP et l'hypertension artérielle ont été incluses. La méta-analyse portant sur toutes les études incluses, parodontite modérée à sévère, a montré que la présence d'hypertension artérielle était associée à la présence de MP (OR = 1,50 ; IC à 95% = 1,27-1,78). Fait intéressant, lorsque seules les études avec un diagnostic sûr de parodontite sévère et d'hypertension artérielle ont été considérées, un OR de 1,64 (IC à 95% = 1,23-2,19) a été mesuré. Par conséquent, les MP sont associées à un risque plus élevé d'hypertension artérielle, en particulier pour les parodontites sévères. Cependant, aucune conclusion n'a pu être tirée en ce qui concerne l'implication causale des MP, principalement en raison du nombre réduit d'études prospectives disponibles et des questions en suspens concernant les mécanismes biologiques sous-jacents.

c. Association entre la maladie parodontale et la maladie artérielle périphérique (69)

Sept études comprenant un total de 4307 participants ont été incluses dans la méta-analyse. L'analyse groupée a montré qu'il existait une différence significative dans le risque d'être atteint de MP entre les patients souffrant de maladie artérielle périphérique et les participants non atteints de maladie artérielle périphérique ($p = 0,01$). Aucune différence significative n'a été observée en ce

qui concerne la perte d'attache clinique entre les patients souffrant de maladie artérielle périphérique et les participants sains ($p = 0,686$). Les résultats ont révélé une relation significative entre la MP et la maladie artérielle périphérique. D'autres études de haute qualité et bien conçues, assorties de critères d'inclusion et d'exclusion spécifiques, sont nécessaires pour renforcer les conclusions de cette étude.

d. Association entre la maladie parodontale et l'accident vasculaire cérébral ischémique (70)

Huit études ont été incluses dans la revue systématique (5 études cas-témoins et 3 études de cohorte). Ces méta-analyses ont montré une association statistiquement significative entre la MP et l'accident vasculaire cérébral ischémique, avec des risques relatifs (RR) pour la cohorte de 2,52 [1,77-3,58] et des RR pour les études cas-témoins regroupées de 3,04 [1,10-8,43].

2. Méta-analyse sur les maladies parodontales et la maladie pulmonaire obstructive chronique

a. Association entre la maladie parodontale et la maladie pulmonaire obstructive chronique (71)

Quatorze études portant sur 3348 patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) et 20612 témoins non atteints de MPOC ont été incluses et 9 indices parodontaux ont été analysés. Les différences moyennes [IC à 95%] entre les sujets atteints de MPOC et les sujets témoins pour la profondeur de sondage, la perte d'attachement clinique, le niveau de perte d'os alvéolaire, l'indice de plaque, l'indice d'hygiène orale, l'indice de saignement, le saignement au sondage, l'indice gingival et le nombre de dents restantes étaient respectivement de : 0,261 [0,020-0,501], 0,480 [0,280-0,681] 0,127 [0,000-0,254], 0,226 [0,043-0,408], 0,802 [0,326-1,279], 0,241 [-0,106-0,588], 6,878 [5,89-8,266], 0,364 [0,036-0,692] et -3,726 [-5,120 - -2,331]. Ainsi, les patients atteints de MPOC souffrent d'un état de santé parodontal plus mauvais, avec des poches parodontales plus profondes, une perte d'attache clinique élevée, une hygiène orale plus mauvaise, une inflammation et des saignements plus nombreux et un nombre de dents restant inférieur. Néanmoins, compte tenu des limites de la méta-analyse, il est nécessaire de mener de nouvelles études pour valider la conclusion.

b. Association entre la maladie parodontale et l'apnée obstructive du sommeil (72)

Six études répondaient aux critères d'inclusion définis pour cette revue. Les auteurs ont évalué l'association entre la MP et l'apnée obstructive du sommeil. Les résultats de la MP comprenaient la perte d'attache clinique, la profondeur des poches parodontales, les indices d'hygiène orale, la perte radiographique d'os alvéolaire et le dosage des cytokines salivaires. La méta-analyse de 4 études a révélé une association statistiquement significative entre la MP et l'apnée obstructive du sommeil (rapport de cotes combiné = 1,65 ; IC à 95% = 1,11-2,46 ; p = 0,01). La relation de cause à effet de la MP et de l'apnée obstructive du sommeil est discutable. Des recherches supplémentaires avec des études cas-témoins sont justifiées.

3. Méta-analyse sur les maladies parodontales et le cancer

a. Association entre la maladie parodontale et le risque de cancer (73)

Sur les 490 articles initialement identifiés, 10 ont été inclus dans la synthèse qualitative et 8 dans la synthèse quantitative. Compte tenu des ratios de risque, une association statistiquement significative a été observée pour tous les cancers étudiés (1,14 ; IC 95% = 1,04-1,24), le cancer du tube digestif (1,34 ; IC 95% = 1,05-1,72), le cancer du pancréas (1,74 ; IC 95% = 1,21-2,52), le cancer de la prostate (1,25 ; IC 95% = 1,04-1,51), le cancer du sein (1,11 ; IC 95% = 1,00-1,23), le cancer du corps de l'utérus (2,20 ; IC 95% = 1,16-4,18), le cancer du poumon (1,24 ; IC 95% = 1,06-1,45), le cancer hématologique (1,30 ; IC 95% = 1,11-1,53), le cancer de l'œsophage et de l'oropharynx regroupés (2,25 ; IC 95% = 1,30-3,90) et le lymphome non hodgkinien (1,30 ; IC 95% = 1,11-1,52). Finalement, malgré le peu de preuves scientifiques et compte tenu de la faible puissance statistique des résultats, cette revue systématique a révélé un manque substantiel d'études avec des méthodes standardisées et comparables permettant de spéculer sur l'association entre la MP et le cancer.

b. Association entre la maladie parodontale et le cancer du pancréas (74)

Le RR pour la MP et le cancer du pancréas était de 1,74 (IC 95% = 1,41-2,15). La plupart des études ont été ajustées pour tenir compte des variables supposées être associées au cancer du pancréas, telles que le sexe, le tabagisme, l'indice de masse corporelle (IMC), le diabète et l'alcool. À l'aide d'une méta-analyse, la MP semble être associée au cancer du pancréas, même après

ajustement pour les facteurs de risque communs. À ce jour, les mécanismes entre la MP et le cancer du pancréas sont incertains, mais pourraient être liés à des changements dans le microbiote oral.

c. Association entre la maladie parodontale et le cancer du sein (75)

Huit études, portant sur 168 111 personnes, ont été identifiées comme ayant exploré l'association entre la MP et le cancer du sein. Les estimations récapitulatives à la lumière des données ajustées ont montré que la MP augmentait la susceptibilité au cancer du sein (RR = 1,18 ; IC 95% = 1,11-1,26) avec des résultats robustes confirmés par une analyse de sensibilité. Il existe des preuves d'une association positive modeste entre la MP et le cancer du sein.

d. Association entre la maladie parodontale et le cancer du poumon (76)

Cinq études de cohorte ont été incluses, impliquant 321 420 participants. Les estimations basées sur les données ajustées ont montré que la MP était associée à un risque significatif de cancer du poumon (OR = 1,24 ; IC 95% = 1,13-1,36). Aucun biais de publication n'a été détecté. Une analyse de sous-groupe a indiqué que l'association MP et cancer du poumon restait significative dans la population féminine. Les études de cohorte suggèrent que les patients ayant une MP présentent un risque accru de cancer du poumon.

e. Association entre la maladie parodontale et le cancer de la vessie (77)

Cinq études de cohortes ont été identifiées et incluses dans cette méta-analyse, portant sur 1 104 cas de cancer de la vessie chez 298 476 participants. Les estimations récapitulatives basées sur les données ajustées ont montré que la MP n'était pas associée de manière significative au risque de cancer de la vessie (Hazard Ratio (HR) = 1,09 ; IC 95% = 0,95-1,25). Un résultat similaire a également été observé après des analyses cumulatives, de sous-groupes et de sensibilité. Les études actuelles de cohorte suggèrent que les patients atteints de MP ne risquent pas davantage de développer un cancer de la vessie.

f. Association entre la maladie parodontale et les cancers de la cavité orale (78)

Onze études cas-témoins ont été incluses. Une hétérogénéité statistiquement significative existait dans la méta-analyse ($p < 0,05$). Les résultats regroupés ont indiqué qu'une corrélation significative entre la MP et le risque de cancer de la bouche (OR = 3,21 ; IC à 95% = 2,25-4,16 ; p

< 0,05). Par conséquent, la MP peut augmenter le risque de cancer de la cavité orale de près de 2 fois.

g. Association entre la maladie parodontale et le cancer de la tête et du cou (79)

La méta-analyse à effets aléatoires portant sur sept études observationnelles (deux cohortes et six études cas-témoins) a révélé une association significative entre le risque de MP et le risque de cancer de la tête et du cou (OR = 2,63 ; IC à 95% = 1,68-4,14 ; $p < 0,001$). Une analyse de sensibilité a montré que le résultat était robuste. Les analyses de sous-groupes basées sur l'ajustement des covariables, la conception de l'étude, l'évaluation de la MP, le site de la tumeur et l'ethnicité ont également révélé une association significative. Sur la base des preuves actuelles, la MP est probablement un facteur de risque significatif du risque de cancer de la tête et du cou.

4. Méta-analyse sur les maladies parodontales et les pathologies rénale

Une revue de la littérature a inclus 17 études parmi 4 055 résumés sélectionnés. Les estimations regroupées ont indiqué que les probabilités d'insuffisance rénale chronique étaient 60% plus élevées chez les patients atteints de MP (OR = 1,60 ; IC 95% = 1,44-1,79 ; $p = 0,11$) par rapport à ceux qui n'en avaient pas (80). Une autre méta-analyse a montré une association entre la MP et l'insuffisance rénale chronique (81). La MP était associée à un risque accru de décès toutes causes confondues chez les personnes atteintes de néphropathie (82).

5. Méta-analyse sur les maladies parodontales et la grossesse

a. Association entre la maladie parodontale et les issues défavorables de la grossesse (83)

La recherche a abouti à 422 études qui ont été filtrées. Vingt-deux études ont été incluses dans la revue, soit 17 053 sujets au total. Le RR calculé pour la MP était de 1,61 pour les naissances avant terme évalué dans 16 études ($p < 0,001$), 1,65 pour le faible poids à la naissance évalué dans 10 études ($p < 0,001$) et 3,44 pour le faible poids à la naissance prématuré évalué dans 4 études. La présente revue systématique a signalé une association faible mais existante entre la MP et les issues défavorables de la grossesse. Cette hypothèse est le résultat de corrections appropriées des méthodologies biaisées et de l'hétérogénéité des études.

b. Association entre la maladie parodontale et la pré-éclampsie (84)

Quinze études ont été incluses, dont 3 études de cohorte et 12 études cas-témoins. Une association positive a été trouvée entre la pré-éclampsie et la MP (OR = 2,17 ; IC 95% = 1,38-3,41 ; $p = 0,0008$). Cependant, une hétérogénéité élevée et significative a été trouvée. Dans la plupart des cas, l'analyse des sous-groupes avait un faible pouvoir de détection de différences significatives entre les groupes pré-éclampsie et non pré-éclampsie. La MP semble être un facteur de risque possible pour la pré-éclampsie. Cependant, étant donné les différences importantes dans les définitions et les diagnostics de la MP et de la pré-éclampsie entre les études, ainsi que leur manque de bonne qualité méthodologique, des essais futurs sont nécessaires pour confirmer les résultats (84).

6. Méta-analyse sur les maladies parodontales et autres maladies systémiques

a. Association entre la maladie parodontale et la polyarthrite rhumatoïde (85)

Vingt et un articles remplissaient les critères d'éligibilité. Le risque de MP était significativement plus élevé chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde que chez les témoins non atteints (RR = 1,13 ; IC 95% = 1,04-1,23 ; $p = 0,006$) avec une profondeur de sondage moyenne, un risque de saignement au sondage et une valeur absolue de la perte d'attache clinique chez les personnes atteintes de polyarthrite rhumatoïde significativement plus élevés. Une association significative entre la polyarthrite rhumatoïde et la MP est corroborée par les résultats de la méta-analyse d'études comparant la polyarthrite rhumatoïde à des témoins sains.

b. Association entre la maladie parodontale et le syndrome métabolique (86)

Vingt-six études disposaient de suffisamment d'informations pour être incluses dans la méta-analyse, totalisant 52 504 patients. Le syndrome métabolique et la MP étaient associés à OR de 1,38 (IC à 95% = 1,26-1,51 ; $p < 0,001$). Une analyse de sous-groupe a montré que l'examen parodontal complet expliquait en partie la variabilité entre les études. Bien qu'une association entre le syndrome métabolique et la MP soit suggérée, des études prospectives devraient être menées pour établir des relations de cause à effet entre le syndrome métabolique et la MP.

c. Association entre la maladie parodontale et l'athérosclérose carotidienne (87)

Quinze études d'observation portant sur 17 330 participants ont été incluses. Les résultats globaux combinés ont montré que la MP était associée à l'athérosclérose carotidienne (OR = 1,27 ; IC 95% = 1,14-1,41 ; $p < 0,001$), mais l'hétérogénéité statistique était importante ($I^2 = 78,90\%$). Une analyse de sous-groupe du tabagisme ajusté et du diabète sucré a montré une signification limite (OR = 1,08 ; IC 95% = 1,00-1,18 ; $p = 0,05$). Les analyses de sensibilité et les analyses cumulatives ont toutes deux indiqué que les résultats étaient robustes. La présence d'une MP était associée à l'athérosclérose carotidienne. Cependant, d'autres études cliniques à grande échelle et bien menées sont nécessaires pour explorer le risque précis de développer une athérosclérose carotidienne chez les patients atteints de MP

d. Association entre la parodontite chronique et les maladies dues au virus de l'herpès (88)

Dix études éligibles ont été incluses pour étudier l'association entre le virus d'Epstein-Barr (EBV) et la parodontite chronique. Les résultats ont montré que l'EBV avait une association significative avec la parodontite chronique par rapport au groupe en bonne santé parodontale (OR = 5,74 ; IC 95% = 2,53-13,00 ; $p < 0,001$).

L'association entre le cytomégalovirus humain (HCMV) et la parodontite chronique a été analysée dans 10 études. Les résultats regroupés ont montré que le HCMV avait également une association significative avec la parodontite chronique (OR = 3,59 ; IC 95% = 1,41-9,16 ; $p = 0,007$). Aucun biais de publication significatif n'a été observé.

Deux études éligibles ont été incluses pour étudier l'association entre le virus de l'herpès simplex (HSV) et le risque de parodontite chronique. L'association entre le VHS et la parodontite chronique n'a pas été concluante (OR = 2,81 ; IC 95% = 0,95-8,27, $p = 0,06$).

Une seule étude incluse a examiné l'association entre le virus de l'herpès humain 7 (HHV-7) et le risque de parodontite chronique (OR = 1,00 ; IC 95% = 0,21-4,86).

Pour conclure, deux membres de la famille du virus de l'herpès, EBV et HCMV, sont significativement associés à une parodontite chronique. Les preuves sont insuffisantes pour soutenir les associations entre le HSV, le HHV-7 et la parodontite chronique.

e. Association entre la maladie parodontale et la dépression (89)

La méta-analyse de 7 études transversales n'a montré aucune association significative entre la dépression et la MP (OR = 1,03 ; IC 95% = 0,75-1,41). Les résultats de la présente revue systématique ont montré une grande hétérogénéité parmi les études et la mesure de l'effet de synthèse de la méta-analyse ne permet pas d'affirmer une association entre la dépression et la parodontite.

f. Association entre la maladie parodontale et la maladie d'Alzheimer (90)

Sur un total de 550 titres et résumés, 5 études ont été incluses (2 études transversales, 2 études cas-témoins et une étude de cohorte). Une méta-analyse à effets fixes a montré que la présence de la MP était associée à la présence de la maladie d'Alzheimer (OR = 1,69 ; IC à 95% = 1,21-2,35). Lorsque seules les formes graves de la MP ont été évaluées, une association significative a également été observée (OR = 2,98 ; IC 95% = 1,58-5,62). Des études complémentaires devraient être menées afin de déterminer la direction de l'association et les facteurs susceptibles de la confondre.

g. Association entre la maladie parodontale et le surpoids / obésité chez les enfants et les adolescents (91)

Un total de 769 titres et résumés a été examiné, 7 ont été sélectionnés pour des méta-analyses. Une association positive entre le surpoids / obésité et la MP a été observée. Pour l'association entre la prévalence de la MP et l'obésité chez les enfants, l'OR à effets fixes globaux était de 1,46 [1,20-1,77]. Les preuves disponibles suggèrent une association significativement positive entre la MP et l'obésité chez les enfants et adolescents. Les dentistes doivent être conscients que les MP constituent un risque potentiel associé à l'obésité.

PARTIE 2 - SANTE ORALE DES ADOLESCENTS

Le programme de « Développement des indicateurs européens de la santé orale » (EGOHID), a dressé une liste de 40 indicateurs essentiels en santé bucco-dentaire (92). Douze d'entre eux, décrits ci-après, concernent exclusivement les adolescents.

I. INDICATEURS EUROPEENS DE LA SANTE ORALE

1. Brossage biquotidien avec un dentifrice fluoré

Un des facteurs de l'étiologie des caries dentaires est la qualité de l'hygiène orale. La fréquence de brossage des dents auto-déclarée peut être utilisée comme mesure indirecte des indices cliniques d'hygiène orale. Cependant les sujets auraient tendance à surévaluer leurs réponses face à ce type de comportement socialement acceptable (93). Mesure approximative de l'hygiène orale, cet indice trouve sa justification auprès des adolescents et peut être indirectement un indicateur de sévérité de la carie (94). Les facteurs socio-économiques et la structure familiale sont significativement associés à une probabilité plus élevée de se brosser les dents au moins deux fois par jour (95).

a. Brossage dentaire : Techniques et recommandations

L'hygiène orale est indissociable de la technique de brossage. Les techniques de brossage des dents actuellement recommandées datent principalement du début du XX^{ème} siècle. De nombreuses techniques de brossages sont décrites dans la littérature (96). Citons par exemple : Scrub (97), Bass (98), Bass modifié (99), Charters (100), Stillman (101) et Fones (102). Deux méthodes de brossage manuel sont principalement recommandées par les associations dentaires chez les adolescents et adultes : la méthode de Bass et la méthode de Stillman (Association Dentaire Australienne, Canadienne, Anglaise, Américaine) (103). La méthode la plus couramment recommandée d'après la revue de la littérature est la technique de la Bass modifiée (104–108). Il ne semble pas exister de consensus parmi les organisations professionnelles sur la meilleure méthode de brossage pour la population en général ou pour les personnes d'âges différents ou souffrant de problèmes dentaires particuliers (96). En fait, la méthode de brossage idéale serait celle qui permet la désorganisation du biofilm, sans provoquer de traumatisme tout en tenant compte de

l'acceptabilité du sujet. Se pose alors la question de la technique appropriée, de son mode d'apprentissage et du modèle de brosse à dents recommandé.

b. Effet de la fréquence de brossage sur l'incidence de la carie

L'effet de la fréquence du brossage des dents sur la prévention de la carie des adolescents n'est pas évident : les preuves sont contradictoires. En 1986, s'appuyant sur les conclusions de plusieurs ateliers sur l'hygiène bucco-dentaire, Addy a déclaré qu'en dehors de la libération d'ions fluorure par le dentifrice, la fréquence de brossage en elle-même n'avait aucun avantage supplémentaire dans la prévention de la carie dentaire (109).

Les individus qui déclarent ne pas se brosser les dents fréquemment risquent davantage de développer ou d'augmenter les nouvelles lésions carieuses que ceux dont la fréquence de brossage est plus élevée (110). Des études ont mis en évidence une association entre les niveaux cumulés de carie et la fréquence déclarée du brossage des dents. Le brossage deux fois par jour augmente l'efficacité du dentifrice fluoré dans la réduction progressive de la carie (111). Dans une étude de Lynch, le risque d'augmentation des lésions carieuses chez les patients ayant un brossage plus de 2 fois par jour ne différait pas de manière significative de ceux ayant un brossage 2 fois ou moins de 2 fois par jour (93).

Deux études ont montré que le brossage fréquent et la présence de fluor dans le dentifrice étaient associés à une diminution de l'incidence des lésions carieuses (112,113). Il est reconnu dans la littérature que le brossage des dents seul ne permet pas un contrôle optimal du biofilm et que le fluor dans le dentifrice est d'une importance majeure dans la prévention des caries (114,115). Dans une revue de la littérature de Kumar, plus la fréquence de brossage était faible, plus l'incidence carieuse était élevée (116).

En ce qui concerne l'impact de la supervision du brossage sur l'incidence de la carie, il n'existe aucune preuve concluante (117,118).

c. Brosse à dents électrique ou manuelle

L'hygiène orale et en particulier le brossage des dents sont des éléments fondamentaux de la prévention pour les lésions carieuses et les MP. De nos jours, la plupart des questions portent sur la fréquence et la durée du brossage, l'efficacité et la sécurité des brosses électriques et les recommandations spécifiques nécessaires pour les adolescents et les patients en cours de traitement orthodontique. La brosse à dents électrique a été conçue pour les patients ayant une motricité limitée, ainsi que les patients en cours de traitement orthodontique, qui ont des difficultés à garder

leurs dents propres et en bonne santé (119,120). Depuis les années 1980, les modèles de brosses à dents électriques se sont développés pour devenir une alternative établie au brossage manuel (121,122).

Une revue de la littérature de 2018, a examiné 51 études impliquant 4624 participants. Elle conclut que les brosses à dents électriques sont plus sûres et plus efficaces à court et à long terme que les brosses à dents manuelles en ce qui concerne l'élimination de la plaque dentaire et la réduction de la gingivite. Les preuves sont de qualités modérées mais significatives. Pour les adolescents en cours de traitement orthodontique, la probabilité d'améliorer l'observance et la commodité d'une bonne hygiène orale peut se faire grâce à l'utilisation d'une brosse à dents électrique (123–125). Par contre, peu d'études dépassent la durée de plus de six mois. Peu d'études montrent une différence significative entre les usages manuels et électriques (126,127). Il faut prendre en compte que le brossage électrique permet d'éliminer de manière optimale la plaque dentaire et d'améliorer la santé gingivale d'un individu, indépendamment de la dextérité manuelle ou de la formation à la technique de brossage (128,129).

d. Déterminants socioéconomiques et comportementaux de la fréquence de brossage

Malgré l'amélioration constante de la santé bucco-dentaire dans les pays développés, certaines populations présentent toujours un risque élevé de développer des pathologies bucco-dentaires avec des répercussions importantes sur la qualité de vie (57). Les comportements de santé bucco-dentaire sont associés à des habitudes quotidiennes plus complexes, sous la forte influence de facteurs psychosociaux, économiques et environnementaux (130). Les habitudes de brossage des dents reflètent un large contexte du mode de vie des adolescents. Le rôle des parents en matière d'éducation est essentiel et divers facteurs parentaux peuvent influencer sur les comportements liés à la santé, tels que les facteurs socioéconomiques (131).

L'enquête internationale « Health Behaviour in School-Aged Children » (HBSC, 2010) souligne une surreprésentation des filles par rapport aux garçons face au brossage des dents deux fois par jour. Les filles ont adopté un brossage adéquat de leurs dents plus tôt que les garçons. Confirmé par des études antérieures menées dans d'autres pays, ce comportement peut être lié à une maturité et un intérêt plus important et plus précoce pour l'hygiène, la santé et l'apparence chez les filles par rapport aux garçons (131,132). Une association positive est retrouvée entre l'hygiène et l'estime de soi ou d'autres facteurs émotionnels; l'estime de soi peut prédire le comportement du brossage des dents (133).

Une étude réalisée en Ecosse en 2009 a mis en avant la promotion de la santé orale à l'école, ce qui a donné de bons résultats en matière d'amélioration de l'hygiène bucco-dentaire, en particulier chez les jeunes garçons des zones les plus défavorisées (132,134).

La prévalence des comportements à risque en termes de fréquence de brossage est associée négativement à des facteurs sociodémographiques et familiaux (135). Une étude de 2016 en Ecosse met en avant un rapport entre la fréquence de brossage et le lieu d'habitation, le niveau socio-économique des parents, la structure familiale ou encore le type d'école. Les filles à 15 ans brossent plus leurs dents que les garçons (83% vs 65%). Les adolescents de 15 ans vivant avec les deux parents sont plus susceptibles de se brosser les dents deux fois par jour, par rapport aux adolescents vivant chez un seul parent, ou dans une famille recomposée. La fréquence de brossage est plus élevée dans les zones urbaines que rurales (136).

Virtanen et *al.* mettent en avant un lien entre l'activité physique et l'hygiène orale (137). Les habitudes d'hygiène orale des adolescents physiquement actifs étaient meilleures que celles des adolescents inactifs. L'obésité et les prises de déjeuner irrégulier chez les adolescents, quel que soit leur sexe, ont été les principaux prédicteurs d'un mauvais comportement en matière de santé bucco-dentaire. Ainsi, les adolescents physiquement actifs sont plus susceptibles de se brosser les dents deux fois par jour (137). Des études antérieures ont montré que, chez les adolescents, l'activité physique, la santé psychosociale et les habitudes de santé semblent présenter un lien positif entre elles. L'activité physique est associée à des effets positifs sur la santé en général et à la sensation de bien-être (138,139).

Le statut socioéconomique est considéré comme un bon indicateur de la santé et des comportements liés à la santé des adolescents. L'environnement familial est fortement associé à la fréquence de brossage des dents (140,141). Le niveau d'éducation élevé des parents prédisait de bonnes habitudes de santé bucco-dentaire de leurs enfants (142). Inversement, le faible niveau d'éducation des adolescents a été positivement associé à l'inactivité physique, au brossage occasionnel des dents et à une prévalence plus élevée du tabac et de l'alcool (143–145). Une cohorte d'adolescents a été suivie depuis leur naissance jusqu'à l'âge de 17 ans aux États Unis (146). Comme dans presque toutes les études, un statut socioéconomique inférieur, sous la forme du niveau d'éducation faible de la mère et d'une catégorie de revenu inférieure est associé à davantage de pathologies (147–149). Le statut socio-économique précoce influe sur les croyances et les comportements en matière de santé bucco-dentaire plus tard dans la vie, ce qui affecte les résultats de la carie (150).

Pour maintenir une bonne santé bucco-dentaire, il est recommandé de se brosser les dents deux fois par jour (111,151–159). Des enquêtes HBSC ont permis d'interroger des enfants et adolescents de 11, 13 et 15 ans sur leurs habitudes d'hygiène orale (160). Les principaux résultats mettent en avant une fréquence de brossage qui a augmenté dans la plupart des pays industrialisés étudiés (Figure 5). Dans tous les pays et régions étudiés entre 1994 et 2010, les filles avaient une prévalence de fréquence de brossage plus élevée que les garçons. L'adoption des bonnes habitudes de brossage recommandées augmentaient avec l'âge des filles mais pas avec celui des garçons (160).

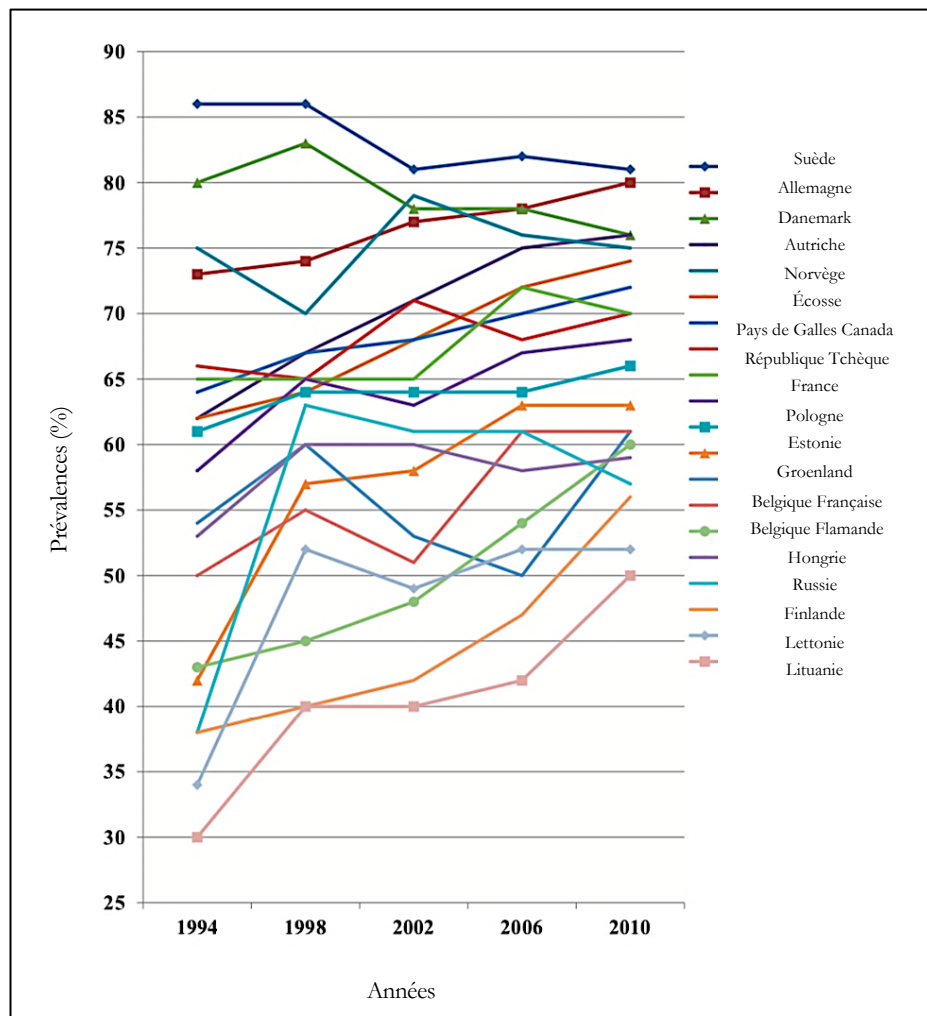


Figure 5. Évolution de la prévalence (%) déclarée du brossage des dents plus d'une fois par jour chez les écoliers de 11 à 15 ans (160).

Enquêtes « *Health Behaviour in School-Aged Children* » dans 20 pays et régions différents, de 1994 à 2010.

Une enquête sur la santé bucco-dentaire des adolescents espagnols âgés de 12 à 15 ans a mis en évidence que, quand la fréquence de brossage était supérieure à une fois par jour, les lésions carieuses étaient moins importantes (161). L'habitude de se brosser les dents une ou plusieurs fois par jour était d'environ 90% chez les adolescents (161).

2. Prévalence des scellements de sillons

Les scellements des sillons sont utilisés depuis près de 5 décennies pour prévenir et contrôler les lésions carieuses au niveau des dents permanentes (162). Chez les adolescents, les surfaces occlusales sont les sites les plus susceptibles de présenter une lésion carieuse au début de l'éruption dentaire (163,164). L'application de scellement de sillons est une approche conservatrice préventive impliquant l'introduction d'un matériau dans les puits et les fissures des dents sujettes à la carie ; ce matériau adhère ensuite à la dent de façon micromécanique, offrant une barrière physique qui empêche les bactéries de se nourrir de leur source de nutriments (165).

Le rôle du scellement de sillons dans la prévention de la carie est bien établi dans la littérature (166–172). Il existe également une preuve de qualité moyenne que les scellements de sillons réduisent l'incidence de la carie de 76% (171).

Une récente mise à jour d'une revue Cochrane a évalué l'effet préventif des scellements de sillons sur la carie chez les enfants et les adolescents, par rapport à un groupe témoin sans scellement de sillons (173). Le risque de carie sur les premières molaires permanentes scellées était diminué de 86 % à 1 an, de 76 % à 2 ans, de 70 % à 3 ans et de 57 % à 4 ans. Cette efficacité restait significative à 54 mois (173). Ceci est en accord avec les résultats de la revue publiée précédemment (173).

Selon les données du « National Center for Health Statistics » (NCHS), près de la moitié des enfants américains âgés de 9 à 11 ans avaient au moins un scellement de sillon sur une dent permanente : 43.5% pour les 12-15 ans et 42.7% pour les 16-19 ans (15).

Les données du « National Health and Nutrition Examination Survey » (NHANES) en 2011-2012 comparées à celles d'une précédente enquête de 1999-2004, montrent une augmentation de l'utilisation de produits d'étanchéité pour les dents permanentes. Environ 31% des enfants âgés de 6 à 8 ans, 49% des enfants âgés de 9 à 11 ans et 43% des adolescents âgés de 12 à 19 ans ont au moins une dent permanente scellée (174,175).

La prévalence des produits de scellement chez les adolescents était d'environ 58,8% au Portugal et de 8% en Grèce (176,177).

3. Prise en charge des besoins en orthodontie

La malocclusion a été identifiée comme un problème de santé bucco-dentaire chez les adolescents (178). Dans une étude menée au Brésil, la prévalence de la malocclusion chez les adolescents de 15 à 18 ans était de 30,4% et les chances d'une malocclusion étaient plus élevées chez les adolescents socialement défavorisés (179). Kaur et *al.* rapportent une forte prévalence de

malocclusion parmi les adolescents de 13 à 17 ans en Inde (87.79 %)(180). Dans le même pays, en 2011, 32.8% des adolescents de 10 à 15 ans avaient besoin d'un traitement orthodontique (180). La prévalence totale des types de malocclusion des classes I, II et III chez les adolescents Iraniens âgés de 11 à 14 ans était de 77,1% (181). Un besoin objectif de traitement a été enregistré chez 27,3% des enfants scolarisés en Italie (182). 11.9% des enfants et adolescents de 5 à 17 ans ne présentaient pas de malocclusion en Colombie (183). La prévalence de malocclusion chez les écoliers de 10 à 15 ans est 84,6% en Lituanie (184). En France, 23% des 12–15 ans avaient un traitement en cours en 2002-2203 (185). En 2017, 38% d'adolescents Français portaient un appareil dentaire (40 % pour les filles et 36 % pour les garçons), contre 28 % en 2009 (18).

Des études de cohorte ont indiqué que la malocclusion en denture primaire est le facteur déterminant de la malocclusion en denture permanente (186–188). La prévalence internationale de la malocclusion de la denture primaire est supérieure à 50% (189–193). La malocclusion est généralement considérée comme une affection multifactorielle liée à des facteurs de développement (tels que l'obstruction nasale empêchant la respiration nasale), à des habitudes (telles que sucer le pouce), à la génétique, à des facteurs héréditaires et à l'origine ethnique (194–196). La prévalence de la malocclusion chez les adolescents des zones urbaines était nettement inférieure à celle des adolescents habitant en zones rurales (197). Les malocclusions et les modifications esthétiques dentofaciales ne compromettent souvent pas la fonction orale, mais peuvent influencer sur la formation de l'image corporelle, le développement émotionnel, l'estime de soi et l'intégration sociale d'une personne dans le monde (198–200). La carie dentaire est une complication fréquente de la malocclusion (201,202). En présence d'une malocclusion, il est difficile pour les patients de maintenir une bonne hygiène orale, ce qui augmente l'accumulation de plaque sur les surfaces dentaires (203).

Il existe aujourd'hui une disparité dans l'accès aux soins orthodontiques que ce soit au sein d'un pays ou mondialement. Dans les pays avec des services d'orthodontie publics, la couverture de soins orthodontiques des adolescents varierait entre 30 et 40%. Les informations en termes d'accessibilité et d'égalité de soins chez les enfants et les adolescents font encore globalement défaut en Europe. Cette disparité est la même aux États-Unis, en France, en Angleterre (185,204–206).

4. Carie de la première molaire permanente

La première molaire permanente est plus vulnérable à la carie en raison de ses caractéristiques morphologiques et fonctionnelles, ainsi que des conditions environnantes auxquelles les molaires permanentes récemment mises en éruption doivent faire face (207,208). La susceptibilité à la carie de la première molaire permanente peut être liée à une éruption précoce, à

l'âge, à ses caractéristiques anatomiques et à son emplacement postérieur dans la bouche (209). Il existe des rapports sur une relation entre la carie de la deuxième molaire temporaire et de la première molaire permanente (210).

L'étude de McDonald montre une fréquence élevée de lésions occlusales sur la première molaire permanente pour tous les groupes d'âge, dont les adolescents (211,212). Des résultats similaires sont retrouvés dans un grand nombre d'études (213,214). En cause, l'anatomie des fossettes et des sillons occlusaux des molaires (215). En effet, toutes les dépressions de la surface occlusale peuvent être considérées comme des sites de prédilection pour le biofilm. La distribution générale des lésions occlusales semble être concentrée dans les premières et deuxième molaires permanentes, et ce quel que soit les groupes d'âge (216–218). Il est possible qu'une forte prévalence de la carie au niveau des premières molaires permanentes puisse influencer sur l'apparition du processus carieux au niveau d'autres dents permanentes. La carie de la première molaire permanente est associée de manière significative à un risque accru de carie de la deuxième molaire, des prémolaires et des incisives (219–222).

87% des premières molaires permanentes étaient atteintes de carie chez les enfants brésiliens de 7 et 8 ans (223). Les premières molaires permanentes étaient les plus fréquemment atteintes de carie chez les enfants indiens (221). Des tendances similaires ont été observées chez les enfants sri-lankais (219). À Taiwan, 48% des enfants étaient exempts de carie dans les premières molaires permanentes (224). Macek et *al.* ont également signalé une plus grande susceptibilité à la carie chez les molaires permanentes que les autres dents permanentes (220). 10% des premières molaires permanentes et 45% des secondes molaires permanentes ont eu une carie dans l'année suivant leur éruption. 92% des premières molaires permanentes et 68% des secondes molaires permanentes étaient soit cariées ou soignées ou manquantes à cause de la carie à l'âge de 15 ans (225). Parmi les adolescents américains âgés de 12 à 19 ans, 58% avaient eu une carie dentaire au niveau des dents permanentes en 2011-2012 (15).

5. Fluorose dentaire

La fluorose dentaire résulte de la prise excessive de fluor au cours des premières années de la vie c'est-à-dire au moment de la formation des dents permanentes. L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) se base depuis 2008 sur les recommandations de l'OMS : la consommation de fluor ne doit pas dépasser 0,05mg/kg/jour, tout apport confondu, avec un plafond maximum de 1mg/jour. Un enfant présentant un risque carieux individuel (RCI) élevé nécessite parfois, en plus des conseils d'hygiène bucco-dentaire, une supplémentation en fluor. Dans ce cas, un bilan fluoré doit être systématiquement réalisé afin de

déterminer à quelles sources de fluor l'enfant est exposé quotidiennement, pour limiter sa consommation de fluorures systémiques à une seule source (152).

En France, les dernières données nationales datent de 1998. Elles ont mis en évidence un taux de 2,7% de fluoroses légères et de 8,8% de scores douteux selon la classification de Dean (226). Les fluoroses légères sont sans effet sur l'état général mais se traduisent par des tâches inesthétiques blanches ou brunes sur les dents (227).

Aux États-Unis, en 2002, la prévalence était de 9% chez les enfants et adolescents (175). Elle a augmenté de 31,6% chez les adolescents de 16 et 17 ans, en comparant les taux de 2011-2012 à ceux de 2001-2002 (228). À signaler que l'eau de distribution est naturellement fluorée sur 50% du territoire et artificiellement fluorée dans certaines régions des États-Unis (229).

Le statut socio-économique élevé des parents est associé de manière significative à la fluorose (230–232). La raison pour laquelle il y a souvent plus d'adolescents dans les classes socio-économiques inférieures qui ne présentent pas de fluorose s'explique par l'accessibilité aux produits d'hygiène (brosse à dent et dentifrice fluoré). Dans son étude, Angulo associe la classe socio-économique et le niveau d'éducation des parents avec les possibilités d'accès aux produits fluorés. À ce titre, les adolescents de classes socio-économiques inférieures sont moins susceptibles de se brosser les dents avec un dentifrice fluoré, donc moins susceptibles d'être atteints de fluorose (233,234).

6. Consommation quotidienne de nourritures et de boissons

Une alimentation saine à l'adolescence est importante, car les changements corporels subis pendant cette période ont une incidence sur les besoins nutritionnels et alimentaires de la personne à l'âge adulte. Les adolescents deviennent de plus en plus indépendants et prennent de nombreuses décisions alimentaires par eux-mêmes. La commodité des repas est importante pour beaucoup d'adolescents et il se peut qu'ils mangent en trop grande partie les mauvais types d'aliments, comme les boissons gazeuses, les fast-foods ou les aliments transformés (235). Les grignotages, une alimentation inadaptée, la consommation de boissons sucrées, sodas ou alcoolisées ont un impact sur la santé en général et sur la santé orale des adolescents (236) Les déterminants « clés » du régime alimentaire sain comprennent la prise d'un petit-déjeuner, la consommation régulière de légumes et de fruits ; d'éviter les boissons gazeuses sucrées, les sucreries et les fast-foods (237).

On retrouve 59% de grignotages chez les 15-19 ans (238). Cinq études ont rapporté des données continues sur le grignotage avec un nombre moyen de collations consommées par jour de $2,5 \pm 1,9$ chez les adolescents (239–243).

La prévalence de la consommation de boissons sans alcool chez les jeunes de 6 à 17 ans a augmenté de 48%, passant de 37% en 1977-1978 à 56% en 1994-1998 (États Unis)(244). Cette consommation a augmenté de 68,9%, entre 1999 et 2012 en Afrique du Sud (245). Une prévalence de 41,7% était retrouvée chez les adolescent Belges, 21,1% chez les Italiens (246). Les résultats étaient plus élevés chez les garçons que chez les filles dans les deux pays (247). Des résultats similaires sont retrouvés dans d'autres pays (248–250). En Afrique du sud, les groupes d'âges plus jeunes et vivant en zone urbaine avaient des probabilités de consommation quotidienne de boissons gazeuses supérieures. On retrouve ce résultats dans d'autres études (251–253).

Dans l'étude de Pearson et *al.* (2009), 6% des adolescents ont atteint les recommandations en matière d'activité physique, de consommation quotidienne de fruits et de légumes et de prise d'un petit-déjeuner (254). Silva et *al.* (2016) ont constaté que la prévalence de la consommation inadéquate de fruits et légumes était élevée (88,6%) et que seulement 11,4% des adolescents respectaient les recommandations. Ces résultats sont similaires à ceux trouvés dans l'étude réalisée au Brésil chez les adolescents de 15 à 19 ans (8,8%)(255). Les adolescents dont les parents étaient peu éduqués avaient un régime alimentaire de qualité inférieure et passaient plus de temps dans des activités sédentaires (256).

D'après les chiffres d'une étude de la Direction de la recherche, des études, de l'évaluation et des statistiques (DREES), 18,4% des adolescents Français de 14-15 ans sont en surcharge pondérale et parmi eux, 5,2% sont obèses (18). Le manque d'activité physique, les prises de repas irrégulières et les grignotages sont des facteurs de risque individuel dont l'association favorise la prise de poids chez l'adolescent (257).

7. Consommation de tabac

L'usage du tabac a des conséquences importantes sur la santé orale, dentaire et systémique (258–260). Le tabagisme et le tabagisme sans fumée sont initiés et établis principalement pendant l'adolescence (261). L'âge moyen du début de la consommation se situe entre 13 et 15 ans (262,263).

L'étude HBSC menée dans 42 pays dans le monde, montre une prévalence du tabagisme hebdomadaire chez les adolescents de 15 ans : de 21% en Italie, 19% en France, 14% en Allemagne, 9% en Espagne, 7% en Angleterre, et 4% en Norvège (263).

Au Canada (2003), la prévalence du tabagisme en Ontario était de 36,2% chez le 14-18ans (264).

En France, en 2017, chez les jeunes de 17 ans, l'usage quotidien du tabac variait de 18,9% à 31% selon les régions (265). Dans l'Enquête sur la « Santé et les Consommations lors de l'Appel de Préparation à la Défense » (ESCAPAD, 2018), 23,4% des adolescents de 17 ans se déclaraient

fumeurs quotidiens, les filles un peu moins souvent que les garçons. À l'inverse, 44,4% des adolescents n'ont jamais expérimenté la cigarette (266). Le tabagisme se développe au lycée avec 53,0% des lycéens qui déclarent avoir expérimenté le tabac (avec une hausse prononcée des usages de la cigarette électronique)(267).

Les trois quarts des adolescents qui fument quotidiennement seront des fumeurs à l'âge adulte et la dépendance à la nicotine apparaît d'autant plus sévère et durable que la consommation de tabac a débuté précocement (268).

8. Visite dentaire dans les 12 derniers mois et raison de la dernière visite

En 2016, 61% des enfants et adolescents âgés de 6 à 18 ans résidant en Pays de la Loire ont eu au moins une visite dentaire au cours de l'année. Les recommandations de la Haute Autorité de Santé (HAS) ne sont pas respectés car 25% des adolescents n'ont pas eu de suivi bucco-dentaire entre 14 et 17 ans, c'est-à-dire ni consultation/visite, ni détartrage (269). En 2017, en France, 77% des adolescents de 17 ans ont consulté un dentiste ou un orthodontiste au cours des douze derniers mois. Cela concerne 86 % des adolescents de cadres contre 64 % des adolescents d'ouvriers (18).

Une enquête réalisée auprès d'adolescents australiens âgés de 12 à 17 ans révèle que 81,8% ont consulté le dentiste au cours de la dernière année et majoritairement pour réaliser un contrôle (270). Par ailleurs, la douleur était une raison prédominante de visite chez le dentiste en Arabie Saoudite, Pologne et au Nigéria (271–273).

Aux États-Unis, les conditions socioéconomiques, les coûts et un certain nombre de facteurs individuels ont été identifiés comme des obstacles potentiels à l'accès aux soins dentaires (274). Des études ont démontré que le fait de retarder les visites de contrôle augmentait le risque de pathologies bucco-dentaires (275). Chez les adolescents, les visites chez le chirurgien-dentiste sont souvent liées aux conditions socio-économiques. Le faible niveau d'éducation des parents est associé à une réduction des visites chez le dentiste et à une utilisation moindre des services de prévention (276).

Comprendre les raisons pour lesquelles les adolescents ne se rendent pas chez le dentiste est essentiel pour la planification stratégique et les efforts visant à promouvoir une bonne santé bucco-dentaire et la poursuite des soins dentaires réguliers jusqu'à l'âge adulte (277,278).

9. Prévalence des lésions non traitées et l'évaluation de la sévérité des lésions

D'après l'étude sur la charge mondiale de morbidité 2016, la moitié de la population mondiale (3,58 milliards de personnes) présentait des affections bucco-dentaires qui étaient

essentiellement des caries des dents permanentes (279). Plus de 2 milliards de personnes ont des lésions sur les dents permanentes et 486 millions d'enfants ont des lésions sur les dents temporaires (279). La prévalence des lésions non traitées, quel que soit l'âge, est fortement influencée par les déterminants sociaux (280,281). Aux États-Unis, la prévalence de la carie dentaire non traitée sur les dents permanentes est de 14,5% chez les adolescents de 12 à 15 ans et de 22,6% chez ceux âgés de 16 à 19 ans (282). En France, la proportion d'enfants de 12 ans totalement indemnes de carie, était de 12% en 1987, de 40% en 1998 et de 56% en 2017 (283). En 2017, la proportion d'adolescents qui n'ont aucune dent cariée concerne 59 % des adolescents d'ouvriers contre 77 % des adolescents de cadres (18).

L'indice de sévérité des lésions carieuses, nombre moyen de dents Cariées, Absentes et Obturées (CAO), est un indice carieux mesurant le nombre de dents cariées, absentes pour carie et obturées en denture permanente (284–287). Au niveau mondial, 60% à 90% des écoliers ont des lésions carieuses, avec une prédominance en Asie pays et Amérique latine (Figure 6)(288–290).

En France, l'indice CAO est passé de 4,2 en 1987 à 1,2 en 2006 chez les enfants âgés de 12 ans (283). Dans l'État de São Paulo, l'indice CAO en 2002 était de 6,4 (291). En 2004, au Brésil, parmi 889 adolescents de 15 à 19 ans, l'indice CAO était de 4,6 et la prévalence carieuse de 73% (292). En Norvège, la proportion moyenne d'adolescents de 18 ans indemnes de carie est passée de 2% à 15% entre 1985 et 2000, tandis que le CAO a diminué de 49% (293). En Lituanie, il y a eu une baisse du score CAO de 6,4 à 5,5 chez les adolescents âgés de 15 ans de 1983 à 2005 (294). Cette amélioration n'est pas systématique dans tous les pays, comme au Salvador (295) ou au Brésil (296). En Australie, le CAO est resté stable entre 2000 (1,1) et 2010 (1,2) chez les adolescents de 14 ans (297).

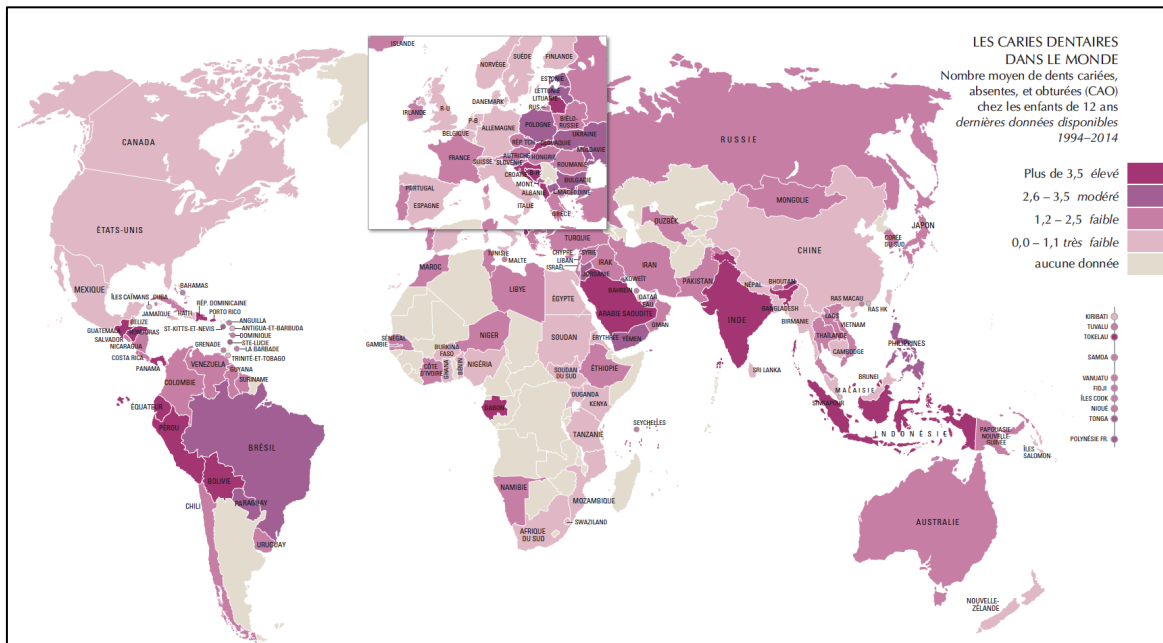


Figure 6. Caries dentaires dans le monde (51).

Nombre moyen de dents cariées, absentes, et obturées (CAO) chez les enfants de 12 ans. Dernières données disponibles 1994–2014.

L'ICDAS est un indice épidémiologique d'évaluation de la carie plus récent que le CAO (298–302). Un premier code allant de 0 à 6 évalue la sévérité de la lésion carieuse et un deuxième code allant de 0 à 8 identifie les restaurations ou scellements présents en bouche (Tableau1)(19). Cet indice permet de différencier les lésions de différents stades, dont les lésions débutantes (298,303).

SEVERITE DE LA CARIE	RESTAURATION
<ul style="list-style-type: none"> 0. Surface dentaire saine 1. Premier changement visuel de l'émail après séchage 2. Changement visuel distinct de l'émail sans séchage 3. Cavité dans émail 4. Ombre dentinaire 5. Cavité distincte avec dentine visible 6. Cavité distincte, étendue, avec dentine visible 	<ul style="list-style-type: none"> 0. Pas de scellement ou de restauration 1. Scellement partiel 2. Scellement entier 3. Obturation esthétique 4. Restauration amalgame 5. Couronne nickel-chrome 6. Céramique, or 7. Restauration fracturée ou cassée 8. Restauration temporaire 9. La dent n'existe pas ou autres cas spéciaux

Tableau 1. Méthode du double codage du Système International de Détection et d'Évaluation des lésions Carieuses (304).

Dans une étude menée en Colombie, la prévalence la plus élevée relativement aux différents stades de la carie a été retrouvée dans les lésions non cavitaires (299). Ces résultats se retrouvent dans d'autres études chez les adolescents, comme en Islande (300), en Espagne (305), en Allemagne (306) ou encore au Brésil (298). En Espagne, la prévalence de la carie (code ICDAS de 4 à 6) était de 37,7% à 12 ans et de 43,6% à 15 ans en denture permanente. Le nombre de lésions carieuses initiales, correspondant aux codes ICDAS de 1 à 3, était de 3,7 à 15 ans, et de 5,9 à 15 ans (305). En Islande, 15,8% des adolescents de 15 ans étaient indemnes de carie. Les scores ICDAS de 3 à 6 étaient de 2,78 (300).

10. Évaluation de la santé parodontale

Les dommages irréversibles des tissus de la MP commencent à la fin de l'adolescence et au début de l'âge adulte (307).

La gingivite, induite par l'accumulation de plaque dentaire, est une affection fréquente chez les adolescents (308,309). Elle affecte 72% des adolescents de 15 à 17 ans en Inde (310) et 77,6% des adolescents de 12 ans au Brésil (311). Ces résultats sont similaires à ceux d'autres pays et d'autres régions du monde (312–320). Le saignement sondage ou déclaré sont également des données épidémiologiques importantes de mesure de la santé parodontale.

Das *et al.* ont signalé une prévalence de 3% de parodontite parmi les adolescents âgés de 15 à 17 ans (310). Aux États-Unis, 2,7% d'adolescents âgés de 16 à 17 ans avaient une parodontite chronique (321).

11. Érosion dentaire

Bien que cet indicateur ne figure pas dans la liste des 12 indicateurs conçus pour la surveillance de la santé des adolescents, différentes études portant sur la prévalence ou l'étiologie de l'érosion dentaire ont reconnu que la population adolescente constituait une population à risque en raison des comportements alimentaires durant cette période (322–324). C'est une affection complexe et multifactorielle caractérisée par une perte progressive et irréversible de la structure de la dent due à un processus chimique sans implication bactérienne (325,326). L'étiologie de l'érosion dentaire est multifactorielle et principalement liée aux changements du mode de vie contemporain (habitudes alimentaires, ingestion de boissons, profession à risque, drogues, mesures d'hygiène orale et troubles de l'alimentation); des facteurs biologiques (santé générale, dents, biofilm, pellicule acquise et salive) et chimiques (capacité tampon de la salive, pH, type d'acide, présence de calcium,

de fluorure et de phosphore), capables d'interférer dans la fréquence et la sévérité des usures érosives (327,328).

La prévalence des lésions érosives est liée au type et à la durée d'exposition à un agent érosif, à la minéralisation des tissus dentaires et à la composition salivaire. Une étude menée auprès de personnes jeunes et physiquement actives, a révélé une prévalence plus élevée d'usure érosive chez les individus pratiquant des activités physiques, en raison de la consommation élevée de fruits citriques, de boissons sportives et de modifications du flux salivaire associées à d'autres facteurs (329).

Une récente revue systématique a estimé une prévalence mondiale globale de l'érosion dentaire de 30% (IC 95% : 24%–37%) en mélangeant différents indices cliniques et en ne spécifiant pas les dents examinées (330). De grandes différences ont été observées entre les pays, les zones géographiques et les groupes d'âge. La plupart des données sur la prévalence sont disponibles dans les études européennes et il est estimé que 29% des adultes sont affectés par l'érosion dentaire. Outre les différences géographiques, il existe de grandes différences par groupe d'âge et la prévalence la plus élevée (11 à 100%) a été observée chez les enfants et adolescents de 9 à 17 ans. La littérature a mis en avant la période de l'adolescence comme étant à risque en raison des comportements alimentaires instables. En France, une étude a mis en avant une prévalence de 39% chez des adolescents de 14 ans avec un score sévère de la gravité de l'érosion dentaire (331). Un mode de vie avec un régime alimentaire contenant plus de fruits et de légumes, des boissons sportives, mais surtout une consommation accrue de jus de fruits et de boissons non alcoolisées sont les principales causes exogènes d'érosion dentaire chez les adolescents d'aujourd'hui (332,333).

II. CLASSIFICATIONS DU RISQUE CARIEUX DES ADOLESCENTS

Depuis des années, un certain nombre de méthodes de classification du risque carieux (RC) ont été proposées pour une utilisation en pratique clinique (334). Les modèles d'évaluation du risque carieux associent actuellement une combinaison de facteurs de risque et de facteurs de protection qui interagissent avec une variété de facteurs sociaux, culturels et comportementaux (335). L'évaluation du RC est la détermination de la probabilité d'augmentation de l'incidence de la carie (157). Du fait de la possibilité de détecter la carie à ses stades les plus précoces, c'est-à-dire à des stades non cavitaires ou « white spot », les chirurgiens-dentistes peuvent anticiper les lésions cavitaires. Le changement de paradigme dans notre compréhension de la carie dentaire, ainsi que de sa prévention et son traitement, oblige tous les dentistes qui traitent des adolescents à intégrer

la classification du RC à leur pratique clinique et à utiliser des protocoles de gestion des caries basés sur le risque pour formuler des recommandations de diagnostic, de prévention et de restauration à leurs patients. L'évaluation du RC est utile pour évaluer le degré de risque du patient et donc de déterminer la fréquence des rendez-vous et de mettre en œuvre une stratégie de mesures préventives adaptée à ce risque. L'évaluation du RC va nous amener à identifier les principaux agents étiologiques contribuant à la maladie, permettant de déterminer le type de traitement et les matériaux adéquats pour chaque adolescent.

Les indicateurs du risque carieux sont des variables supposées causer la maladie directement (par exemple, le microbiote cariogène) ou qui se sont révélés utiles pour la prédire (par exemple, la pauvreté au cours de la vie, une faible littératie en matière de santé). Les indicateurs du RC les plus couramment utilisés comprennent la présence de lésions carieuses antérieures (par exemple en denture temporaire), un faible flux salivaire, une plaque visible sur les dents, une consommation fréquente de sucre, la présence d'un appareil orthodontique, des problèmes de santé générale, des facteurs sociodémographiques, l'accès aux soins et un microbiote cariogène (336).

Les facteurs de risque les plus reconnus actuellement sont les antécédents de lésions carieuses, le statut socio-économique, la consommation de sucres, la qualité de la salive, les bactéries cariogènes et les habitudes d'hygiène orale.

Le facteur qui prend en compte les antécédents de lésions carieuses a été le facteur prédictif le plus cohérent observé dans des études d'évaluation du RC (337–340).

Le statut socio-économique est un indicateur pour diverses expositions et comportements qui ont un impact sur le RC (336). Il existe des preuves significatives pour soutenir une forte corrélation entre le statut socio-économique et l'expérience de la maladie carieuse (341–346).

La quantité de sucre consommée aussi bien que la fréquence de cette consommation contribue à la formation de lésions carieuses (347). L'OMS a publié des recommandations sur l'alimentation. La diminution des sucres dès le plus jeune âge a un impact sur le RC, et donc une importance significative plus tard dans la vie (348).

Le risque de carie est accru lorsque l'hygiène orale est mauvaise (349). Les adolescents deviennent indépendants et sans contrôle parental en matière d'hygiène orale, ce qui favorise des mauvaises habitudes (350).

La flore cariogène est souvent définie par la présence de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) et de *Lactobacillus* (351,352). Mais il est admis aujourd'hui qu'il existe plusieurs espèces bactériennes impliquées dans le processus carieux, en relation avec différents paramètres comme l'âge de

l'individu, la localisation des lésions en bouche, ou la qualité de la salive. Les études s'accordent pour dire que les lésions carieuses ne sont pas seulement imputables à des bactéries spécifiques mais sont dues à la dysbiose du microbiote oral (8,353).

La salive est un facteur important dans le développement de la carie dentaire (354,355). La xérostomie est un facteur prédictif constant d'un RC élevé (356).

Les facteurs de protection liés au RC incluent les adolescents qui reçoivent de l'eau fluorée de manière optimale, se brossent les dents quotidiennement avec un dentifrice fluoré, reçoivent du fluor topique d'un professionnel et bénéficient de contrôles dentaires réguliers (336). L'effet protecteur de la fluoration de l'eau a bien été documenté dans les principales revues systématiques et les dentifrices fluorés ont été acceptés comme une intervention de référence pour la prévention de la carie (357). Les applications topiques professionnelles de fluorure sont également efficaces pour réduire l'incidence carieuse (358).

Il existe actuellement quatre outils d'évaluation du RC couramment utilisés :

- Le formulaire d'évaluation du RC de l'Association Dentaire Américaine (ADA)(359).
- L'outil d'évaluation du RC de l'Académie Américaine de Dentisterie Pédiatrique (AAPD)(157).
- Le Management des Caries par Évaluation des Risques (CAMBRA) de l'Association Dentaire Californienne (CDA)(360).
- Le « Cariogram » (Université de Malmo, Suède)(361).

La validité des outils existants pour l'évaluation du RC distingue chez les adolescents, la classification de l'ADA, de l'AAPD et de CAMBRA et, chez les adultes, les classifications du CARIOGRAM, de l'ADA et de CAMBRA.

La prédiction du RC repose sur 15 items d'évaluation. Ceux-ci pouvant être opérationnalisés dans un tableau de synthèse clinique d'aide à la décision du RC (Tableau 2)(336).

Facteurs de protection
Brossage deux fois par jour avec un dentifrice fluoré
Boit principalement de l'eau fluorée / des boissons à base d'eau fluorée
Reçoit du fluorure appliqué professionnellement
Utilise des bains de bouche fluorés (à partir de 6 ans)
Utilise des produits fluorés prescrits à domicile (à partir de 6 ans)
Facteurs de risque
Consomme plus de 3 boissons sucrées ou collations entre les repas chaque jour
Problèmes de santé physique ou comportementale qui entravent les soins à domicile
Cliniquement, peu de salive ou bouche sèche en raison de problèmes médicaux ou de médicaments
Carie récente (lésion (s) passée (s) modérée (s) ou avancée (s) depuis la dernière évaluation ou au cours des 3 années)
Les parents ou les frères et sœurs ont eu une dent cariée au cours de la dernière année (à considérer pour les enfants de moins de 14 ans)
Plaque visible
Absence de scellement de sillons
Appareils orthodontiques empêchant l'hygiène orale
Les indicateurs de la maladie
Lésion (s) initiale (s) active (s) (lésions de l'émail, white spots)
Lésion (s) active modérée ou avancée en cours

Tableau 2. Facteurs à prendre en compte lors de l'évaluation du risque de nouvelles lésions carieuses chez l'adolescent (336).

1. Classification de l'Association Dentaire Américaine

Cette classification repose sur un formulaire d'évaluation du RC. Il s'adresse aux patients âgés de 0 à 6 ans et l'autre aux patients plus de 6 ans (Tableau 3)(359). Les caractéristiques qui exposent un patient à un risque de carie élevé sont les suivantes (362) :

- Aliments ou boissons sucrés entre les repas.
- L'expérience de la carie chez la mère, les frères et sœurs. Expérience de lésion carieuse dans les 6 derniers mois.
- Besoins spéciaux en matière de soins de santé : troubles du développement, physiques, médicaux ou mentaux empêchant ou limitant la prestation de soins de santé bucco-dentaires adéquats, par eux-mêmes ou par les personnes qui en prennent soin.
- Chimiothérapie / radiothérapie.
- Lésions ou restaurations carieuses cavitaires ou non cavitaires (débutantes) (évidentes sur le plan visuel ou radiographique) : au moins 3 lésions carieuses ou restaurations au cours des 36 derniers mois.
- Dents manquantes à cause de la carie : au cours des 36 derniers mois.
- Bouche sèche (xérostomie).

		Risque faible	Risque modéré	Risque élevé
	Conditions	Cochez ou entourez les conditions qui s'appliquent		
I.	Exposition au fluorure (eau de boisson, suppléments, applications professionnelles, dentifrice)	Oui	Non	
II.	Aliments ou boissons sucrés (y compris les jus, les boissons gazeuses ou boissons non gazeuses, boissons énergisantes, sirops)	Principalement au moment des repas		Fréquent ou prolongé entre les repas
III.	Expérience de caries chez la mère et / ou des autres frères et sœurs (patients âgés de 6 à 14 ans)	Aucune lésion carieuse les 24 derniers mois	Lésions carieuses les 7-23 derniers mois	Lésions carieuses dans les 6 derniers mois
IV.	Patient recevant des soins dentaires réguliers dans un cabinet dentaire	Oui	Non	
	Conditions de santé générales	Cochez ou entourez les conditions qui s'appliquent		
I.	Besoins spéciaux en matière de soins de santé	Non	Oui (> 14 ans)	Oui (6-14 ans)
II.	Chimio/Radiothérapie	Non		Oui
III.	Trouble de l'alimentation	Non	Oui	
IV.	Médicaments réduisant le débit salivaire	Non	Oui	
V.	Abus de drogues et d'alcool	Non	Oui	
	Conditions cliniques	Cochez ou entourez les conditions qui s'appliquent		
I.	Lésions cavitaires ou non cavitaires (débutantes) Lésions carieuses ou restaurations (visuel ou radiographie)	Pas de nouvelles lésions carieuses ou restaurations dans les 36 derniers mois	1 à 2 nouvelles lésions carieuses ou restaurations dans les 36 derniers mois	3 ou plus lésions carieuses ou restaurations dans les 36 derniers mois
II.	Dents manquantes à cause de carie dans les 36 derniers mois	Non		Oui
III.	Plaque visible	Non	Oui	
IV.	Morphologie de dent inhabituelle qui compromet l'hygiène orale	Non	Oui	
V.	Restauration interproximale (1 ou plus)	Non	Oui	
VI.	Surface radiculaire exposée	Non	Oui	
VII.	Restaurations inadaptées et / ou points de contact ouverts avec tassements alimentaires	Non	Oui	
VIII.	Appareils dentaires / orthodontiques (fixes ou amovibles)	Non	Oui	
IX.	Xérostomie (bouche sèche)	Non		Oui
Évaluation globale du risque carieux :				
		Faible	Modéré	Élevé

Tableau 3. Formulaire d'évaluation du risque carieux (> 6 ans)(363).

Le professionnel encercle ou coche les cases des conditions qui s'appliquent au patient. Pour obtenir un risque faible, seules les conditions de la colonne « Risque faible » doivent être présentes ; pour un risque modéré, seules les conditions des colonnes « Risque faible » et / ou « Risque modéré » doivent être présentes ; et pour le risque élevé, une ou plusieurs conditions sont présentes dans la colonne « Risque élevé ».

2. Classification de l'Académie Américaine de Dentisterie Pédiatrique

Cette classification a modifié son outil d'évaluation du RC initial (364) en un outil plus sensible et plus pratique (365). Intégrant les preuves les plus récentes et l'opinion des experts (362,366,367), son outil d'évaluation permet d'évaluer les niveaux de RC chez les nourrissons, les enfants et les adolescents. Un formulaire a été établi pour les enfants âgés de 0 à 5 ans et un formulaire pour les enfants et adolescents de 6 ans et plus. (Tableau 4).

Facteurs	Risque élevé	Risque modéré	Risque faible
Facteurs de risque sociaux / biologiques			
Le patient souffre de pauvreté et a une faible littératie en santé	Oui		
L'enfant est fréquemment exposé (> 3 fois par jour) aux collations	Oui		
Le patient a des besoins spécifiques en soins		Oui	
Le patient est un immigrant récent		Oui	
Facteurs de protection			
Le patient reçoit de l'eau potable fluorée de manière optimale			Oui
Le patient se brosse les dents tous les jours avec un dentifrice fluoré			Oui
Le patient reçoit du fluor topique d'un professionnel de santé			Oui
Le patient reçoit des soins dentaires réguliers			Oui
Facteurs cliniques			
Le patient a ≥ 1 lésion interproximale	Oui		
Le patient a des lésions actives non cavitaires (white spots) ou anomalies de l'émail	Oui		
Le patient a un faible flux salivaire	Oui		
Le patient a des restaurations défectueuses		Oui	
Patient porte un appareil intra-oral		Oui	
Évaluation globale du risque carieux :	Faible	Modéré	Élevé

Tableau 4. Formulaire d'évaluation du risque carieux (> 6 ans)(157).

La catégorisation d'évaluation du risque faible, modérée ou élevée est basée sur la prépondérance des facteurs de l'individu. Toutefois, le jugement clinique peut justifier l'utilisation d'un seul facteur, tel que : (a) une exposition fréquente à des collations cariogènes, (b) au moins une lésion interproximale, ou (c) un faible flux salivaire, pour déterminer le risque global (157).

Les indicateurs de haut RC concernent des facteurs biologiques : le niveau de pauvreté et la littératie de l'adolescent sur la santé et les grignotages ; et des facteurs cliniques : un faible flux salivaire, au moins une lésion interproximale et des anomalies amélaire ou lésions non cavitaires.

Les facteurs protecteurs sont un brossage deux fois par jour avec un dentifrice fluoré, une consommation d'eau fluorée, un apport topique de fluor par un professionnel de santé, des mesures préventives à la maison et des visites de contrôle régulières chez le dentiste.

Pour les indicateurs du RC modéré, le critère des patients avec des besoins de santé spécifique et/ou celui des immigrants sont intégrés. Sur le plan clinique, le port d'un appareil orthodontique et des soins conservateurs défectueux seront pris en considération.

3. Classification Management des Caries par Évaluation des Risques

La classification CAMBRA établit une procédure pratique d'évaluation du RC pour les patients âgés de 6 ans jusqu'à l'âge adulte (367). Le contenu du formulaire et les procédures ont été validés par la recherche sur les résultats après plusieurs années d'expérience en utilisant les facteurs et les indicateurs inclus. Assigner à un patient un niveau de RC est la première étape dans la gestion du processus de la maladie. Un guide étape par étape explique comment procéder.

Cette évaluation se déroule en deux phases. La première consiste à déterminer des indicateurs de la maladie, des facteurs de risque et des facteurs de protection spécifiques pour chaque patient (Figure 7)(368).

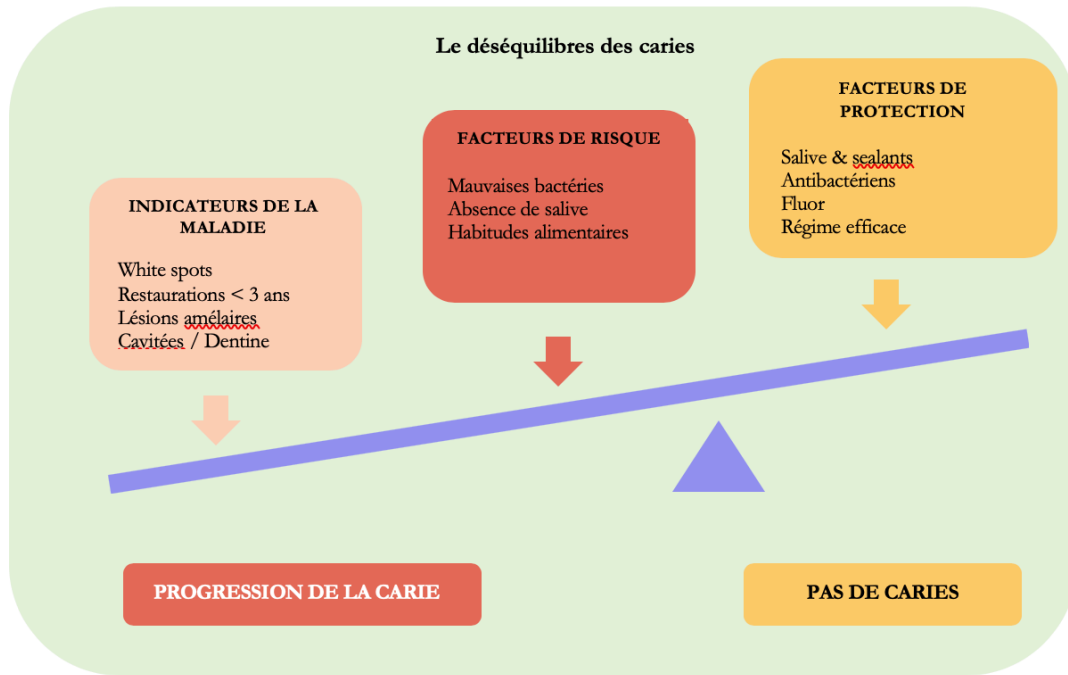


Figure 7. Déséquilibre associé aux lésions carieuses (367).

L'équilibre entre les indicateurs de la maladie, les facteurs de risque et les facteurs de protection détermine si la carie dentaire progresse, s'arrête ou si le processus s'inverse.

La deuxième étape consiste à déterminer le niveau de risque indiqué par la somme de ces facteurs. Des facteurs pathologiques et protecteurs spécifiques de la carie contribuent à déterminer l'équilibre entre progression, arrêt ou inversion de la maladie (368,369).

Les quatre premiers indicateurs décrits dans le tableau ci-dessous sont des indicateurs forts de l'activité carieuse (Tableau 5). Une réponse positive à l'un ou l'autre de ces indicateurs classe automatiquement le patient en catégorie « haut risque carieux », sauf si une intervention thérapeutique est déjà mise en place. L'examen clinique est complété d'un bilan radiographique. Le premier indicateur est une lésion cavitaire, franche qui se manifeste radiographiquement, le second est une lésion proximale confinée à l'émail, le troisième correspond aux taches blanches ou « white spot » situés sur les surfaces lisses des dents, enfin le dernier indicateur est l'ensemble des restaurations conservatrices effectuées au cours des 3 dernières années.

Date d'évaluation : première fois ou contrôle (entourez)			
Les indicateurs de la maladie (n'importe quel OUI signifie probablement un risque élevé et un test bactérien à faire)	Si OUI = Entourez	Si OUI = Entourez	Si OUI = Entourez
Cavités visibles ou pénétration de la dentine visible radiographiquement	OUI		
Lésions radiographiques amélaire (pas dans la dentine)	OUI		
White spot (taches blanches) sur les surfaces lisses	OUI		
Restaurations dans les 3 dernières années	OUI		
Facteurs de risque (facteurs biologique prédisposants)			
<i>Streptococcus mutans</i> et <i>Lactobacillus</i> modérés ou élevés (par culture)		OUI	
Plaque visible		OUI	
Grignotages fréquents (> 3 fois par jour entre les repas)		OUI	
Fossettes et sillons creux		OUI	
Flux salivaire inadéquat par observation ou mesure		OUI	
Facteurs réduisant la salive (médicaments, rayons)		OUI	
Racines exposées		OUI	
Appareil orthodontique		OUI	
Facteurs protecteurs			
Eau fluorée			OUI
Dentifrice fluoré au moins 1 fois par jour			OUI
Dentifrice fluoré au moins 2 fois par jour			OUI
Bain de bouche fluoré quotidien			OUI
Dentifrice à 5000 ppm de fluor quotidiennement			OUI
Vernis fluorés dans les 6 derniers mois			OUI
Application topique de fluor dans les 6 derniers mois			OUI
Chlorhexidine 1 fois par semaine dans les 6 derniers mois			OUI
Chewing-gum au xylitol 4 fois par jour les 6 derniers mois			OUI
Pâte à base de Calcium et de Phosphate les 6 derniers mois			OUI
Flux salivaire adéquat			OUI
Résultats des tests salivaires/bactériens			
Évaluation du risque carieux :	Élevé	Modéré	Faible

Tableau 5. Formulaire d'évaluation du risque carieux chez les enfants et adolescents âgés de 6 ans et plus (367).

En conclusion, eu égard de l'évolution des connaissances, et à la mise à disposition de nouvelles méthodes de classifications fondées sur la prédiction du RC des enfants et des adolescents, la gestion de la carie se doit d'inclure la détection précoce des lésions non cavitaires, l'identification de la progression de la carie, la compréhension du processus pathologique et la surveillance active pour appliquer des mesures préventives et surveiller attentivement les signes d'arrêt ou de progression chez un individu (334).

PARTIE 3 - MICROBIOTE, SANTE ORALE ET SANTE GENERALE

I. MICROBIOTE ORAL

Divers micro-organismes habitent la cavité orale (370,371). Nombre d'entre eux sont spécifique de cette niche écologique (372) qui abrite des microenvironnements distincts, tels que les surfaces dures des dents ou les surfaces épithéliales des muqueuses (Figure 8). Ces surfaces sont exposées à une phase fluide que représente la salive ou le liquide gingival. De nombreux micro-organismes existent dans la bouche, parmi lesquels on retrouve des bactéries, des champignons et des virus (373). Les principales bactéries sont des *Firmicutes*, des *Bacillus*, des *Protéobactéries* et des *Actinomyètes* (374). Parmi les 85 espèces de champignons retrouvées dans la bouche, le plus important est *Candida* (375) qui n'a pas d'effet pathogène lorsque le microbiote oral est normal mais qui attaque les tissus buccaux lorsque l'équilibre du microbiote oral est rompu. Au sein du biofilm, *Candida* interagit avec *Streptococcus* pour exercer son action pathogène (376). Les virus, principalement des phages, font également partie du microbiote oral (377). La nature des phages présents dans la bouche est constant tout au long de la vie (378). D'autres virus vont pouvoir coloniser la cavité orale en cas de maladies comme le virus des oreillons (379) ou le VIH (380).

Les bactéries sont donc les principaux micro-organismes du microbiote oral. Sur les 1000 espèces qui pénètrent par voie orale, seul 50 espèces sont retrouvées au niveau de chaque surface colonisée (381,382). Chacune de ces surfaces colonisées abrite une communauté microbienne spécifique. Le tropisme des espèces bactériennes pour les tissus oraux est dû à leurs grandes capacités et spécificités d'adhérence. Ainsi les bactéries orales présentent une résistance aux forces de cisaillement mécanique, à l'écoulement des fluides et à la mastication.

Les colonisateurs primaires des surfaces orales sont principalement des bactéries anaérobies facultatives telles que les *Streptocoques* et les *Actinomyces*. Au niveau sous-gingival, une réduction de la teneur en oxygène favorise la croissance de bactéries anaérobies strictes telles que les *Bacteroidaceae* et les *Spirochètes*. Outre la composition microbienne, l'organisation spatiale et structurelle des communautés microbiennes est essentielle pour les interactions physiques et métaboliques qu'elles soient antagonistes ou coopératives (383,384). Ainsi, les micro-organismes présents à la surface des dents forment des communautés de biofilms composées de plusieurs espèces intégrées dans une matrice de substances polymériques extracellulaires (SPE). La structuration du biofilm au niveau des surfaces épithéliales, plus délocalisées que les surfaces dentaires, nécessitent une stratégie de colonisation spécialisée. En effet, lorsque les organismes forment des biofilms sur ces surfaces, le temps de maturation des biofilms est moins long que sur

les surfaces dentaires. De plus, les bactéries pénètrent et se développent au sein des tissus épithéliaux et même au niveau intracellulaire. Dans la majorité des cas, il existe un équilibre homéostatique entre les bactéries résidentes et les bactéries pathogènes qui colonisent progressivement. Le microbiote a pour rôle d'exclure les agents pathogènes pour maintenir une symbiose et contribuer ainsi au développement du système immunitaire (385,386). La salive de l'hôte contribue également à la stabilité de l'écosystème en tamponnant l'environnement oral, en fournissant des éléments nutritifs à la communauté et en fournissant des facteurs antimicrobiens antagonistes des espèces exogènes. Néanmoins, dans des conditions particulières, l'interaction hôte-communauté devient dysbiotique et des maladies spécifiques au site, impliquant les dents (caries) ou les gencives (gingivites) peuvent survenir (375,387,388).

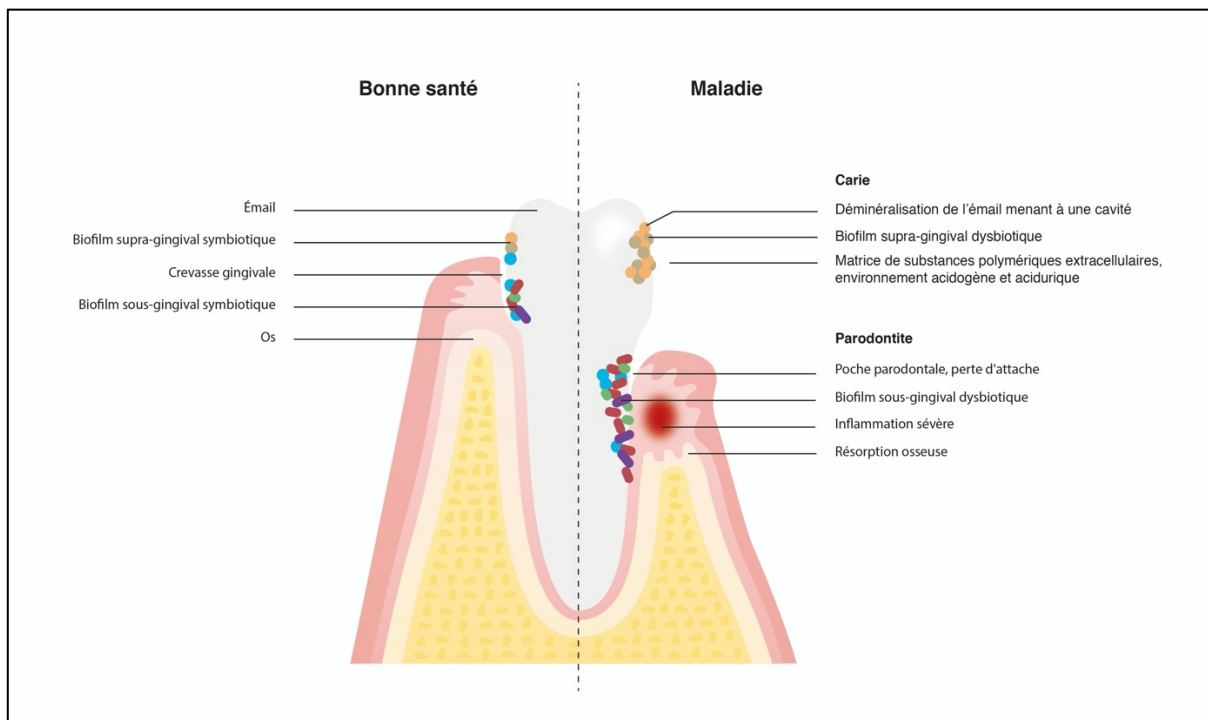


Figure 8. Microbiote oral symbiotique et dysbiotique dans divers habitats de la cavité orale (389).

La colonisation microbienne se produit sur toutes les surfaces et les micro-organismes peuvent également pénétrer dans les tissus et cellules épithéliaux. Le microbiote s'assemble pour former des biofilms. Dans le cas de santé orale (à gauche), les biofilms symbiotiques maintiennent un équilibre homéostatique avec l'hôte. Dans le cas de maladie orale (à droite), les biofilms deviennent dysbiotiques, entraînant une carie ou une parodontite.

II. MICROBIOTE ORAL ET DYSBIOSE

Plusieurs processus mettent en évidence la transition d'une communauté microbienne commensale (symbiose) vers un état de dysbiose. Des altérations de la compétence immunitaire de l'hôte ou du régime alimentaire peuvent affecter la composition de la communauté microbienne et

entraîner une augmentation de la production de facteurs de virulence. À mesure que la communauté se développe, le métabolisme microbien et les sous-produits de la réponse immunitaire de l'hôte peuvent provoquer des modifications de l'environnement local qui facilitent la croissance excessive ou la surreprésentation de micro-organismes associés à un état dysbiotique. Le microbiote associé à un état de santé est donc considéré comme étant plus fréquent, alors que le microbiote associé à la maladie est influencé par des micro-organismes pathogènes possédant des fonctions métaboliques et un potentiel de virulence élevé (390). Lorsqu'une communauté microbienne a atteint un état dysbiotique, la maladie peut se mettre en place et persister pendant une période prolongée (383,391). Cette association entre un microbiote dysbiotique et la maladie est observée dans le cas de maladies orales telles que la parodontite et la carie (Figure 9) qui sont souvent chroniques et progressent lentement.

1. Microbiote oral et caries

a. Composition du microbiote

Dans le cas des caries, la surexposition aux glucides alimentaires et à certains facteurs de l'hôte favorise la production d'une matrice de SPE et de métabolites acides, en plus de provoquer l'accumulation de micro-organismes acidogènes et aciduriques. Les glucides fermentescibles en excès entraînent donc la transition vers une communauté de biofilms pathogènes (384,392,393).

Si la consommation de sucre est faible et peu fréquente, les communautés microbiennes sur les dents restent stables et, bien qu'elles puissent produire des acides qui déminéralisent l'émail, la diminution épisodique du pH peut être facilement neutralisée par la salive, qui restaure et maintient la minéralisation de l'émail (393). Cependant, avec une exposition fréquente aux glucides fermentescibles, les micro-organismes s'intègrent dans une matrice riche en SPE tout en produisant en permanence des acides. Les régions localisées de faible pH dans les biofilms formés à la surface des dents (394,395) continuent de sélectionner des micro-organismes aciduriques (396). Si le biofilm n'est pas éliminé et que la consommation de sucre se poursuit fréquemment, il s'ensuit un état d'acidification prolongé et répété (qui peut être exacerbé par un dysfonctionnement de la sécrétion ou de la composition salivaire), perturbant l'équilibre homéostatique de la minéralisation et entraînant la déminéralisation de l'émail. Les *streptocoques*, en particulier *S. mutans* et les *lactobacilles* sont reconnus depuis longtemps comme des agents pathogènes associés aux caries. Toutefois, des analyses moléculaires plus récentes ont révélé l'existence d'une communauté pathogène comprenant des bactéries non *streptocoques* (*Bifidobacterium spp.*, *Scardovia spp.* et *Actinomyces spp.*) et des champignons (*Candida albicans* (*C. albicans*))(397–399). La composition microbienne peut varier

en fonction des différents sites dentaires. Ces micro-organismes interagissent dans une synergie polymicrobienne dynamique et concertée pour former un biofilm cariogène au sein duquel la communauté se modifie au fur et à mesure que la carie progresse (déminéralisation initiale)(384).

b. Mécanique de la dysbiose carieuse

La carie est une maladie à biofilm polymicrobien provoquée par des interactions entre le régime alimentaire et le microbiote qui détruisent le tissu dentaire minéralisé (Figure 9)(3,384,396,400). Les micro-organismes oraux sont nécessaires à la formation de caries, mais ils ne sont pas suffisants, car la formation de biofilms pathogènes dépend de la consommation fréquente de sucres alimentaires par l'hôte (8,384,400). D'autres facteurs liés à l'hôte et au comportement (par exemple, une mauvaise hygiène orale, le flux et la composition salivaire et des défauts de l'émail) et une exposition insuffisante au fluor contribuent également au développement de la carie (3,384,396,400). Les colonisateurs primaires associés à la santé dentaire, tels que *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), présentent des avantages écologiques substantiels par rapport aux organismes cariogènes lorsque le régime alimentaire de l'hôte n'est pas riche en sucres alimentaires. Ces organismes peuvent se lier facilement aux dents recouvertes de salive, présenter une croissance plus rapide et agir contre les agents pathogènes par de multiples mécanismes, notamment la production d'alcalis, de bactériocines et de peroxyde d'hydrogène (401–403), contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie et de la stabilité microbienne (Figure 9). Toutefois, lorsque les perturbations écologiques dépassent un certain seuil, la compétition entre les espèces est modifiée, ce qui déclenche des processus pathogènes. En particulier, la surexposition aux glucides fermentescibles peut perturber l'équilibre entre les agents commensaux et les agents pathogènes. Le saccharose est particulièrement cariogène car il est constitué d'hexoses (glucose et fructose) qui sont utilisés pour synthétiser des SPE (glucanes et fructanes) et sont efficacement fermentés pour produire des acides organiques (acide lactique) qui influencent grandement la structure et la composition des biofilms dentaires (384,394,396). Les SPE fournissent des sites de liaison pour l'adhésion à la surface de la dent et favorisent la co-adhésion entre les cellules bactériennes. Les communautés microbiennes s'intègrent donc dans une matrice polymérique qui assure cohésion, protection et stabilité. Cette organisation structurale, associée à l'acidification de l'environnement, favorise les transferts microbiens vers des organismes acidogènes et aciduriques (384,394,396). Cependant, les organismes présents dans les biofilms dentaires doivent gérer un large éventail de stress et de fortes fluctuations d'éléments nutritifs pour pouvoir résister et contribuer à l'apparition de la carie (Figure 9). Ainsi, l'alimentation peut moduler à la fois l'écologie du microbiote oral et les synergies polymicrobiennes en fournissant un microenvironnement acide très localisé. À son

tour, ce microenvironnement acide façonne la composition et l'activité métabolique de la communauté de manière à favoriser le développement de la carie.

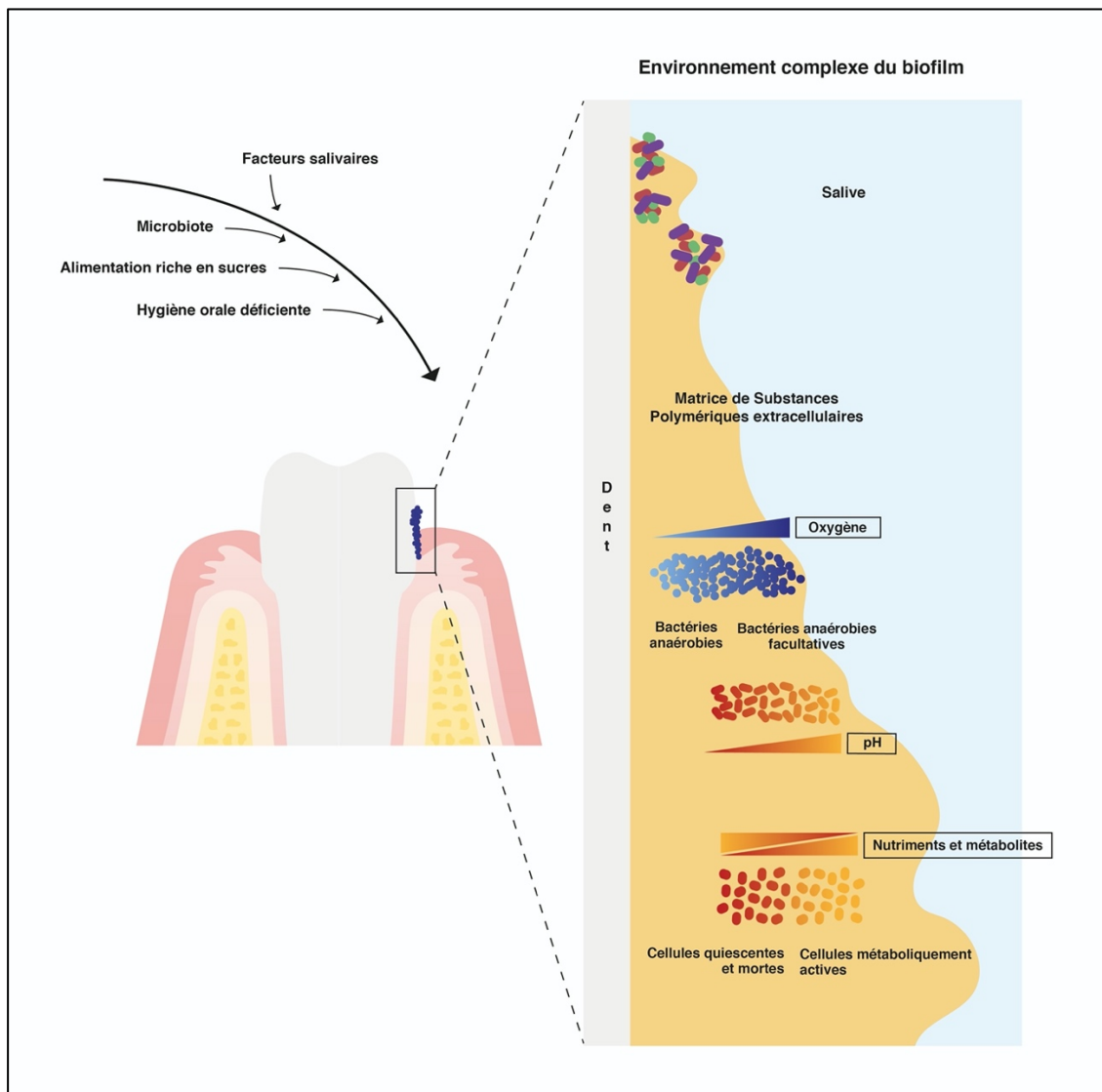


Figure 9. Microenvironnement complexe du microbiote cariogène (389).

Dans la cavité orale, une alimentation riche en sucre, en particulier en saccharose, fournit un substrat pour la production de polysaccharides extracellulaires, qui forment le cœur de la matrice extracellulaire dans les biofilms cariogènes. La matrice modifie radicalement les propriétés physiques et biologiques du biofilm. Les exopolysaccharides améliorent l'adhésion, la cohésion et l'accumulation bactérienne à la surface de la dent, tout en formant une matrice polymère qui incorpore les cellules. La matrice fournit un support multifonctionnel pour l'organisation structurée et la stabilité de la communauté microbienne du biofilm. Les propriétés de diffusion de la matrice, associées aux activités métaboliques des organismes incorporés, permettent de créer une variété de microenvironnements chimiques, notamment des gradients localisés d'oxygène et de pH. De plus, la matrice peut piéger ou séquestrer un large éventail de substances (nutriments, métabolites, molécules...).

L'hypothèse d'une plaque écologique (biofilm) qui est à l'origine du développement des lésions carieuses a fourni un modèle pour la pathogenèse microbienne de la carie (400). Ceci est

étayé par des études basées sur le microbiote qui révèlent des changements dans la composition microbienne lors du passage de la santé aux différentes étapes de la carie (8,396–398,400,404–406). Globalement, le microbiote, en contact fréquent avec du sucre, est dominé par des organismes de plus en plus acidogènes et aciduriques, notamment des *Streptocoques mutans* et non *mutans*, des *Actinomyces*, des *Lactobacilles*, des *Bifidobactéries* et des *Scardovia spp.*, qui créent une synergie pour accroître la production de SPE et favoriser l'acidification du milieu. L'acidification du milieu s'accompagne d'une perte de la diversité bactérienne. Les bactéries bénéfiques, qui se développent mieux dans un milieu où le pH est neutre, se raréfient et leur métabolisme diminue. De plus, dans les lésions carieuses avancées où la dentine est exposée, la composition de la communauté bactérienne va encore être modifiée car le changement important du microenvironnement permet aux bactéries protéolytiques de se développer (407). Ainsi, parmi ces nouvelles espèces, on retrouve couramment *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Granulicatella* et certaines souches de *Leptotrichia*, qui présentent un potentiel saccharolytique élevé et produisent des acides (398,408,409). Bien que la survie des espèces sensibles à l'acide soit perturbée dans les microenvironnements acides, les micro-organismes qui utilisent le lactate comme source de carbone (*Veillonella spp.*) (410,411) bénéficieront de la diminution du pH, ce qui peut aider à inhiber la boucle d'acidification. Certaines bactéries présentes dans les biofilms cariogènes ne sont pas acidogènes, telles que *Prevotella spp.*, *Atopobium spp.* et les bactéries à Gram négatif (398,412). Leur contribution à la communauté des biofilms ou à la pathogenèse reste à élucider. Curieusement, *C. albicans* peut être détecté en plus grand nombre, souvent en même temps que *S. mutans*, dans la plaque cariogène de jeunes enfants atteints de carie sévère (397,413). *C. albicans* peut interagir de manière synergique avec *S. mutans* et coloniser la surface des dents en présence de saccharose alimentaire par le biais d'interactions médiées par les SPE. Les exoenzymes, appelées glucosyltransférases, sécrétées par *S. mutans*, se lient à la surface de *Candida* et synthétisent des glucanes *in situ* en utilisant du saccharose comme substrat. Les glucanes formés à la surface améliorent la co-adhésion bactérien-fongique et intègrent les micro-organismes dans une matrice riche en SPE, favorisant l'accumulation de biofilms mixtes (414,415). Dans les biofilms, les micro-organismes coopèrent en fournissant des substrats ou des métabolites (alimentation croisée), en fournissant des facteurs stimulant la croissance, en augmentant la production de SPE et en maintenant un environnement acidurique (416). Reste à déterminer si d'autres espèces de *Candida* ou d'autres champignons sont associés au microbiote cariogène dans les caries de l'enfance. Globalement, les preuves disponibles indiquent que les interactions polymicrobiennes synergiques déclenchées par les sucres alimentaires de l'hôte sont à l'origine du développement des caries, qui peuvent être exacerbées par un dysfonctionnement salivaire, une exposition insuffisante au fluorure et une mauvaise hygiène orale.

Bien que les premières études sur les caries se soient concentrées sur la composition des communautés microbiennes orales, l'importance de la matrice extracellulaire dans le comportement microbien est de plus en plus reconnue comme essentielle pour le mode de vie des biofilms (384,417). Les propriétés structurales et biochimiques de la matrice sont essentielles pour les biofilms, pour l'adhésion de surface, les interactions et la tolérance aux antimicrobiens (417). Les principaux composants de la matrice sont les SPE, y compris les exopolysaccharides tels que les glucanes, l'ADN extracellulaire, l'acide lipotéichoïque, les protéines de type amyloïde, les glycoprotéines et les protéines de l'hôte (384). Les micro-organismes intégrés dans la matrice des biofilms cariogènes sont cohésifs et adhérents, ce qui rend ces biofilms difficiles à éliminer des surfaces. De plus, la matrice extracellulaire assure une protection contre les agents antimicrobiens. La matrice extracellulaire permet également la formation de gradients chimiques ou nutritifs, notamment de gradients de pH et d'oxydoréduction, affectant ainsi le comportement et la survie des micro-organismes (Figure 9)(384,417). De plus, la matrice peut limiter la diffusion des ions tampons chargés, alors que les sucres non chargés tels que le glucose et le saccharose peuvent facilement diffuser dans les biofilms et que ceux-ci peuvent être métabolisés en acides (384). Inversement, les glucanes de la matrice extracellulaire constituent une source de sucres endogène et peuvent piéger directement les protons pour favoriser l'accumulation d'acides dans les biofilms (384,394,395,418). Ces propriétés peuvent aider à expliquer comment se produit l'acidification localisée dans les biofilms en présence de tampons salivaires, de forces de cisaillement et de l'environnement quasi-alcalin de la cavité orale. Ainsi, la matrice extracellulaire fournit une plateforme multifonctionnelle pour l'organisation des bactéries dans un écosystème multicellulaire cohésif qui favorise l'adhérence et localise dans l'espace les métabolites acides. De plus, les acides produits dans les biofilms sont à l'abri de la salive, ce qui empêche une neutralisation rapide et aide à créer un microenvironnement cariogène. Cet effet de protection renforce la capacité des acides à déminéraliser l'émail et à provoquer des caries. La capacité de *S. mutans* à réduire le pH à des niveaux toxiques pour certains micro-organismes et à créer un environnement cohésif riche en SPE, est susceptible de faciliter la colonisation d'autres organismes et ainsi assurer leur protection (Figure 9). L'établissement d'un habitat pathogène localisé par la production simultanée de matrice et d'acides, qui favorise une communauté dysbiotique, est compatible avec les niveaux variables des bactéries dans la plaque pendant le développement de la carie (398,400,404,405,409,412,419).

Globalement, la carie peut être définie conceptuellement comme un processus pathologique dépendant de l'alimentation de l'hôte qui repose non seulement sur les changements écologiques et l'acidogénèse polymicrobienne, mais également sur le milieu extracellulaire du biofilm dans lequel les organismes interagissent et les acides s'accumulent. Cette vision évolutive

des flux écologiques et des synergies polymicrobiennes concertées dans un environnement structuré et protégé, ainsi que des facteurs salivaires et comportementaux, a des conséquences directes sur le développement de nouveaux traitements antibiofilm plus efficaces.

2. Microbiote oral et parodontites

a. Composition du microbiote

Dans les MP, les communautés polymicrobiennes induisent une réponse dérégulée et destructive de l'hôte par le biais d'un mécanisme de dysbiose (420). Des approches conventionnelles basées sur la culture bactérienne ont identifié une triade de pathogènes composée de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) et *Treponema denticola* (*T. denticola*) (421,422) (complexe rouge de Socransky (423)), et des études moléculaires ont élargi la liste pour inclure les bactéries à Gram positif tel que *Filifactor alocis* et *Peptoanaerobacter stomatis*, des membres à Gram négatif du phylum *Firmicutes* (*Dialister spp.*, *Megasphaera spp.* et *Selenomonas spp.*), des espèces du genres *Prevotella*, *Desulfobulbus* et *Synergistes*, et beaucoup d'autres (370,371,424–426). En effet, contrairement à ce qui se passe dans le tractus gastro-intestinal, les MP sont associées à une augmentation de la diversité du microbiote, qui serait dû à l'apport d'éléments nutritifs supplémentaires provenant de la lésion parodontale. Cependant, il est important de noter que les études *in vivo* montrent une variation substantielle des microbiotes chez les individus atteints de MP et même entre les sites d'un même individu (408,412,427,428). Bien que les études chez l'humain ne fournissent pas d'informations sur les mécanismes de la maladie, l'intégration des données métagénomiques et métatranscriptomiques indique qu'au lieu d'une cohorte d'organismes pathogènes distincts, un ensemble particulier de fonctions géniques est nécessaire pour induire une dysbiose (389).

b. Mécanisme de la dysbiose parodontale

Un élément commun qui relie la carie et la MP est l'importance des interactions de la communauté microbienne avec l'hôte (régime alimentaire dans le cas de la carie et inflammation dans le cas de la MP). De plus, la structure des communautés microbiennes (c'est-à-dire la composition et l'abondance des espèces individuelles) change lors du passage de la santé à la maladie (Figure 10). Jusqu'à très récemment, il était admis que l'apparition de la MP était liée à la mise en place d'un microbiote sous-gingival dysbiotique caractéristique (429). Selon la théorie de la « plaque pathogène spécifique », les bactéries des complexes de Socransky bleu (*Actinomyces*), vert (*Eikenella corrodens* (*E. corrodens*), *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga sputigena* (*C. sputigena*),

Capnocytophaga ochracea (*C. ochracea*), *Campylobacter concisus* (*C. concisus*), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) sérotype a), jaune (*S. mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus* spp...) et violet (*Veillonella parvula* (*V. parvula*), *Actinomyces odontolyticus* (*A. odontolyticus*)) étaient compatibles avec un état de santé gingival. La mise en place progressive des bactéries du complexe orange (*Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Campylobacter gracilis* (*C. gracilis*), *Campylobacter rectus* (*C. rectus*) etc.) et du complexe rouge (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) était liée à l'apparition de la MP (423). À l'inverse, la théorie des « agents pathogènes clés » repose sur le fait que quelques bactéries pathogènes qui, même présentes en faible quantité, auraient la capacité de transformer une flore bactérienne symbiotique en une flore bactérienne dysbiotique, provoquant ainsi une réaction inflammatoire exacerbée à l'origine d'un état pathologique (430). Par exemple, il a été démontré que *P. gingivalis* était capable de manipuler le système immunitaire natif de l'hôte (431) ce qui faciliterait sa survie et sa multiplication, mais également celle de la communauté microbienne dans son ensemble. Contrairement aux espèces dominantes qui peuvent influencer sur l'inflammation en raison de leur présence abondante, les agents pathogènes clés peuvent déclencher l'inflammation lorsqu'ils sont présents en petit nombre (430).

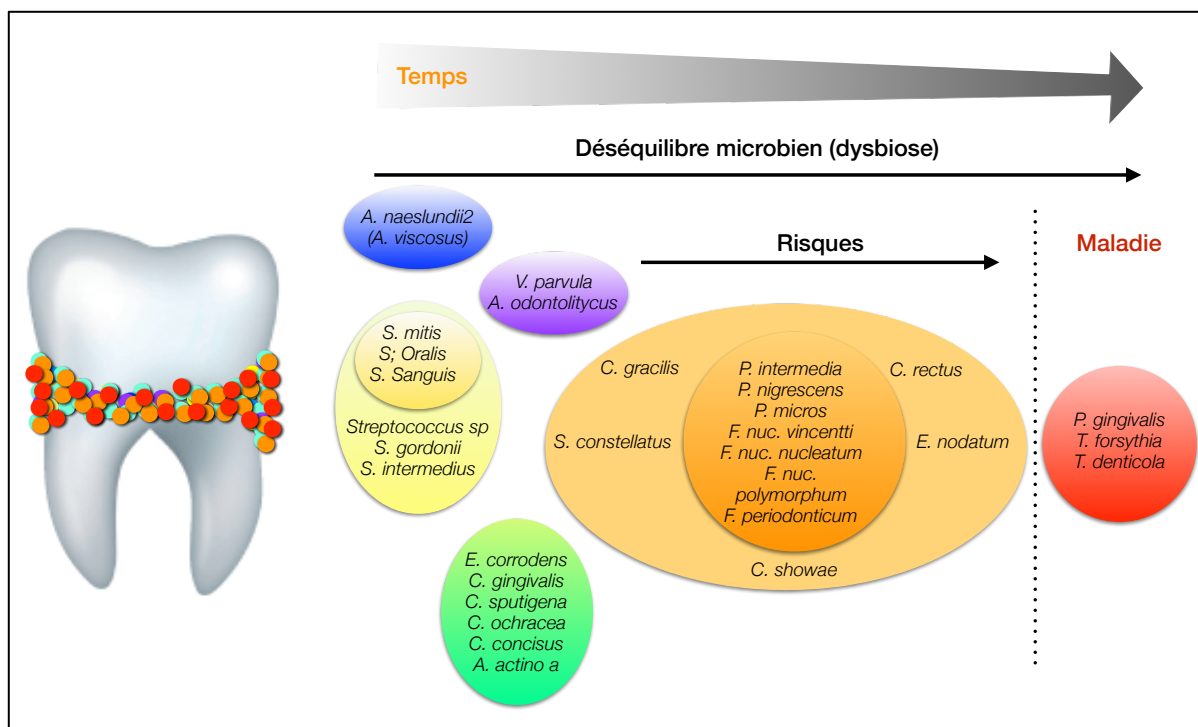


Figure 10. Microbiote sous-gingival associé à l'apparition de la maladie parodontale.

Dans la cavité orale, au niveau du sillon gingival, les bactéries des complexes bleu, jaune, violet et vert de Socransky vont s'organiser en biofilm au sein d'une matrice de polysaccharides extracellulaires. À ce stade, le biofilm est symbiotique et donc compatible avec la santé parodontale. Progressivement, les bactéries des complexes orange et rouge de Socransky vont coloniser le biofilm symbiotique qui va devenir dysbiotique. Ainsi les signes de la maladie parodontale apparaissent.

Dans la MP, on a observé une augmentation d'espèces déjà présentes qui deviennent dominantes, plutôt que l'apparition de nouvelles espèces (371). Même en l'absence de MP, les parodontopathogènes sont également présents mais en très faible quantité, comme le prédit l'hypothèse de la plaque écologique, selon laquelle des modifications des conditions environnementales peuvent favoriser la prolifération de ces agents pathogènes au-delà d'un seuil qui peut provoquer une MP (432). Ce concept a été renforcé grâce à de récentes études sur des modèles animaux montrant que les traitements anti-inflammatoires non seulement inhibent la MP chez la souris, le rat et le lapin, mais réduisent également la charge bactérienne parodontale (433–438). Inversement, la charge bactérienne des biofilms sous-gingivaux chez les personnes atteintes de MP s'accroît avec une inflammation clinique croissante (371). Par conséquent, l'inflammation semble être un changement écologique important qui peut entraîner la prolifération de micro-organismes associés à la MP par destruction des tissus qui libèrent des nutriments (426,439). Ces nutriments peuvent être transportés *via* l'exsudat inflammatoire (c'est-à-dire le fluide gingival) dans le sillon gingival pour favoriser la croissance de bactéries protéolytiques et asaccharolytiques sous-gingivales ayant une capacité d'acquisition du fer. En conséquence, des analyses transcriptomiques *in situ* à l'échelle de la communauté de biofilms sous-gingivaux associés à la MP ont révélé une expression élevée de gènes susceptibles d'accroître le potentiel pro-inflammatoire de la communauté microbienne (440). Ainsi, un sous-ensemble d'espèces pathobiontes, qui impactent la réponse inflammatoire (439), peut se développer au détriment des espèces qui ne s'adaptent pas aux nouvelles conditions environnementales, créant ainsi un déséquilibre dysbiotique dans la communauté (426,439). À l'appui de cette notion, l'ajout de sérum, d'hémoglobine ou d'hémine à des biofilms multispécifiques oraux générés *in vitro* induit la prolifération sélective d'organismes pouvant jouer le rôle de pathobionte, qui régule en outre les gènes de virulence, y compris ceux codant pour les protéases, les hémolysines et les protéines impliquées dans le transport d'hémine (441). Ce remodelage du biofilm symbiotique en un biofilm dysbiotique améliore également la capacité du biofilm à induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules hôtes (441), imitant ainsi le contexte *in vivo* où la dysbiose conduit à une inflammation. Outre le transport du fer et des acides aminés, un autre changement métabolique accru détecté lors de la dysbiose du microbiote parodontal humain implique le transport des ions potassium (442). Ces ions se concentrent dans le fluide gingival avec l'évolution de la MP (443). L'élévation de la concentration de potassium dans un modèle de biofilm dentaire *ex vivo* entraîne des modifications de composition et de phénotype dans la communauté microbienne, entraînant une production accrue de cytokines pro-inflammatoires et une diminution de la production de β -défensine 3 par les cellules épithéliales gingivales humaines (442). Un autre sous-produit de

l'inflammation est le nitrate, qui peut être utilisé comme accepteur d'électrons pour la respiration anaérobie des entérobactéries afin de supplanter les micro-organismes en fermentation lors d'une dysbiose (444). Dans un modèle murin d'inflammation parodontale, la dysbiose microbienne est associée à l'augmentation des protéobactéries exprimant de la nitrate réductase, qui peut utiliser le nitrate en quantité élevée au niveau parodontal (445). Le potassium et les nitrates semblent donc être des signaux environnementaux liés à l'inflammation qui peuvent contribuer au remodelage du microbiome oral, passant d'une communauté symbiotique à une communauté dysbiotique. Dans la MP, il semble exister une relation de cause à effet réciproque entre dysbiose et inflammation (430,446). Ainsi, l'inflammation alimente la croissance sélective des communautés dysbiotiques et la dysbiose exacerbe l'inflammation (408,439,441,445). L'inflammation agit comme un moteur écologique réciproque de la dysbiose, et cette interaction entre l'inflammation et la dysbiose semble générer une boucle auto-entretenu qui entraîne la MP.

III. DISSEMINATION DU MICROBIOTE ORAL DANS L'ORGANISME

De nombreuses recherches mettent en évidence un lien entre les maladies orales et les maladies systémiques. Ainsi, les MP seraient corrélées aux maladies cardiovasculaires, aux cancers, au diabète, aux maladies pulmonaires, aux risques d'accouchements prématurés, à la polyarthrite rhumatoïde, aux pathologies digestives, au lupus érythémateux, à la maladie d'Alzheimer, etc. (447–466). Les caries seraient corrélées avec des maladies systémiques telles que les hépatites, l'asthme, l'hypertension artérielle, les accidents cardiovasculaires, le diabète etc. (405,467).

Le lien entre les pathologies orales et les pathologies systémiques serait due à une dissémination dans l'organisme de bactéries pathogènes orales, de leurs produits bactériens ou des molécules de l'inflammation produite en réponse à la présence de ces bactéries (468,469). Plusieurs études, ont mis en évidence des bactéries orales au niveau de divers organes impliqués dans des pathologies systémiques chez des patients souffrant de maladies orales (468). Les mécanismes par lesquels les bactéries orales se disséminent dans l'organisme reste encore mal connues. Cependant, trois voies de dissémination semblent possibles : (i) voie sanguine, (ii) voie digestive et, (iii) voie respiratoire (Figure 11).

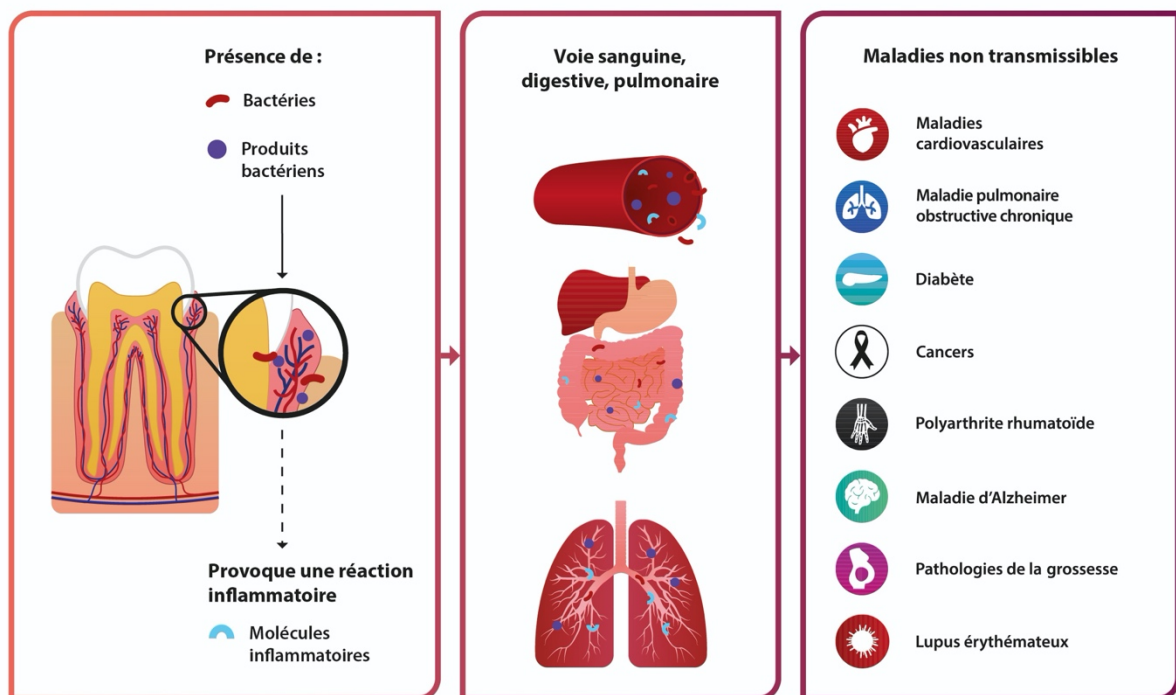


Figure 11. Différentes voies de dissémination dans l'organisme.

Les bactéries orales, leurs produits bactériens et les molécules de l'inflammation vont pouvoir diffuser dans l'organisme par voie sanguine, digestive ou respiratoire et ainsi entraîner diverses maladies systémiques telles que des cancers, du diabète, de l'arthrite rhumatoïde, des maladies cardiovasculaires, des maladies pulmonaires, des accouchements prématurés, la maladie d'Alzheimer.

1. Diffusion par voie sanguine

Le lien entre les infections orales et les maladies systémiques par la voie sanguine peut s'expliquer par trois mécanismes (470) : la propagation métastatique de bactéries à partir de la cavité orale à la suite d'une bactériémie transitoire, l'apparition d'une lésion métastatique résultant des effets de toxines microbiennes orales qui circulent, la mise en place d'une inflammation métastatique suite à une réaction inflammatoire induite par des micro-organismes oraux (470).

a. Infection métastatique

Il existe plus de 10^{13} microbes sur toutes les surfaces du corps, mais les tissus sous-jacents et la circulation sanguine sont généralement stériles (470). Dans la cavité orale, il existe plusieurs obstacles à la pénétration bactérienne dans les tissus : (i) une barrière physique composée de l'épithélium de surface, (ii) les défensines, qui sont des peptides antimicrobiens dérivés de l'hôte et localisés dans l'épithélium de la muqueuse orale, (iii) une barrière électrique qui reflète la différence entre la cellule hôte et la couche microbienne, (iv) une barrière immunologique de cellules formant

des anticorps, et (v) le système réticulo-endothélial (barrière phagocytaire)(470). Dans des circonstances normales, ces systèmes de barrière fonctionnent ensemble pour inhiber et éliminer les bactéries pénétrantes. Lorsque cet équilibre est perturbé par une rupture manifeste du système physique (traumatisme...), du système électrique (hypoxie...) ou par des barrières immunologiques (neutropénie, SIDA, traitement immunosuppresseur...), les micro-organismes peuvent se propager et causer des infections aiguës et chroniques (470). Avec des soins bucco-dentaires normaux, seul un petit nombre d'espèces bactériennes ont accès à la circulation sanguine. Cependant, en cas d'hygiène orale médiocre, le nombre de bactéries colonisant les dents, en particulier au niveau supra-gingival, pourrait être multiplié par 2 à 80 et ainsi éventuellement introduire davantage de bactéries dans les tissus et la circulation sanguine, entraînant une augmentation de la prévalence et de l'ampleur de la bactériémie (471). L'incidence des bactériémies consécutives à des interventions dentaires telles qu'une extraction dentaire, un traitement endodontique, une chirurgie parodontale est bien documentée (470,472–474). La bactériémie après extraction dentaire, détartrage, traitement endodontique a été étudiée à partir d'échantillons de sang. Les bactéries récupérées ont été incubées dans des conditions d'aérobies et d'anaérobies (474). Une bactériémie a été observée chez 100% des patients après une extraction dentaire, chez 55% après une avulsion d'une dent de sagesse et chez 20% après un traitement endodontique. Les bactéries anaérobies ont été isolées plus fréquemment que les bactéries anaérobies facultatives. Une autre étude portant sur 735 enfants traités pour une carie étendue a révélé que 9% des enfants avaient une bactériémie détectable avant le début du traitement dentaire (475). Les diverses procédures d'hygiène, notamment le brossage des dents, augmentaient la prévalence des bactériémies de 17 à 40%. Les procédures anesthésiques et chirurgicales augmentaient quant à elles l'apparition de bactériémies de 15 à 97%.

Debelian et *al.* ont utilisé des méthodes phénotypiques et génétiques pour retracer les micro-organismes libérés dans le sang pendant et après un traitement endodontique (476). Des échantillons microbiologiques ont été prélevés dans les canaux radiculaires de 26 patients atteints de parodontite apicale asymptomatique de dents monoradiculées. Le sang a été prélevé sur les patients pendant le traitement endodontique et 10 min. Tous les canaux radiculaires contenaient des bactéries anaérobies.

Ainsi, les infections orales et les procédures dentaires peuvent provoquer une bactériémie transitoire. La dissémination de micro-organismes oraux dans le sang est courante moins d'une minute après une procédure orale (470). Les micro-organismes qui pénètrent dans le sang et circulent dans le corps sont généralement éliminés par le système réticulo-endothélial en quelques minutes (bactériémie transitoire) et ne provoquent en général aucun autre symptôme clinique à

l'exception d'une éventuelle légère augmentation de la température corporelle (470). Toutefois, si les micro-organismes disséminés trouvent des conditions favorables, ils peuvent s'installer sur un site donné et, après un certain délai, commencer à se multiplier (470).

b. Lésions métastatiques

Certaines bactéries à Gram positif et à Gram négatif ont la capacité de produire des protéines diffusibles, ou des exotoxines qui vont pouvoir pénétrer dans la circulation sanguine. Les exotoxines ont des actions pharmacologiques spécifiques et sont considérées comme les poisons les plus puissants et les plus mortels connus (477). De plus, dans leur membranes externes, les bactéries à Gram négatif ont des endotoxines qui sont libérées lors de la lyse bactérienne (470). Ces endotoxines, de nature lipopolysaccharide (LPS), peuvent après introduction dans l'hôte, provoquer un grand nombre de manifestations pathologiques. Il a été montré que le LPS est continuellement libéré des bacilles parodontaux à Gram négatif au cours de leur croissance *in vivo* (470).

c. Inflammation métastatique

Les bactéries orales vont induire une inflammation locale entraînant la libération de molécules de l'inflammation qui vont diffuser dans l'organisme *via* la circulation sanguine. L'antigène soluble peut pénétrer dans le sang, réagir avec des anticorps spécifiques en circulation et former un complexe macromoléculaire. Ces immunocomplexes peuvent donner lieu à diverses réactions inflammatoires aiguës et chroniques sur les sites de dépôt (470).

2. Diffusion par voie digestive

Lors du processus de digestion, les bactéries orales, les produits bactériens et les molécules inflammatoires atteignent le tube digestif, y compris l'estomac. Pendant la digestion, les bactéries orales vont migrer dans l'estomac. Seuls celles qui résistent au pH acide de l'estomac survivront et se multiplieront dans le tractus gastro-intestinal (449,478). Ainsi, le microbiote oral et le microbiote du gros intestin présentent des similitudes chez 45% des sujets atteints de MP (479). Des études antérieures ont démontré que la modification du microbiote oral due à une pathologie orale est liée à la dysbiose du microbiote intestinal (457). Cette corrélation entre le microbiote oral et le microbiote intestinal est due à des activités quotidiennes (par exemple, la déglutition) qui

favorisent le transport de bactéries de la cavité orale au tractus gastro-intestinal. Cependant, le mécanisme d'invasion précis doit être déterminé (450).

De nombreuses expériences ont montré un regroupement de bactéries orales dans l'intestin de patients atteints de diverses maladies, mais on ignore si ces bactéries peuvent provoquer une inflammation de l'intestin et provoquer des maladies systémiques (480). Des études récentes ont montré que les bactéries orales peuvent coloniser les intestins et y persister, entraînant une activation du système immunitaire intestinal et une inflammation chronique (455). Les chercheurs ont transplanté des échantillons de salive de patients atteints de la maladie de Crohn chez des souris exemptes de germes. Cette action a entraîné une augmentation marquée du nombre de cellules T helper 1 (Th1) dans la lamina propria intestinale. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), la principale bactérie présente dans le microbiote du côlon, pourrait donc être la principale cause de l'accumulation de cellules Th1. Cependant, la colonisation de cette espèce ne provoque pas de réponse immunitaire chez les souris de type sauvage. Les expériences ci-dessus indiquent que *K. pneumoniae*, peut coloniser un microbiote intestinal dysbiotique et agir comme agent pathogène chez les hôtes susceptibles. Une souche de bactérie *Klebsiella* peut être isolée d'une autre maladie intestinale courante, la colite ulcéreuse. La transplantation de cette souche de bactéries dans des souris sans germes peut entraîner une réponse immunitaire et une accumulation de cellules Th1. Les résultats du séquençage ont révélé que *Klebsiella* chez les patients atteints de la maladie de Crohn augmentait de manière significative et que les gènes liés à *Klebsiella* s'enrichissaient dans le microbiote intestinal chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (481).

Bien que de nombreuses études aient confirmé la corrélation étroite entre le microbiote oral et les maladies digestives, la distance physiologique entre la cavité orale et le système digestif ne peut être ignorée. Trois manières sont décrites pour expliquer le parcours du microbiote oral dans les organes du système digestif. Tout d'abord, le microbiote oral envahit directement le tractus intestinal par l'œsophage, provoquant un déséquilibre de la micro-écologie intestinale et affectant le système digestif (482–484). Ensuite, les micro-organismes oraux, en particulier les bactéries pathogènes de la MP, peuvent pénétrer dans la circulation systémique *via* le sang, agissant ainsi sur tout le corps. Par exemple, dans le cas du cancer colorectal, *F. nucleatum* diffuse *via* la circulation sanguine pour exercer son action pathogène au niveau du tractus colorectal (485). Enfin, les métabolites du microbiote oral pénètrent dans la circulation sanguine et la circulation systémique, de sorte que le corps humain soit dans un état inflammatoire de faible intensité provoquant diverses maladies chroniques du système digestif. Bien que cette dernière explication ne soit actuellement

pas étayée par des preuves directes d'études microbiologiques par voie orale, elle a été confirmée par des études sur le déséquilibre du microbiote intestinal conduisant à une maladie systémique. Par conséquent, cette voie peut également constituer un moyen important pour le microbiote oral d'agir sur les maladies de l'appareil digestif (486–488). Plusieurs auteurs ont montré que *P. gingivalis* peut être transféré de la bouche à l'intestin dans de nombreuses maladies, telles que le cancer du côlon, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et le diabète. Ce micro-organisme induit une dysbiose en altérant les défenses innées de l'hôte et en favorisant les réponses inflammatoires dans les cellules phagocytaires (489–491).

3. Diffusion par voie respiratoire

La voie respiratoire est une voie qui reste encore peu étudiée. Scannapieco a proposé plusieurs mécanismes pour expliquer le rôle potentiel des bactéries orales dans la pathogenèse des infections respiratoires : l'aspiration d'agents pathogènes oraux (tels que *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* etc.) dans les poumons provoque une infection, les enzymes salivaires associées à la MP modifient les surfaces des muqueuses favorisant l'adhésion et la colonisation par des agents pathogènes respiratoires, qui sont ensuite aspirés dans les poumons, les enzymes salivaires associées aux MP détruisent les pellicules salivaires et empêchent ainsi l'élimination des bactéries pathogènes de la surface des muqueuses, les cytokines provenant de tissus parodontaux modifient l'épithélium respiratoire pour favoriser l'infection par des agents pathogènes respiratoires (492).

a. Aspiration de pathogènes oraux

La cavité orale est un important réservoir d'agents pathogènes bactériens responsables de maladies pulmonaires. Terpenning et *al.* ont indiqué que l'incidence de la colonisation oropharyngée par un agent pathogène respiratoire semble être plus fréquente chez les patients non édentés ou porteurs de prothèses que chez les patients édentés qui ne portent pas de prothèse dentaire (493). Une salivation réduite et un pH salivaire anormal peuvent favoriser la colonisation par des agents pathogènes respiratoires. La colonisation orale par des agents pathogènes respiratoires est fréquente chez les patients en établissement, en particulier ceux admis dans les Unités de Soins Intensifs (USI) et chez les personnes âgées affaiblies ou hospitalisées (493).

b. Modification des surfaces muqueuses par des enzymes salivaires associées à la maladie parodontale

Woods *et al.* ont rapporté que des agents pathogènes respiratoires tels que *P. aeruginosa* adhèrent mieux aux cellules épithéliales orales chez des patients colonisés par des agents pathogènes respiratoires plutôt que chez des patients non colonisés (494). Le traitement à la trypsine des cellules épithéliales de patients non colonisés *in vitro* a entraîné une augmentation de l'adhésion des agents pathogènes respiratoires. Cela suggère qu'une altération de la muqueuse favorise une meilleure adhérence de ces bactéries. Cette altération peut être la perte de fibronectine (par exposition à des protéases) de la surface des cellules épithéliales, ce qui entraînerait le masquage des récepteurs de la surface des muqueuses pour les adhésines d'agents pathogènes respiratoires.

c. La destruction de pellicule salivaire protectrice par des bactéries orales

Les sujets ayant une mauvaise hygiène orale peuvent avoir des niveaux élevés d'enzymes hydrolytiques (par exemple, la sialidase) dans leur salive. Ces enzymes peuvent agir sur les mucines afin de réduire leur capacité à se lier et à les éliminer des agents pathogènes tels que *H. influenza*. Inversement, les enzymes peuvent agir sur l'épithélium respiratoire pour moduler l'adhésion de ces agents pathogènes à la surface de la muqueuse (448).

d. Altérations de l'épithélium respiratoire par les cytokines

Wilson *et al.* ont démontré que les pathogènes oraux stimulent en permanence les cellules du parodonte (cellules de l'épithélium, cellules endothéliales, fibroblastes, macrophages et globules blancs) afin de libérer une grande variété de cytokines et d'autres molécules biologiquement actives. Ce sont l'interleukine (IL) -1 α , l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α (495).

Les bactéries orales présentes dans les sécrétions rencontrent les surfaces épithéliales respiratoires et peuvent adhérer à la surface des muqueuses. Ces bactéries fixées peuvent alors stimuler la production de cytokines par l'épithélium muqueux. Les cytokines provenant des tissus buccaux, qui sortent du sillon gingival vont être mélangées à la salive entière, et pouvoir contaminer l'épithélium respiratoire distal afin de stimuler les cellules épithéliales respiratoires. Ces cellules stimulées peuvent alors libérer d'autres cytokines qui recrutent des cellules inflammatoires sur le site. Ces cellules inflammatoires peuvent libérer des enzymes hydrolytiques et d'autres molécules modificatrices, entraînant un épithélium endommagé qui pourrait être plus susceptible à la colonisation par des agents pathogènes respiratoires (492).

IV. PRINCIPALES MALADIES SYSTEMIQUES EN LIEN AVEC LES PATHOLOGIES ORALES (ARTICLE 1)

Le microbiote oral est un facteur clé de la protection contre la colonisation d'agents pathogènes extrinsèques pouvant avoir une incidence sur la santé systémique. Le déséquilibre de l'écosystème pose un problème de santé orale et de santé systémique. En effet, la dysbiose de l'écosystème oral est associée à des troubles systémiques. Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs MNT présentent des facteurs de risques communs avec les MP. Dans un premier article nous nous sommes focalisés sur l'analyse des bactéries orales retrouvées dans les cinq principales MNT. D'autres pathologies telles que les complications de la grossesse, la maladie d'Alzheimer, le lupus érythémateux etc. seraient aussi en lien avec le microbiote oral (Figure 12)(496–501).

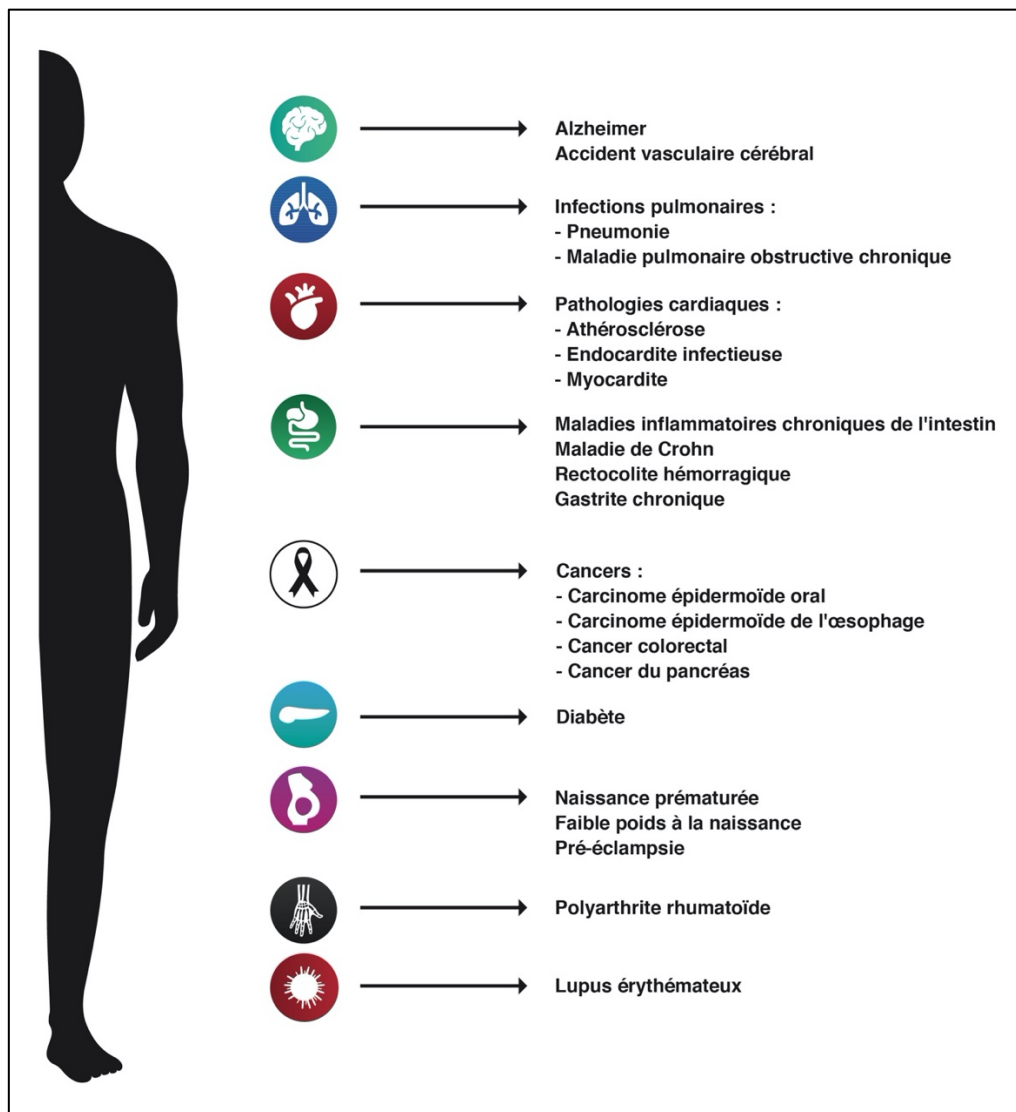


Figure 12. Différentes pathologies systémiques en lien avec des pathologies orales.

Le microbiote oral présent dans diverses pathologies bucco-dentaires va pouvoir diffuser dans l'organisme et ainsi se retrouver impliquer dans diverses pathologies systémiques. Les agents pathogènes oraux peuvent être des facteurs de risques, des facteurs d'aggravation voir des facteurs déclencheurs de certaines maladies systémiques.

ARTICLE 1 - Les parodontopathogènes comme facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, du diabète, de l'arthrite rhumatoïde, du cancer et de la maladie pulmonaire obstructive chronique

Les maladies cardiovasculaires, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, le diabète, la polyarthrite rhumatoïde et le cancer sont les MNT les plus courantes. Ces MNT partagent des facteurs de risque avec la MP, un facteur de risque évitable lié au mode de vie. La discussion concernant l'association entre ces maladies chroniques est plus complexe. Il existe encore un déficit de connaissances important, en particulier en ce qui concerne la relation de cause à effet entre la MP et les MNT. Dans cet article, nous présentons les connaissances fondamentales sur les mécanismes et les rôles des bactéries parodontales présumées afin de rassembler plusieurs hypothèses, preuve que les études cliniques n'ont pas produit jusqu'à présent. Bien que les hypothèses de causalité ne soient pas encore clairement établies sur une base biologique, des mesures de prévention et de prophylaxie sont recommandées pour éviter même la possibilité de tels facteurs de risque potentiels.



Review

Periodontal Pathogens as Risk Factors of Cardiovascular Diseases, Diabetes, Rheumatoid Arthritis, Cancer, and Chronic Obstructive Pulmonary Disease—Is There Cause for Consideration?

Denis Bourgeois ^{1,†} , Camille Inquimbert ^{1,2,†}, Livia Ottolenghi ³ and Florence Carrouel ^{1,*}

¹ Laboratory “Systemic Health Care”, EA4129, University Claude Bernard Lyon 1, University of Lyon, 69008 Lyon, France; denis.bourgeois69@orange.fr (D.B.); camille.inquimbert@gmail.com (C.I.)

² Department of Public Health, Faculty of Dental Medicine, University of Montpellier, 34080 Montpellier, France

³ Department of Oral and Maxillo-facial Sciences, Sapienza University of Rome, 00185 Rome, Italy; livia.ottolenghi@uniroma1.it

* Correspondence: florence.carrouel@univ-lyon1.fr; Tel.: +33-4-78-78-57-44

† These authors contributed equally to this work.

Received: 11 September 2019; Accepted: 1 October 2019; Published: 9 October 2019



Abstract: Cardiovascular diseases, chronic obstructive pulmonary diseases, diabetes, rheumatoid arthritis, and cancer are the most common noncommunicable diseases (NCDs). These NCDs share risk factors with periodontal disease (PD), a preventable risk factor linked to lifestyle. The discussion regarding the association between these chronic diseases is more complex. There is still a significant knowledge gap particularly of the causal relationship between PD and NCDs. In this paper, we present fundamental knowledge of the mechanisms and roles of putative periodontal bacteria to gather several hypotheses, evidence that clinical studies thus far have not produced. Although the causal hypotheses are not yet clearly established on a biological basis, prevention and prophylactic measures are recommended to prevent even the possibility of such potential risk factors.

Keywords: noncommunicable disease; periodontal disease; periodontal bacteria; cancer; cardiovascular diseases; diabetes; pulmonary diseases; rheumatoid arthritis

1. Introduction

The Sixtieth World Health Assembly (WHA60.17) highlighted in 2007 the link between oral health, general health and the quality of life. It explained that the prevention and treatment of chronic diseases requires the establishment of prevention programs for oral disease and oral health promotion [1]. This assembly, with the support of the World Dental Federation, advocated for member states to introduce rules promoting oral health directly into their policies for the treatment and prevention of chronic noncommunicable and communicable diseases [2–4].

Cardiovascular diseases, chronic obstructive pulmonary diseases, rheumatoid arthritis, diabetes, and cancer are the most common noncommunicable diseases (NCDs). These NCDs and periodontal disease (PD) have identical but preventable risk factors linked to lifestyle [5]. Thus, the link between several oral diseases and NCDs is due to the fact that these diseases share risk factors [6]. Many general pathologies are characterized by oral manifestations, which increases the risk of oral pathology. Conversely, oral diseases are a risk factor for general pathologies. This approach, based on common determinants, has received significant support from research and evidence-based approaches. If the concept of common risk factors is indisputable, the interrelationship between oral diseases and NCDs is proven by evidence [7].

The oral cavity of humans contains more than 700 bacterial species that are able to penetrate the digestive and respiratory tracts [8]. The oral microbiota is a key factor in the protection against the colonization of extrinsic pathogens that could impact systemic health [9]. However, the imbalance of the ecosystem, which can be caused by a weak immune system, leads to a challenge for oral and systemic health. The ecological conditions of these habitats are constantly changing, so ecosystems are subject to frequent variations.

The oral microbiome is a key factor in health or disease [10]. Its modification contributes to oral and systematic diseases [11]. Moreover, dysbiosis of the oral ecosystem is associated with systemic diseases, such as cardiovascular diseases, cancers, and diabetes [12].

A systematic literature search was conducted, fulfilling PRISMA criteria (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-analyses). Electronic research was organized in Pubmed, Embase, and Cochrane databases. No language filters were implemented. The research was performed from 2000 to April 2019. The following MeSH and non-MeSH search terms were used in order to encompass every type of periodontal pathogens and cardiovascular diseases, diabetes, rheumatoid arthritis, cancer, and chronic obstructive pulmonary disease: (“periodontitis”[MeSH Terms] OR “periodontitis”[All Fields]) AND (“Pathogens”[Journal] OR “pathogens”[All Fields]) AND (“diabetes mellitus”[MeSH Terms] OR (“diabetes”[All Fields] AND “mellitus”[All Fields]) OR “diabetes mellitus”[All Fields] OR “diabetes”[All Fields] OR “diabetes insipidus”[MeSH Terms] OR (“diabetes”[All Fields] AND “insipidus”[All Fields]) OR “diabetes insipidus”[All Fields]) AND (“cardiovascular diseases”[MeSH Terms] OR (“cardiovascular”[All Fields] AND “diseases”[All Fields]) OR “cardiovascular diseases”[All Fields]) AND (“arthritis, rheumatoid”[MeSH Terms] OR (“arthritis”[All Fields] AND “rheumatoid”[All Fields]) OR “rheumatoid arthritis”[All Fields] OR (“rheumatoid”[All Fields] AND “arthritis”[All Fields])) AND (“neoplasms”[MeSH Terms] OR “neoplasms”[All Fields] OR “cancer”[All Fields]) AND (“pulmonary disease, chronic obstructive”[MeSH Terms] OR (“pulmonary”[All Fields] AND “disease”[All Fields] AND “chronic”[All Fields] AND “obstructive”[All Fields]) OR “chronic obstructive pulmonary disease”[All Fields] OR (“chronic”[All Fields] AND “obstructive”[All Fields] AND “pulmonary”[All Fields] AND “disease”[All Fields])). The selection procedure was performed by two reviewers, who evaluated the titles and abstracts of the articles identified in the electronic databases. Finally, 98 studies were included in this review.

In this review, fundamental knowledge of the mechanisms and roles of putative periodontal bacteria on the potential development of the five main noncommunicable diseases—cancer, cardiovascular diseases, diabetes, pulmonary diseases, rheumatoid arthritis—are presented.

2. Periodontal Disease

Periodontal disease (PD), classified by the World Health Organization (WHO) as a noncommunicable disease (ICD-10, K.053), is a microbe-induced inflammatory and multifactorial chronic immunologic disease [13]. Periodontitis is a polymicrobial infection due to an increase in pathobionts within the microbiota [14]. The initially synergistic microbiota gradually becomes dysbiotic [15]. Bacterial accumulation around the tooth on gingival or subgingival level gives rise to an inflammatory response in the tissues surrounding the teeth. The inflammation of the gum leads to the destruction of the alveolar bone and loss of gingival attachment to the teeth. PD is a progressive disease that ranges from gingivitis (reversible inflammation) to periodontitis (irreversible inflammation). The evolution of PD is correlated with several modifiable and unmodifiable risk factors [16]. PD has been the subject of many studies for many years within the scientific community that aimed to identify the links that may exist among systemic diseases [17]. Several bacterial species associated with periodontitis have been suggested to be involved in the pathogenesis of some systemic diseases [18]. However, because of the complexity of these periodontal-systemic associations and conflicting scientific reports, most of the associations remain speculative [19].

Periodontopathogenic bacteria according to their pathogenicity and properties are organized into complexes that are closely interrelated [20]. The bacteria from the green, purple, and yellow

complexes are named “early colonizers” because they are able to adhere to the pellicle. The orange complex comprises putative periodontal pathogens, such as *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), that generally appear after the early colonizers are established [21]. These bacteria, classified as moderately pathogenic, associate with other periodontal bacteria to form the basis for the colonization of the sulcus. The highly pathogenic bacteria of the red complex, which include *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Treponema denticola* (*T. denticola*), and *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), are the most important pathogens in adult PD [22]. The recent “Keystone-Pathogen Hypothesis” (KPH) considers that certain bacteria in low quantities, such as *P. gingivalis*, can act on the host immune system and convert the microbiota from symbiotic to dysbiotic to provoke inflammatory disease [16]. The host immune system could be modified. In fact, *P. gingivalis* could act on the immune system of the host in three different ways. This pathogen may alter the Toll-like receptor (TLR) response, subvert interleukin-8 (IL-8), or alter the complement system [23,24]. First, during inflammatory process, *P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS) expression increases which reduces the TLR4 response and could facilitate survival and multiplication of the entire microbial community [25]. Then, *P. gingivalis* can block production of IL-8, which is produced by gingival epithelial cells in response to other bacteria, by secreting a serine phosphatase that inhibits the synthesis of IL-8 [26]. This process delays the recruitment of neutrophils and could facilitate initial microbial colonization of the periodontium [27]. Other bacteria from the red complex such as *T. denticola*, are also able to manipulate the IL-8 response of the host [28]. Finally, *P. gingivalis* is able to avoid complement-mediated detection by producing gingipains (membrane bound and soluble arginine-specific cysteine proteinases). Gingipains cleave complement factors C3 and C5 into active fragments C5a (cell activator) and C3b (phagocytosis enhancer) and degrade them [29]. The increasing of C5a leads to an increased activation of the C5a receptor on leukocytes [29]. C5a receptor is involved in crosstalk with TLR2, which is activated in parallel by *P. gingivalis* surface ligands. While this crosstalk leads to increased inflammation, it impairs the killing capacity for leukocytes [30].

The pathogenicity of these bacteria is significantly increased following the production of various enzymes and toxins. The attachment loss and an increase in pocket depth are due to bacteria belonging to the orange complex. Through their metabolism, these bacteria also create living conditions for red complex bacteria that are strict anaerobes and thus allow them to colonize the sulcus. The presence of bacteria from the red complex and the *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) complex is the witness of the final colonization phase. The pathogenesis of PD results from the complex interaction between periodontal pathogens and the host immune response, controlled by environmental and genetic factors. Another concept named the “ecological plaque hypothesis” considers that groups of bacteria, such as the bacteria from the red complex, can create an ecosystem capable of inducing periodontal disease [31]. The pathogenesis of PD could be the result of a dysbiosis in the microbiota caused by ecological stress due to the enrichment of several pathogens [30].

Therefore, the inflammation and tissue destruction in the case of periodontitis is not only due to the presence of some periodontopathogens such as bacteria from the red complex but to the dysbiosis of the oral microbiota that they induce [32].

3. The Invasion Process by Periodontal Bacteria

Oral bacteria, bacterial products, and inflammatory molecules can invade the human body in two main ways: (i) the bloodstream or (ii) the digestive tract (Figure 1).

First, bloodstream invasion is possible because anatomically, the periodontal pockets are close to the bloodstream. Their contents (periodontal bacteria, bacterial products, immunocomplexes, and mediators of inflammation) will therefore be able to diffuse and reach different sites of the human body [33]. Periodontal pathogenic bacteria that have the property of being mobile will be able to migrate and invade the epithelium and then the connective tissue [34] before reaching the bloodstream. In patients with periodontitis, gingival ulceration is the major cause of bacteremia. Bacterial products such as exotoxins and endotoxins are also able to reach the bloodstream and thus diffuse to exert

their toxicity at a distance. Thus, endotoxins are lipopolysaccharides of the outer membrane of Gram-negative bacterial cells responsible for numerous pathologies [35]. Pro-inflammatory molecules such as interleukin (IL) 1 β , IL-6, or tumor necrosis factor (TNF) will reach the systemic circulation, triggering a response in other tissues such as the liver [36].

Finally, by alimentary dissemination, oral bacteria, bacterial products, and inflammatory molecules, reach the digestive tract including the stomach. During digestion, the oral bacteria will migrate into the stomach. Only those that resist the acidic pH of the stomach will survive and multiply in the gastrointestinal tract [37,38]. Thus, the oral microbiota and the microbiota of the large intestine have similarities in 45% of subjects with PD [39]. Previous studies demonstrated that the modification of the oral microbiota due to oral disease is linked to the dysbiosis of the gut microbiota [40]. This correlation between the oral microbiota and the intestinal microbiota is due to daily activities (e.g., swallowing) that promote the transport of bacteria from the oral cavity to the gastrointestinal tract. However, the precise mechanism of invasion must be determined [41].

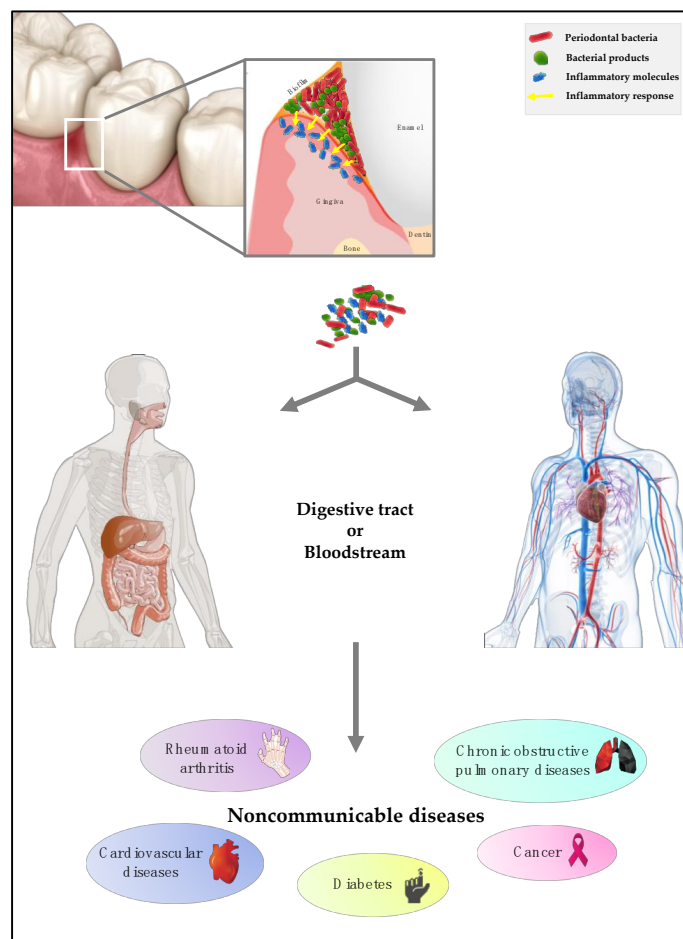


Figure 1. Process of invasion of the body by periodontal bacteria.

4. Periodontal Pathogens and Diabetes

Diabetes has a dual association with PD [42]. Identified as chronic pandemic diseases, PD and type 2 diabetes (T2DM) are also risk factors for cardiovascular complications [43]. The hypothesis of a causal relationship between the imbalance of the periodontal microbiota and the incidence of metabolism disease is advanced [44]. Periodontal infection and subsequent inflammation increase insulin resistance and negatively affect glycemic control. This is partly explained by the increase in the level of systemic pro-inflammatory mediators—cytokines in particular, which exacerbate insulin resistance—and by the chronic bacteremia that accompanies periodontitis. In the case of PD, several inflammatory molecules, such as IL-1 β , IL-6, IL-8, LPS, TNF- α , and prostaglandin (PG) E2, are liberated. These molecules are able to interact with free fatty acids, lipids, and advanced glycation end products, all of which are characteristic of diabetes. Thus, some intracellular pathways associated with insulin resistance are impacted, such as the I-kappa-B (I κ B), I-kappa-B kinase- β (IKK β), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and the protein c-Jun N-terminal kinase (JNK) axes. JNK promotes insulin resistance by phosphorylating serine residues in the insulin receptor substrate-1. The counter-regulatory phosphorylation of serine and threonine inhibits the insulin receptor signaling that normally occurs through a tyrosine kinase cascade. Concerning IKK β , the insulin resistance results from the activation of NF- κ B transcription. Activation of IKK β leads to the phosphorylation of I κ B, a cytosolic inhibitor of NF- κ B. Phosphorylation by IKK β targets I κ B α for proteasomal degradation, which liberates NF- κ B for translocation into the nucleus, where it initiates the transcription of various genes involved in insulin resistance, such as growth factors, cytokine genes (IL-1, IL-6, IL-8, and TNF- α), adhesion molecules, and proteins in the acute phase. The activation of these inflammatory pathways in hepatocytes, endothelium cells, immune cells (monocytes or macrophages), muscle cells, and adipocytes promotes and contributes to an increase in overall insulin resistance, which makes it difficult to perform metabolic regulation in individuals with both PD and T2DM [45].

The consequences of periodontal microbiota disbalance were also significant at the systemic level, with metabolic modifications connected to diabetes [46]. Additionally, a discordance in the microbial profile between chronic periodontitis patients with and without T2DM has been emphasized. The strength of evidence is robust for *T. forthysia*, which is related to being less frequent in the T2DM-PD group, followed by the lowest evidence for other pathogens such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis* [47] (Figure 2).

The role of oral bacteria in adiposity was also demonstrated. *Selenomonas noxia* (*S. noxia*) represented more than 1.05% of the total bacterial in 98.4% of overweight women [48]. *S. noxia* could be a predictive marker of obesity given its sensitivity and specificity. This leads to the relevant hypothesis of whether the bacteria of the oral sphere are implicated in the process that is likely to lead to obesity. The role of periodontopathogenic bacteria in this pathology is yet to be established. However, animal studies have demonstrated that the modification of the intestinal microbiota by taking specific nutrients, prebiotics, or natural antibiotics could modify satiety and insulin resistance and thus allow better control of diabetes [49,50].

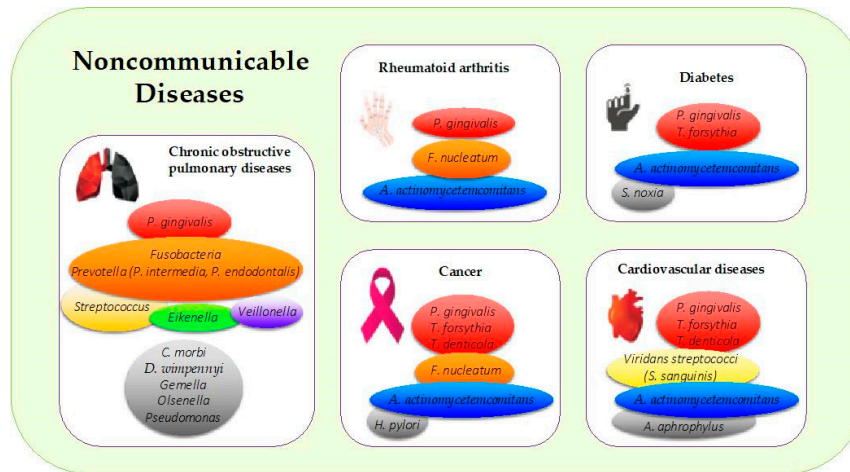


Figure 2. Periodontal pathogens implicated in the most common noncommunicable diseases. The colors in boxes refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, and (ii) other periodontal bacteria for the gray color. *A. actinomycetemcomitans*: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *C. morbi*: *Campylobacter morbi*; *D. wimpennyi*: *Dysgonomonas wimpennyi*; *F. nucleatum*: *Fusobacterium nucleatum*; *H. pylori*: *Helicobacter pylori*; *P. gingivalis*: *Porphyromonas gingivalis*; *S. noxia*: *Selenomonas noxia*; *S. sanguinis*: *Streptococcus sanguinis*; *T. denticola*: *Treponema denticola*; *T. forsythia*: *Tannerella forsythia*.

5. Periodontal Pathogens and Cardiovascular Diseases

The hypotheses from the literature strongly argue for an increased impact of long-term periodontitis on the main noncommunicable diseases.

Periodontal infections are strongly associated with the development of atherosclerosis [51]. The systemic inflammatory or immune response to periodontal infection may increase cardiovascular risk. Additionally, pathogens from the mouth can cross the gingival epithelio-conjunctive barrier as well as the vascular endothelium and enter atherosclerotic plaques via the bloodstream, which could promote an inflammatory or immune response within the atherosclerotic plaque [52].

According to Aarabi and colleagues, four different mechanisms could explain the link between oral disease and the pathological process of atherosclerosis. First, an oral bacterium reaches the bloodstream following bacteremia. Second, during an oral disease, mediators of inflammation are released and can enter the bloodstream. Third, following exposure to components of oral pathogenic bacteria, an autoimmune reaction against host proteins occurs. Finally, some oral pathogens produce toxins with pro-atherogenic action [53].

P. gingivalis can intensify atherosclerosis after oral-hematogenous spread due to bacteremia. In its presence, endothelial cells activate certain adhesion molecules, thus increasing the likelihood of macrophage diapedesis and the subsequent conversion to foam cells and further atheroma progression. PGE₂, TNF- α , and IL-1 β produced locally at the periodontal pockets in response to PD bacteria will end up in the bloodstream, causing a disproportionate increase in the local tissue innate immune response. However, the mechanism of the active invasion of endothelial cells by *P. gingivalis*, likely to adjust the inflammatory response of these cells, remains unclear [54,55].

The association of coronary heart disease and PD may be due to a trait underlying response, which puts a person at high risk of codeveloping periodontal diseases and coronary artery disease. Once established, PD provides a bioburden of endotoxin (lipopolysaccharide) and inflammatory cytokines, especially thromboxane A₂, PGE₂, IL-1 α , and TNF- β , which serve to initiate and exacerbate

atherogenesis and thromboembolic events [56]. In atherosclerotic plaques, various periodontal bacteria have been identified [57]. Moreover, in mouse models, *P. gingivalis* increases the progression of inflammatory plaque accumulation in the innominate arteries with the accumulation of inflammatory mediators and cholesterol esters [58]. Serum IgA antibodies to *P. gingivalis* are significantly higher in Chinese patients with myocardial infarct [59].

PD is correlated with an increased risk of future myocardial infarction. However, a recent meta-analysis from observational studies could not establish a causative relationship between PD and myocardial infarction. Additional investigations are recommended [60]. Analysis of thrombi collected by aspiration during interventions on the coronary arteries of patients who had a myocardial infarction showed 19.7% *A. actinomycetemcomitans*, 3.4% *P. gingivalis*, and 2.3% *T. denticola* [61]. Antibody levels against four major periodontal pathogens, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*, and *T. denticola*, are related to an increased relative risk of myocardial infarction [62] (Figure 2). Other studies highlight the important role of oral *Viridans streptococci* in the development of myocardial infarction [63–65].

Infection with *P. gingivalis* after myocardial infarction in mice enhanced myocardial high mobility group box 1 (HMGB1) expression. HMGB1 is a nuclear protein released from necrotic cells and capable of inducing the inflammatory response. There is a possible relationship between PD and postinfarction myocardial inflammation through HMGB-1 [66].

Infection with *P. gingivalis* during myocardial infarction generates a prejudicial part in the recuperation procedure of the infarcted myocardium by penetration and invasion of *P. gingivalis* into the myocardium, thus favoring programmed cell death and the matrix metalloproteinase (MMP) 9 action of the myocardium, which successively produces cardiac rupture [67].

Clinical studies particularly suggest a direct relationship between the severity of periodontal conditions and left ventricular hypertrophy. In animal transverse aortic constriction models, *A. actinomycetemcomitans*, a Gram-negative bacterium that is considered an etiologic agent in endocarditis, clearly improved cardiac hypertrophy with matrix MMP-2 activation [68].

Control of chronic inflammation caused by periodontitis may positively impact the treatment of myocardial hypertrophy, decreasing the risk of acute myocardial infarction [69].

The risk of stroke, described by a meta-analysis of cohort studies, was significantly increased by the presence of periodontitis [70]. PD was significantly correlated with cardioembolic and thrombotic stroke subtypes. Regular dental care utilization was associated with a lower adjusted stroke risk [71]. Pussinen and colleagues have established that *P. gingivalis*, a Gram-negative anaerobic bacterium, may especially be correlated with stroke [72].

Experimental rats with periodontitis and stroke may have impaired endothelial function in gingival tissues. These studies show that the disruption of vascular function in oral microcirculation may be generated by the fundamental interaction between the oxidative stress induced by PD and nitric oxide, similar to the interactions existing in stroke cases [73]. Reducing the risk of stroke therefore requires the management of PD. It also involves daily individual prophylaxis of oral health, whose purpose is the disruption and removal of the biofilm. It is necessary to control the risk of chronic inflammation, which can lead to tragic consequences such as stroke [74]. These are arguments, as recommended by the WHO, for developing intersectoral approaches to chronic disease control in an alliance of general practitioners, dentists, nurses, and specialists [75].

A. actinomycetemcomitans and *Aggregatibacter aphrophilus* belong to the HACEK (*Haemophilus*, *Aggregatibacter*, *Cardiobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*) group of Gram-negative bacteria, a recognized cause of infective endocarditis (Figure 2). HACEK organisms are a part of the normal microbiota of the oral and upper respiratory tract in humans. However, these bacteria are implicated in 1% to 3% of all infective endocarditis [76]. *A. actinomycetemcomitans* is also implicated in the etiology of aggressive periodontitis and generates many virulence factors, such as leukotoxin (repeats-in-toxin protein), which kills human immune cells [77,78].

Streptococcus sanguinis (*S. sanguinis*), a commensal bacterium, profuse in periodontitis, is recognized as an origin of infective endocarditis [79]. Its fimbriae and adhesin facilitate its initial attachment on the tooth. Then, the production of glucans and eDNA promotes the maturation of *S. sanguinis* biofilm. After accessing the heart, *S. sanguinis* must then adhere to the endocardium. Considering the impact of biofilm formation on adhesion in the oral cavity, it would be conceivable that biofilm formation might be significant for adhesion to endocardial surfaces as well. Indeed, endocarditis is frequently regarded as a model of a biofilm-mediated disease [80,81]. However, studies have demonstrated that *S. sanguinis* endocarditis causation is not dependent upon biofilm formation [79]. Therefore, in contrast to this situation in the oral cavity, there is as yet no evidence that biofilm formation is important for *S. sanguinis* in the cardiac environment in relation to infective endocarditis [79].

6. Periodontal Pathogens and Chronic Obstructive Pulmonary Disease

While respiratory diseases are among the leading causes of death in the world, tobacco is the major risk factor [82]. Nearly half of all chronic obstructive pulmonary disease (COPD) deaths are attributable to smoking; 80–90 % of cases of COPD can be avoided by refusing tobacco [83,84]. Periodontal pathogens and inflammatory cytokines can generate systemic inflammation, which can take part in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [85]. There are similarities in the disease mechanisms—sustained neutrophil inflammation, dysfunctional neutrophil behaviors, and connective tissue loss—that imply a common pathophysiology and confirms the association in clinical evidence that resulted from the meta-analyses [86].

The processes that are suggested to associate periodontal diseases and COPD include the overspill of topically generated inflammatory mediators into the systemic circulation or bacteremia of oral or pulmonary origin that accelerates acute response, mechanical aspiration of oral content in the tree respiratory, and reactive oxygen species and cytokines released by systemic neutrophils at distant sites [85]. Oral symbiosis requires professional management and regular visits to reduce the virulent bacterial load, and consequently, a reduction in the incidence or severity of the COPD occurs. Daily individual oral hygiene is a major factor that decreases the risk of disease among subjects with respiratory illness [87].

The PD and COPD association do not necessarily require bacterial aspiration through the respiratory tract. Local cytokines and other active molecules produced by periodontal inflammation penetrate into the systemic circulation. The endothelium and circulating immune cells are thus activated. Both contribute to the inflammatory burden by the liberation of activated and destructive mediators. This process also takes place in the lungs, initiating pulmonary inflammation. Periodontal bacteria move in gingival vasculature via micro-ulcerations in the epithelium, permitting hematogenous dispersion of bacteria and inflammatory mediators [88].

Among the oral bacterial species involved in bronchopulmonary pathologies, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Gemella*, *Porphyromonas*, *Olsenella*, and *Eikenella* were found [89] (Figure 2). Identified in several studies, *Fusobacteria*, *Pseudomonas*, *Prevotella*, and *Streptococcus* make up the pulmonary microbiome of COPD [90] (Figure 2). Both chronic periodontitis and COPD are associated with an increase in *P. intermedia*, *Catonella morbi*, *Dysgonomonas wimpennyi*, and *Porphyromonas endodontalis* as well in the genera *Dysgonomonas*, *Desulfobulbus*, and *Catonellas*. Thus, active care of periodontitis, with the goal of reducing virulent bacteria, should have a direct impact and benefit on COPD subjects. However, more longitudinal studies are required to validate this hypothesis [91].

7. Periodontal Pathogens and Rheumatoid Arthritis

Strong epidemiological, serological, and clinical associations have been observed between rheumatoid arthritis (RA) and periodontitis [92]. The presence of PD might contribute to the progression of RA, while RA might have little effect on accelerating the development of PD. RA and periodontitis share many common pathological features, such as chronic inflammation induced by pro-inflammatory cytokines, connective tissue breakdown, and bone erosion [93]. Mutual in both

diseases, there is a growing diversity of MMPs and cytokines. However, despite this evidence showing a link between rheumatoid arthritis and periodontitis, the exact mechanisms involving this association have not been fully elucidated [94].

The periodontal pathogen *A. actinomycetemcomitans* has been recognized as a bacterial trigger for RA, providing a link between autoimmunity and periodontal diseases. Indeed, the oral pathogens may trigger the production of disease-specific autoantibodies and arthritis in susceptible individuals. Periodontitis is characterized by the presence of citrullinated autoantigens that are primary immune targets in RA. *A. actinomycetemcomitans* provokes activation of the citrullinating-enzyme process in neutrophils and thus autoantigen output [95,96].

Most of the studies have shown the presence of oral bacteria in patients with RA, highlighting *P. gingivalis* and *F. nucleatum* [97] (Figure 2). Some periodontal pathogens, such as *A. actinomycetemcomitans* and *P. gingivalis*, may take part in RA autoantibody production through direct posttranslational alteration of proteins or indirectly through impacting neutrophil-mediated neo-epitope generation. *P. gingivalis* is often found in the synovial joints of RA. *F. nucleatum* has been detected in synovial fluid and in plaque samples of patients with joint pathologies [98]. Periodontal bacteria that overrun the bloodstream may also take part in chronic inflammatory reactions and the production of antibodies [99].

Hypotheses have suggested that chronic periodontitis generates local and constant high levels of microparticles that spread into the bloodstream and are considered inflammatory biomarkers or mediators responsible for distant cell signaling and regulation [100]. It could establish a demonstration of the increased risk for chronic disease in adults with PD [51]. It is now validated that the association between infectious pathogens and autoimmune arthritis is more complicated than the one pathogen-one disease process that consolidates the conceptual frame for Koch's postulates. Immuno-pathological similarities between these two conditions induce a greater risk for patients with periodontitis to develop RA [101,102].

A better quality of life for patients with RA requires consideration of the inflammatory process of periodontal disease with care to prevent, reduce, or cure periodontitis [103,104]. Reduced systemic inflammation might contribute to a better clinical outcome of RA [93].

8. Periodontal Pathogens and Cancer

The human microbiota may play a role in carcinogenesis. At this time, biological hypotheses and animal and human studies data corroborate the significant associations between PD and pancreatic, neck, and head cancers and the risk of lung cancer [105]. Large cohort studies validated by meta-analyses confirm the evidence of some positive associations between PD and total cancer risk, particularly for head and neck, pancreas, and lung cancers. Unfortunately, the dispersion of the clinical parameters used for the definition of periodontitis and the difficulties of adjustment for smoking status, lacking in some studies, penalize the impact of the results of eligible studies for meta-analyses [105].

The biological hypothesis for the relationship between PD and carcinogenesis includes chronic inflammation, attendance of periodontal pathogens, and a reservoir for potential carcinogenic factors (e.g., Human papillomavirus). As specified by Mantovani and colleagues, nonsteroidal anti-inflammatory medication decreases the incidence of certain cancer categories while reducing mortality [106]. Furthermore, in experimental animal models, inflammatory cells, cytokines, and chemokines are present in the microenvironment of all tumors, and in humans, inflammatory cells, cytokines, and chemokines are present from the early stages of tumor development; the overexpression of inflammatory cytokines may promote tumor development.

Smoking and alcohol consumption, which are clearly identified risk factors, can be considered classic confounders. However, after adjustment, the association of causality between periodontitis and the risk of oral cancers and/or oropharynx remains significant [93,107]. *P. gingivalis* infects the epithelium of the esophagus of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) subjects, which establishes a relationship between infection with *P. gingivalis* and the progression of ESCC and proposes that

P. gingivalis infection could be a biomarker for this disease [108]. In this context, the eradication of virulent periodontal bacteria, common to PD and ESCC, could probably contribute to reducing the global burden of these cancers [109].

The association between periodontitis and pancreatic cancer (PC) is well documented in the literature. These are targeted studies of periodontal bacteria that may play a key role in the pathogenesis of PC [110]. A current cohort survey, using direct bacterial DNA quantification from the saliva of subjects recovering years prior to diagnosis, identified associations between *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, and pancreatic cancer [111,112] (Figure 2). *F. nucleatum*, a member of the orange complex, has been associated in many studies with colorectal cancer [113]. However, it is uncertain whether this pathogen is identified at higher levels in the bowel as an outcome of periodontitis.

The dysbiosis of the periodontal microbiota is associated with several chronic diseases, such as gastrointestinal system diseases. Inflammatory bowel disease was one of the first to be highlighted. Scientific advances have increased the level of correlation evidence between PD and gastrointestinal cancers and liver cirrhosis [11]. The risk of developing precancerous gastric lesions is increased in the presence of potentially virulent periodontal factors and with the complex and diverse nature of the oral microbiota [114]. In periodontitis, significant levels of the colonization of pathogens, members of the red complex of Socransky, and *A. actinomycetemcomitans*, are correlated with an increased risk of gastric precancerous lesions. An increase in the DNA of selected bacteria (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*, and *A. actinomycetemcomitans*) is associated with increased levels of PD indices [115].

The most significant risk component of noncardiac gastric cancer, found in all other areas of the stomach other than the upper stomach, is *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), potentially present in the oral microbiome (e.g., saliva and dental plaque). The pathogen may be dissolved orally. The infection rate is essentially a function of hygiene condition as well as the degree of antibiotic use [116–119]. Initial results from clinical trials have shown that *H. pylori*-positive dyspeptic patients may benefit from periodontal therapy.

Knowledge of the processes of *H. pylori*-induced carcinogenesis remains limited, although inflammation is a frequently cited hypothesis. Inflammation could be responsible for cancer by increasing the production of free radicals, increasing apoptotic and necrotic epithelial cell death and augmenting cell proliferation [120]. With this hypothesis, the validation of a relationship between *H. pylori* and gastric cancer has led to a better understanding of the gastrointestinal microbiome and novel strategies for the prevention of individual gastric cancer [121]. *H. pylori* is closely associated with periodontitis with the potential to adhere to certain orange and red complex bacteria, such as *Fusobacterium* species (*F. nucleatum*), *P. gingivalis*, and *T. forsythia* [122,123]. As the amount of these pathogens is increased in periodontitis, it is more probable that mature biofilm may shelter *H. pylori* by interacting with these bacterial species [58].

The evidence of the existence of the same *H. pylori* strain in plaque and stomach samples may clarify the role of dental plaque as a sanctuary site for *H. pylori* and as a source of reinfection after eradication, which is more difficult to eradicate from plaque than from the stomach [124].

9. Conclusions

This paper alone cannot answer the question of the causal link between periodontal bacteria and the main noncommunicable diseases that are CVD, diabetes, RA, cancer, and COPD.

There is, however, some hypotheses that periodontal pathogens contribute to the increased risk of NCDs by marginalizing the impact of conventional risk factors such as tobacco use, alcohol, and physical inactivity. The effect of periodontal bacteria on NCDs briefly introduces the putative biological mechanisms involved. Virulent periodontal bacteria almost all have a role in pathogenesis. *P. gingivalis* is the typical example.

Some essential science of the processes and pivotal role of *P. gingivalis* incursion in arterial-cardiovascular disease and cardiovascular cells has been demonstrated. *S. sanguinis* is well known for its role in respiratory diseases and infective endocarditis. In addition, the potential interaction

mechanisms described in immunology and molecular biology argue in favor of a potential causality. It is well recognized that the homeostasis of oral microbiome communities is absolutely connected with health factors.

Is the systematic care management of periodontitis indicated to reduce the risk of NCDs? Yes, since by definition any management of PD must be beneficial. Then, there is a convergent web of scientific information in favor of a possible causality. The insufficiency of proof that the treatment of periodontal disease reduces the risk of major adverse NCD events is admissible. For this, large randomized clinical trials are needed. Why has this not been done for 20 years? How long should this be delayed? Between theory and practice, you have to decide. The decision maker must receive specific advice from the scientific community. It is up to us to assess the risk. It should not be neglected and taken into consideration. The insufficient evidence does not compensate for absence of evidence. The methodological difficulties related to the epidemiological study of cohorts, long term, strongly penalize the validation of hypotheses.

Although the association is not fully established and the biological mechanisms are not yet fully understood, there is an obligation of precautionary principles and preventive measures to reduce any potential risk factors. An integrated and collaborative approach to fight common risk factors, as recommended by the WHO, for periodontal disease and chronic diseases is justified. It is important to understand that PD is preventable. A potential gain in oral health from a reduction in a virulent bacterial load can have direct or indirect positive effects on general health and even prevent the possibility of such an association. At least establishing individual prophylaxis in adolescents and young adults, including interdental hygiene, to promote a symbiotic periodontal microbiota throughout their lives, as adequacy in their oral environments remains the highest priority.

Author Contributions: Conceptualization, D.B.; and F.C.; writing—original draft preparation, D.B.; writing—review and editing, C.I.; L.O.; and F.C.; supervision, F.C.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Petersen, P.E. World Health Organization global policy for improvement of oral health—World Health Assembly 2007. *Int. Dent. J.* **2008**, *58*, 115–121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Petersen, P.E. Global policy for improvement of oral health in the 21st century—Implications to oral health research of World Health Assembly 2007, World Health Organization. *Commun. Dent. Oral Epidemiol.* **2009**, *37*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. World Health Assembly, 69. *Prevention and Control of Noncommunicable Diseases: Responses to Specific Assignments in Preparation for the Third High-Level Meeting of the United Nations General Assembly on the Prevention and Control of Non-Communicable Diseases in 2018: Report by the Director-General*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016.
4. FDI World Dental Federation. World Health Assembly, 69—Prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Agenda Item: 12.4: Prevention and Control of Noncommunicable Diseases: Responses to Specific Assignments in Preparation for the Third High-Level Meeting of the United Nations General Assembly on the Prevention and Control of Noncommunicable Diseases in 2018. Available online: <https://www.fdiworlddental.org/resources/world-health-assembly-statements/wha69-prevention-and-control-of-noncommunicable-diseases> (accessed on 29 September 2019).
5. Kassier, S.M. Periodontal disease and non-communicable diseases. Strength of bidirectional associations. *South Afr. Dent. J.* **2016**, *71*, 404–409. [[CrossRef](#)]
6. Petersen, P.E.; Bourgeois, D.; Ogawa, H.; Estupinan-Day, S.; Ndiaye, C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Organ.* **2005**, *83*, 661–669. [[PubMed](#)]
7. Türp, J.C.; Spranger, H. Non-communicable disease and their significance for dental medicine. *Swiss Dent. J.* **2016**, *126*, 473–489. [[PubMed](#)]

8. Paster, B.J.; Olsen, I.; Aas, J.A.; Dewhirst, F.E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* **2006**, *42*, 80–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Arweiler, N.B.; Netuschilil, L. The Oral Microbiota. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *902*, 45–60. [[CrossRef](#)]
10. Sampaio-Maia, B.; Caldas, I.M.; Pereira, M.L.; Pérez-Mongioli, D.; Araujo, R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Adv. Appl. Microbiol.* **2016**, *97*, 171–210. [[CrossRef](#)]
11. Gao, L.; Xu, T.; Huang, G.; Jiang, S.; Gu, Y.; Chen, F. Oral microbiomes: More and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell* **2018**, *9*, 488–500. [[CrossRef](#)]
12. Zhang, Y.; Wang, X.; Li, H.; Ni, C.; Du, Z.; Yan, F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 883–893. [[CrossRef](#)]
13. Bartold, P.M.; Van Dyke, T.E. Periodontitis: A host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontology* **2013**, *62*, 203–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Costalonga, M.; Herzberg, M.C. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol. Lett.* **2014**, *162*, 22–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hajishengallis, G.; Darveau, R.P.; Curtis, M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 717–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. AlJehani, Y.A. Risk factors of periodontal disease: Review of the literature. *Int. J. Dent.* **2014**, *2014*, 182513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Linden, G.J.; Hersberg, M.C.; Working group 4 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and systemic diseases: A record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Periodontol.* **2013**, *84*, S20–S23. [[CrossRef](#)]
18. Holmstrup, P.; Damgaard, C.; Olsen, I.; Klinge, B.; Flyvbjerg, A.; Nielsen, C.H.; Hansen, P.R. Comorbidity of periodontal disease: Two sides of the same coin? An introduction for the clinician. *J. Oral Microbiol.* **2017**, *9*, 1332710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Nwhator, S.O.; Heikkinen, A.M.; Tervahartiala, T.; Giesemann, D.R.; Leppilahti, J.; Sorsa, T. aMMP-8 Oral Fluid PoC Test. In *Translational Oral Health Research*; Meurman, J.H., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 33–41.
20. Socransky, S.S.; Haffajee, A.D.; Cugini, M.A.; Smith, C.; Kent, R.L., Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **1998**, *25*, 134–144. [[CrossRef](#)]
21. Carrouel, F.; Viennot, S.; Santamaria, J.; Veber, P.; Bourgeois, D. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 840. [[CrossRef](#)]
22. Suzuki, N.; Yoneda, M.; Hirofuji, T. Mixed red-complex bacterial infection in periodontitis. *Int. J. Dent.* **2013**, *2013*, 587279. [[CrossRef](#)]
23. Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 3–11. [[CrossRef](#)]
24. Rosier, B.T.; De Jager, M.; Zaura, E.; Krom, B.P. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2014**, *4*, 92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Darveau, R.P. Periodontitis: A polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 481–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Hasegawa, Y.; Tribble, G.D.; Baker, H.V.; Mans, J.J.; Handfield, M.; Lamont, R.J. Role of *Porphyromonas gingivalis* SerB in gingival epithelial cell cytoskeletal remodeling and cytokine production. *Infect. Immun.* **2008**, *76*, 2420–2427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Darveau, R.P.; Belton, C.M.; Reife, R.A.; Lamont, R.J. Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 1660–1665. [[PubMed](#)]
28. Ji, S.; Kim, Y.; Min, B.M.; Han, S.H.; Choi, Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J. Periodontol. Res.* **2007**, *42*, 503–510. [[CrossRef](#)]
29. Hajishengallis, G.; Lamont, R.J. Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol. Oral Microbiol.* **2012**, *27*, 409–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Hussain, M.; Stover, C.M.; Dupont, A.P. *Gingivalis* in Periodontal Disease and Atherosclerosis—Scenes of Action for Antimicrobial Peptides and Complement. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 45. [[CrossRef](#)]

31. Hugues, F. Periodontium and Periodontal Disease. In *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, 1st ed.; Vishwakarma, A., Sharpe, P., Shi, S., Ramalingam, M., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2015; pp. 433–444.
32. Wang, G.P. Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Med.* **2015**, *7*, 40. [[CrossRef](#)]
33. Vieira Colombo, A.P.; Magalhães, C.B.; Hartenbach, F.A.R.R.; Martins do Souto, R.; Maciel da Silva-Boghossian, C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb. Pathog.* **2016**, *94*, 27–34. [[CrossRef](#)]
34. Popova, C.; Dosseva-Panova, V.; Panov, V. Microbiology of Periodontal Diseases. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2013**, *27*, 3754–3759. [[CrossRef](#)]
35. Li, X.; Kolltveit, K.M.; Tronstad, L.; Olsen, I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin. Microb. Rev.* **2000**, *13*, 547–558. [[CrossRef](#)]
36. Friedewald, V.E.; Komman, K.S.; Beck, J.D.; Genco, R.; Goldfine, A.; Libby, P.; Offenbacher, S.; Ridker, P.M.; Van Dike, T.E.; Roberts, W.C. The American Journal of Cardiology and Journal of Periodontology Editors' Consensus: Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **2009**, *104*, 59–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yang, J.; Zhang, Q.; Chen, M.; Wu, W.Z.; Wang, R.; Liu, C.J.; Li, B.; Shi, X.L.; Du, H.S.; Tan, H.B. Association Between *Helicobacter pylori* Infection and Risk of Periodontal Diseases in Han Chinese: A Case-Control Study. *Med. Sci. Monit.* **2016**, *22*, 121–126. [[CrossRef](#)]
38. Noshou, K.; Sukawa, Y.; Adachi, Y.; Ito, M.; Mitsuhashi, K.; Kurihara, H.; Kanno, S.; Yamamoto, I.; Ishigami, K.; Igarashi, H.; et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2016**, *22*, 557–566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Segata, N.; Haake, S.K.; Mannon, P.; Lemon, K.P.; Waldron, L.; Gevers, D.; Huuttenhower, C.; Izard, J. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* **2012**, *13*, 42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Singhal, S.; Dian, D.; Keshavarzian, A.; Fogg, L.; Fields, J.Z.; Farhadi, A. The Role of Oral Hygiene in Inflammatory Bowel Disease. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *56*, 170–175. [[CrossRef](#)]
41. Flynn, K.J.; Baxter, N.T.; Schloss, P.D. Metabolic and Community Synergy of Oral Bacteria in Colorectal Cancer. *MSphere* **2016**, *1*, e00102-16. [[CrossRef](#)]
42. Casanova, L.; Hughes, F.J.; Preshaw, P.M. Diabetes and periodontal disease: A two-way relationship. *Br. Dent. J.* **2014**, *217*, 433–437. [[CrossRef](#)]
43. Branchereau, M.; Reichardt, F.; Loubieres, P.; Marck, P.; Waget, A.; Azalbert, V.; Colom, A.; Padmanabhan, R.; Iacovoni, J.S.; Giry, A.; et al. Periodontal dysbiosis linked to periodontitis is associated with car-dimetabolic adaptation to high-fat diet in mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2016**, *310*, G1091–G1101. [[CrossRef](#)]
44. Burcelin, R.; Serino, M.; Chabo, C.; Blasco-Baque, V.; Amar, J. Gut microbiota and diabetes: From pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol.* **2011**, *48*, 257–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Tunes, R.S.; Foss-Freitas, M.C.; Nogueira-Filho, G.D.R. Impact of periodontitis on the diabetes-related inflammatory status. *J. Can. Dent. Assoc.* **2010**, *76*, a35.
46. Blasco-Baque, V.; Garidou, L.; Pomie, C.; Escoula, Q.; Loubieres, P.; Le Gall-David, S.; Lemaitre, M.; Nicolas, S.; Klopp, P.; Waget, A.; et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut* **2017**, *66*, 872–885. [[CrossRef](#)]
47. Liu, L.S.; Gkraniias, N.; Farias, B.; Spratt, D.; Donos, N. Differences in the subgingival microbial population of chronic periodontitis in subjects with and without type 2 diabetes mellitus—a systematic review. *Clin. Oral. Investig.* **2018**, *22*, 2743–2762. [[CrossRef](#)]
48. Saffi, M.A.; Furtado, M.V.; Polanczyk, C.A.; Montenegro, M.M.; Ribeiro, I.W.; Kampits, C.; Haas, A.N.; Rösing, C.K.; Rabelo-Silva, E.R. Relationship between vascular endothelium and periodontal disease in atherosclerotic lesions: Review article. *World J. Cardiol.* **2015**, *7*, 26–30. [[CrossRef](#)]
49. Gubern, C.; López-Bermejo, A.; Biarnés, J.; Vendrell, J.; Ricart, W.; Fernández-Real, J.M. Natural antibiotics and insulin sensitivity: The role of bactericidal/permeability-increasing protein. *Diabetes* **2006**, *55*, 216–224. [[CrossRef](#)]

50. Vrieze, A.; Holleman, F.; Zoetendal, E.G.; de Vos, W.M.; Hoekstra, J.B.; Nieuwdorp, M. The environment within: How gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia* **2010**, *53*, 606–613. [[CrossRef](#)]
51. Batista, R.M.; Rosetti, E.P.; Zandonade, E.; Roelke, L.H.; Vettore, M.V.; Oliveira, A.E. Association between periodontal disease and subclinical atherosclerosis: The ELSA-Brasil study. *Cad. Saude Publica* **2012**, *28*, 965–976. [[CrossRef](#)]
52. Stewart, R.; West, M. Increasing evidence for an association between periodontitis and cardiovascular disease. *Circulation* **2016**, *133*, 549–551. [[CrossRef](#)]
53. Aarabi, G.; Heydecke, G.; Seedorf, U. Roles of Oral Infections in the Pathomechanism of Atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1978. [[CrossRef](#)]
54. Chun, Y.H.; Chun, K.R.; Olguin, D.; Wang, H.L. Biological foundation for periodontitis as a potential risk factor for atherosclerosis. *J. Periodont. Res.* **2005**, *40*, 87–95. [[CrossRef](#)]
55. Khlgatian, M.; Nassar, H.; Chou, H.H.; Gibson, F.C.; Genco, C.A. Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in *Porphyromonas gingivalis*-infected endothelial cells. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 257–267. [[CrossRef](#)]
56. Brinson, C.W.; Lu, Z.; Li, Y.; Lopes-Virella, M.F.; Huang, Y. Lipopolysaccharide and IL-1 β coordinate a synergy on cytokine production by upregulating MyD88 expression in human gingival fibroblasts. *Mol. Immunol.* **2016**, *79*, 47–54. [[CrossRef](#)]
57. Fernandes, C.P.; Oliveira, F.A.; Silva, P.G.; Alves, A.P.; Mota, M.R.; Montenegro, R.C.; Burbano, R.M.; Seabra, A.D.; Lobo Filho, J.G.; Lima, D.L.; et al. Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. *Int. J. Cardiol.* **2014**, *174*, 710–712. [[CrossRef](#)]
58. Hayashi, C.; Viereck, J.; Hua, N.; Phinikaridou, A.; Madrigal, A.G.; Gibson, F.C.; Hamilton, J.A.; Genco, C.A. *Porphyromonas gingivalis* accelerates inflammatory atherosclerosis in the innominate artery of ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* **2011**, *215*, 52–59. [[CrossRef](#)]
59. Pussinen, P.J.; Alfthan, G.; Tuomilehto, J.; Asikainen, S.; Jousilahti, P. High serum antibody levels to *Porphyromonas gingivalis* predict myocardial infarction. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.* **2004**, *11*, 408–411. [[CrossRef](#)]
60. Xu, S.; Song, M.; Xiong, Y.; Liu, X.; He, Y.; Qin, Z. The association between periodontal disease and the risk of myocardial infarction: A pooled analysis of observational studies. *BMC Cardiovasc. Disord.* **2017**, *17*, 50. [[CrossRef](#)]
61. Ohki, T.; Itabashi, Y.; Kohno, T.; Yoshizawa, A.; Nishikubo, S.; Watanabe, S.; Yamane, G.; Ishihara, K. Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am. Heart J.* **2012**, *163*, 164–167. [[CrossRef](#)]
62. Lund Håheim, L.; Olsen, I.; Nafstad, P.; Schwarze, P.; Rønningen, K.S. Antibody levels to single bacteria or in combination evaluated against myocardial infarction. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 473–478. [[CrossRef](#)]
63. Pessi, T.; Karhunen, V.; Karjalainen, P.P.; Ylitalo, A.; Airaksinen, J.K.; Niemi, M.; Pietila, M.; Lounatmaa, K.; Haapaniemi, T.; Lehtimäki, T.; et al. Bacterial Signatures in Thrombus Aspirates of Patients with Myocardial Infarction Clinical Perspective. *Circulation* **2013**, *127*, 1219–1228. [[CrossRef](#)]
64. Ammirati, E.; Maseri, A. Letter by Ammirati and Maseri Regarding Article, “Bacterial Signatures in Thrombus Aspirates of Patients with Myocardial Infarction”. *Circulation* **2013**, *128*, e235. [[CrossRef](#)]
65. Pessi, T.; Karhunen, V.; Karjalainen, P.P.; Ylitalo, A.; Airaksinen, J.K.; Niemi, M.; Pietila, M.; Lounatmaa, K.; Haapaniemi, T.; Lehtimäki, T.; et al. Response to Letters Regarding Article, “Bacterial Signatures in Thrombus Aspirates of Patients with Myocardial Infarction”. *Circulation* **2013**, *128*, e237–e238. [[CrossRef](#)]
66. Srisuwantha, R.; Shiheido, Y.; Aoyama, N.; Sato, H.; Kure, K.; Laosrisin, N.; Izumi, Y.; Suzuki, J.I. *Porphyromonas gingivalis* Elevated High-Mobility Group Box 1 Levels After Myocardial Infarction in Mice. *Int. Heart J.* **2017**, *58*, 762–768. [[CrossRef](#)]
67. Shiheido, Y.; Maejima, Y.; Suzuki, J.I.; Aoyama, N.; Kaneko, M.; Watanabe, R.; Sakamaki, Y.; Wakayama, K.; Ikeda, Y.; Akazawa, H.; et al. *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2016**, *99*, 123–137. [[CrossRef](#)]
68. Suzuki, J.I.; Sato, H.; Kaneko, M.; Yoshida, A.; Aoyama, N.; Akimoto, S.; Wakayama, K.; Kumagai, H.; Ikeda, Y.; Akazawa, H.; et al. Periodontitis and myocardial hypertrophy. *Hypertens. Res.* **2017**, *40*, 324–328. [[CrossRef](#)]

69. Lee, Y.L.; Hu, H.Y.; Chou, P.; Chu, D. Dental prophylaxis decreases the risk of acute myocardial infarction: A nationwide population-based study in Taiwan. *Clin. Interv. Aging* **2015**, *10*, 175–182. [CrossRef]
70. Lafon, A.; Pereira, B.; Dufour, T.; Rigoubey, V.; Giroud, M.; B ejot, Y.; Tubert-Jeannin, S. Periodontal disease and stroke: A meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Neurol.* **2014**, *21*, 1155–1161. [CrossRef]
71. Sen, S.; Giamberardino, L.D.; Moss, K.; Morelli, T.; Rosamond, W.D.; Gottesman, R.F.; Beck, J.; Offenbacher, S. Periodontal Disease, Regular Dental Care Use, and Incident Ischemic Stroke. *Stroke* **2018**, *49*, 355–362. [CrossRef]
72. Pussinen, P.J.; Alftan, G.; Jousilahti, P. Systemic exposure to *Porphyrromonas gingivalis* predicts incident stroke. *Atherosclerosis* **2007**, *193*, 222–228. [CrossRef]
73. Funaki, S.; Tokutomi, F.; Wada-Takahashi, S.; Yoshino, F.; Yoshida, A.; Maehata, Y.; Miyamoto, C.; Toyama, T.; Sato, T.; Hamada, N.; et al. *Porphyrromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microb. Pathog.* **2016**, *92*, 36–42. [CrossRef]
74. Meurman, J.H. A Role for Oral Health Personnel in Stroke Prevention. *Compend. Contin. Educ. Dent.* **2017**, *38*, 26–28.
75. S oder, B.; Meurman, J.H.; S oder, P. . Gingival Inflammation Associates with Stroke—A Role for Oral Health Personnel in Prevention: A Database Study. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0137142. [CrossRef]
76. Revest, M.; Egmann, G.; Cattoir, V.; Tatt evin, P. HACEK endocarditis: State-of-the-art. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2016**, *14*, 523–530. [CrossRef]
77. Lindholm, M.; Min Aung, K.; Nyunt Wai, S.; Oscarsson, J. Role of OmpA1 and OmpA2 in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Aggregatibacter aphrophilus* serum resistance. *J. Oral. Microbiol.* **2018**, *11*, 1536192. [CrossRef]
78. Brown, A.C.; Boesze-Battaglia, K.; Balashova, N.V.; Mas G omez, N.; Speicher, K.; Tang, H.Y.; Duszyk, M.E.; Lally, E.T. Membrane localization of the Repeats-in-Toxin (RTX) Leukotoxin (LtxA) produced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0205871. [CrossRef]
79. Zhu, B.; Macleod, L.C.; Kitten, T.; Xu, P. *Streptococcus sanguinis* biofilm formation & interaction with oral pathogens. *Future Microbiol.* **2018**, *13*, 915–932. [CrossRef]
80. Cahill, T.J.; Prendergast, B.D. Infective endocarditis. *Lancet* **2016**, *387*, 882–893. [CrossRef]
81. Moser, C.; Pedersen, H.T.; Lerche, C.J.; Kolpen, M.; Line, L.; Thomsen, K.; H oiby, N.; Jensen, P. . Biofilms and host response—Helpful or harmful. *APMIS* **2017**, *125*, 320–338. [CrossRef]
82. Forum of International Respiratory Societies; European Respiratory Society. *The Global Impact of Respiratory Disease*; Forum of International Respiratory Societies: Lausanne, Switzerland, 2017; ISBN 978-1-84984-087-3.
83. GBD. Compare|IHME Viz Hub. Available online: <http://vizhub.healthdata.org/gbd-compare> (accessed on 29 September 2019).
84. Andreas, S.; Hering, T.; M uhlig, S.; Nowak, D.; Raupach, T.; Worth, H. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease: An effective medical intervention. *Dtsch. Arzteblatt Int.* **2009**, *106*, 276–282.
85. Usher, A.K.; Stockley, R.A. The link between chronic periodontitis and COPD: A common role for the neutrophil? *BMC Med.* **2013**, *11*, 241. [CrossRef]
86. Hobbins, S.; Chapple, I.L.; Sapey, E.; Stockley, R.A. Is periodontitis a comorbidity of COPD or can associations be explained by shared risk factors/behaviors? *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* **2017**, *12*, 1339–1349. [CrossRef]
87. Muthu, J.; Muthanandam, S.; Mahendra, J. Mouth the mirror of lungs: Where does the connection lie? *J. Front. Med.* **2016**, *10*, 405–409. [CrossRef]
88. Page, R.C.; Eke, P.I. Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *J. Periodontol.* **2007**, *78*, 1387–1399. [CrossRef]
89. Hasegawa, A.; Sato, T.; Hoshikawa, Y.; Ishida, N.; Tanda, N.; Kawamura, Y.; Kondo, T.; Takahashi, N. Detection and identification of oral anaerobes in intraoperative bronchial fluids of patients with pulmonary carcinoma. *Microbiol. Immunol.* **2014**, *58*, 375–381. [CrossRef]
90. Han, M.K.; Huang, Y.J.; Lipuma, J.J.; Boushey, H.A.; Boucher, R.C.; Cookson, W.O.; Curtis, J.L.; Erb-Downward, J.; Lynch, S.V.; Sethi, S.; et al. Significance of the microbiome in obstructive lung disease. *Thorax* **2012**, *67*, 456–463. [CrossRef]
91. Shi, Q.; Zhang, B.; Xing, H.; Yang, S.; Xu, J.; Liu, H. Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Suffer from Worse Periodontal Health—Evidence from a Meta-Analysis. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 33. [CrossRef]

92. Potempa, J.; Mydel, P.; Koziel, J. The case for periodontitis in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 606–620. [[CrossRef](#)]
93. Zhao, X.; Liu, Z.; Shu, D.; Xiong, Y.; He, M.; Xu, S.; Guo, B. Association of Periodontitis with Rheumatoid Arthritis and the Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Disease Activity in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 5802–5810. [[CrossRef](#)]
94. Araújo, V.M.; Melo, I.M.; Lima, V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Med. Inflamm.* **2015**, *2015*, 259074. [[CrossRef](#)]
95. Konig, M.F.; Abusleme, L.; Reinholdt, J.; Palmer, R.J.; Teles, R.P.; Sampson, K.; Rosen, A.; Nigrovic, P.A.; Sokolove, J.; Giles, J.T.; et al. Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 369ra176. [[CrossRef](#)]
96. McHugh, J. Rheumatoid arthritis: New model linking periodontitis and RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 66. [[CrossRef](#)]
97. Reichert, S.; Haffner, M.; Keyber, G.; Schäfer, C.; Stein, J.M.; Schaller, H.G.; Wienke, A.; Strauss, H.; Heide, S.; Schulz, S. Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40*, 591–598. [[CrossRef](#)]
98. Témoins, S.; Chakaki, A.; Askari, A.; El-Halaby, A.; Fitzgerald, S.; Marcus, R.E.; Han, Y.W.; Bissada, N.F. Identification of oral bacterial DNA in synovial fluid of patients with arthritis with native and failed prosthetic joints. *J. Clin. Rheumatol.* **2012**, *18*, 117–121. [[CrossRef](#)]
99. Cheng, Z.; Meade, J.; Mankia, K.; Emery, P.; Devine, D.A. Periodontal disease and periodontal bacteria as triggers for rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2017**, *31*, 19–30. [[CrossRef](#)]
100. Badran, Z.; Struillou, X.; Verner, C.; Clee, T.; Rakic, M.; Martinez, M.C.; Soueidan, A. Periodontitis as a risk factor for systemic disease: Are microparticles the missing link? *Med. Hypotheses* **2015**, *84*, 555–556. [[CrossRef](#)]
101. Ribeiro, J.; Leão, A.; Novaes, A.B. Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32*, 412–416. [[CrossRef](#)]
102. Nesse, W.; Westra, J.; van der Wal, J.E.; Abbas, F.; Nicholas, A.P.; Vissink, A.; Brouwer, E. The periodontium of periodontitis patients contains citrullinated proteins which may play a role in ACPA (anti-citrullinated protein antibody) formation. *J. Clin. Periodontol.* **2012**, *39*, 599–607. [[CrossRef](#)]
103. Venkataraman, A.; Almas, K. Rheumatoid Arthritis and Periodontal Disease. An Update. *N.Y. State Dent. J.* **2015**, *81*, 30–36.
104. Mühlberg, S.; Jäger, J.; Krohn-Grimberghe, B.; Patschan, S.; Mausberg, R.F.; Schmalz, G.; Haak, R.; Ziebolz, D. Oral health-related quality of life depending on oral health in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Oral. Investig.* **2017**, *21*, 2661–2670. [[CrossRef](#)]
105. Michaud, D.S.; Fu, Z.; Shi, J.; Chung, M. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiol. Rev.* **2017**, *39*, 49–58. [[CrossRef](#)]
106. Mantovani, A.; Allavena, P.; Sica, A.; Balkwill, F. Cancer-related inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 436–444. [[CrossRef](#)]
107. Moraes, R.C.; Dias, F.L.; Figueredo, C.M.; Fischer, R.G. Association between Chronic Periodontitis and Oral/Oropharyngeal Cancer. *Braz. Dent. J.* **2016**, *27*, 261–266. [[CrossRef](#)]
108. Maekawa, T.; Krauss, J.L.; Abe, T.; Jotwani, R.; Triantafilou, M.; Triantafilou, K.; Hashim, A.; Hoch, S.; Curtis, M.A.; Nussbaum, G.; et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host. Microbe* **2014**, *15*, 768–778. [[CrossRef](#)]
109. Gao, S.; Li, S.; Ma, Z.; Liang, S.; Shan, T.; Zhang, M.; Zhu, X.; Zhang, P.; Liu, G.; Zhou, F.; et al. Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect. Agents Cancer* **2016**, *11*, 3. [[CrossRef](#)]
110. Nishihara, T.; Koseki, T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* **2004**, *36*, 14–26. [[CrossRef](#)]
111. Fan, X.; Alekseyenko, A.V.; Wu, J.; Peters, B.A.; Jacobs, E.J.; Gapstur, S.M.; Purdue, M.P.; Abnet, C.C.; Stolzenberg-Solomon, R.; Miller, G.; et al. Human oral microbiome and prospective risk for pancreatic cancer: A population-based nested case-control study. *Gut* **2018**, *67*, 120–127. [[CrossRef](#)]
112. Karpieński, T.M. Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms* **2019**, *7*, 20. [[CrossRef](#)]
113. Kostic, A.D.; Gevers, D.; Pedamallu, C.S.; Michaud, M.; Duke, F.; Earl, A.M.; Ojesina, A.I.; Jung, J.; Bass, A.J.; Taberner, J.; et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res.* **2012**, *22*, 292–298. [[CrossRef](#)]

114. Sun, J.; Zhou, M.; Salazar, C.R.; Hays, R.; Bedi, S.; Chen, Y.; Li, Y. Chronic Periodontal Disease, Periodontal Pathogen Colonization, and Increased Risk of Precancerous Gastric Lesions. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 1124–1134. [[CrossRef](#)]
115. Salazar, C.R.; Sun, J.; Li, Y.; Francois, F.; Corby, P.; Perez-Perez, G.; Dasanayake, A.; Pei, Z.; Chen, Y. Association between selected oral pathogens and gastric precancerous lesions. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e51604. [[CrossRef](#)]
116. Plummer, M.; Franceschi, S.; Vignat, J.; Forman, D.; de Martel, C. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. *Int. J. Cancer* **2015**, *136*, 487–490. [[CrossRef](#)]
117. Desai, H.G.; Gill, H.H.; Shankaran, K.; Mehta, P.R.; Prabhu, S.R. Dental plaque: A permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand. J. Gastroenterol.* **1991**, *26*, 1205–1208. [[CrossRef](#)]
118. Anand, P.S.; Kamath, K.P.; Anil, S. Role of dental plaque, saliva and periodontal disease in *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 5639–5653. [[CrossRef](#)]
119. Song, Q.; Lange, T.; Spahr, A.; Adler, G.; Bode, G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol.* **2000**, *49*, 349–353. [[CrossRef](#)]
120. Herrera, V.; Parsonnet, J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin. Microbiol. Infect.* **2009**, *15*, 971–976. [[CrossRef](#)]
121. Moss, S.F. The Clinical Evidence Linking *Helicobacter pylori* to Gastric Cancer. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2016**, *3*, 183–191. [[CrossRef](#)]
122. Ishihara, K.; Miura, T.; Kimizuka, R.; Ebihara, Y.; Mizuno, Y.; Okuda, K. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEMS Microbiol. Lett.* **1997**, *152*, 355–361. [[CrossRef](#)]
123. Umeda, M.; Kobayashi, H.; Takeuchi, Y.; Hayashi, J.; Morotome-Hayashi, Y.; Yano, K.; Aoki, A.; Ohkusa, T.; Ishikawa, I. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J. Periodontol.* **2003**, *74*, 129–134. [[CrossRef](#)]
124. Zou, Q.H.; Li, R.Q. *Helicobacter pylori* in the oral cavity and gastric mucosa: A meta-analysis. *J. Oral Pathol. Med.* **2011**, *40*, 317–324. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

PARTIE 4 - ESPACES INTERDENTAIRES : UNE NICHE ECOLOGIQUE PARTICULIERE

I. ESPACES INTERDENTAIRES

1. Caractéristiques anatomo-physiologiques

Les espaces interdentaires ont une anatomie très variable, que ce soit que ce soit inter- ou intra-individus (502).

Déterminé par la morphologie et la position des dents, l'espace interdentaire est délimité par le point de contact, les surfaces proximales des deux dents adjacentes, les faces internes de la papille interdentaire, et la gencive papillaire (503). Cet espace peut être considéré comme étant formé par 4 pyramides : occlusale, cervicale, vestibulaires et linguale ou palatine dont les sommets coïncident avec le point de contact. La morphologie de la gencive interdentaire est essentiellement déterminé par la morphologie des faces mésiales et distales des dents adjacentes (504,505).

Les papilles interdentaires représentent le tissu gingival qui délimite cet espace interdentaire et le protège de l'extérieur. Chez un patient sain, cet espace ne sera visible que lors d'une radiographie (Figure 13).

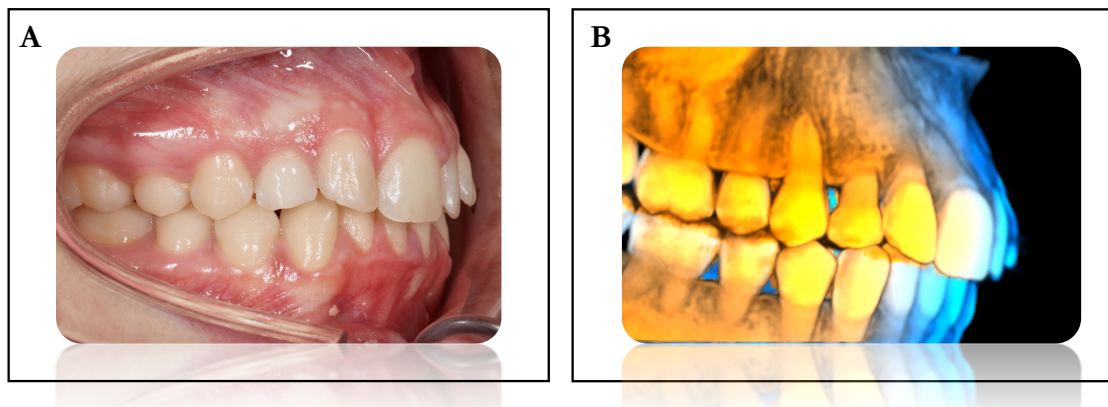


Figure 13. Vue sagittale des mâchoires d'une adolescente de 15 ans.

A. Photographie intra-orale.

B. Image en 2 dimensions réalisée à partir d'une radiographie tridimensionnelle (Cone beam).

Les papilles sont constituées de tissu conjonctif dense recouvert d'épithélium oral (506). Ce sont des structures tissulaires peu vascularisées, avec une boucle capillaire terminale composée d'une artère ascendante et d'une veine descendante (507–509). La vascularisation de type terminale

et d'origine apicale prédispose à la stase sanguine et à l'œdème. Ce faible apport sanguin aux niveaux des papilles interdentaires les rend très fragiles, sensibles aux récessions et peut interrompre la cicatrisation (506,510,511). La papille interdentaire a un rôle de barrière visant à protéger les structures parodontales sous-jacentes. Elle isole ainsi le parodonte profond du milieu oral et le protège des agressions directes. L'absence de la papille interdentaire peut avoir des conséquences esthétiques et phonétiques. Notamment au niveau du secteur antérieur avec des « fuites » d'air et le passage de salive à travers les espaces pouvant engendrer l'émission de postillons (512,513). La forme des papilles est déterminée par la hauteur entre le sommet de la crête osseuse et le point de contact dentaire, le type de parodonte, l'espace interdentaire et la forme des dents. Cohen fut le premier à décrire une papille avec deux sommets, un vestibulaire et un lingual ou palatin (Figure 14)(514). Entre les deux sommets, il y a un col gingival ou col inter-papillaire (515). C'est un creux en forme de cuvette à concavité coronaire qui relie les deux sommets papillaires et épouse la forme de la zone de contact interproximale (516).

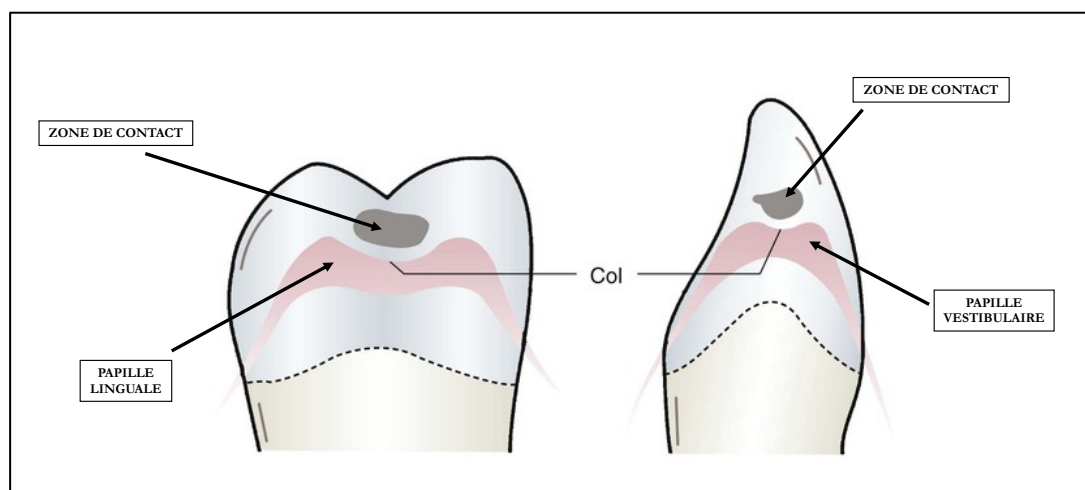


Figure 14. Caractéristiques anatomiques déterminant la forme des papilles interdentaires.

Dessin du col interdentaire, situé entre les papilles vestibulaires et linguales, sous la zone de contact de la dent (517).

Chaque papille a une forme pyramidale à pointe coronaire qui s'aplatit au fur et à mesure que l'on va vers les dents postérieures (514). Dans la zone des incisives, la papille interdentaire est étroite et présente une forme pyramidale dont la pointe se situe juste en dessous du point de contact (514,518). Dans la région postérieure, elle est plus large et présente une zone concave en forme de crête appelée col (515). La morphologie des dents, la largeur des couronnes dentaires et la position des dents les unes par rapport aux autres déterminent l'étendue vestibulo-linguale et corono-apicale des surfaces de contact et ainsi, la largeur et la profondeur du col (519).

La papille est recouverte d'un épithélium pavimenteux stratifié et kératinisé (520,521). Le col papillaire, lui, est en général peu kératinisé ou parakératinisé et est recouvert d'un épithélium

squameux stratifié (514). Le degré de kératinisation du col de la papille peut être augmenté par stimulation et par l'hygiène interdentaire (522).

Plusieurs classifications ont été proposées pour évaluer la hauteur des papilles. Nordland et Tarnow ont créé une classification basée sur 3 éléments anatomiques (Figure 15) : le point de contact interdentaire, le point le plus apical et vestibulaire de la jonction émail-cément (JEC) et le point le plus coronaire interproximal de la JEC (523). Ils ont ainsi observés 4 types d'embrasures différentes :

- a. Normale : la papille remplit la totalité de l'espace entre le point de contact et la ligne rejoignant la JEC vestibulaire des dents adjacentes.
- b. Classe I : l'extrémité de la papille est située entre le point de contact et la ligne rejoignant la JEC proximale des dents adjacentes.
- c. Classe II : l'extrémité de la papille est située au niveau ou apicalement à la ligne rejoignant la JEC proximale des dents adjacentes, mais sans dépasser apicalement la ligne rejoignant la JEC vestibulaire.
- d. Classe III : l'extrémité de la papille est située au niveau de, ou apicalement à la ligne rejoignant la JEC vestibulaire des dents adjacentes.

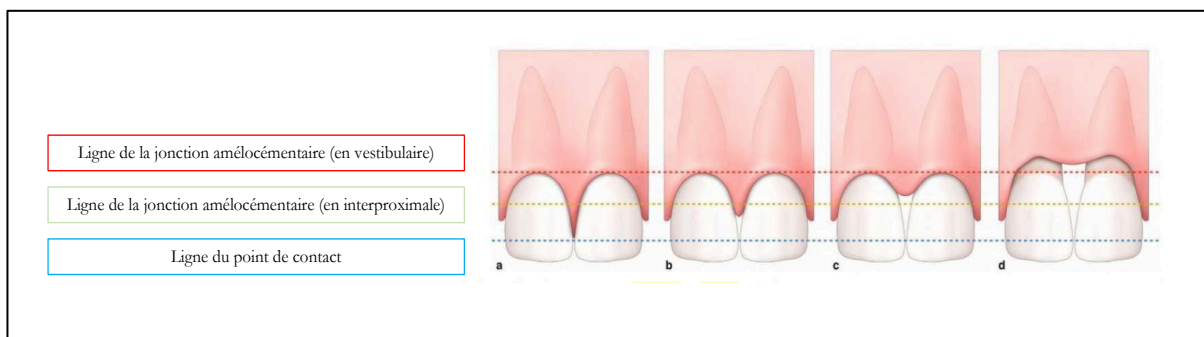


Figure 15. Classification de la hauteur des papilles dentaires de Nordland et Tarnow (523).

D'après Bouchard et *al.* (524)

a : Papille normale ; b : Papille de classe I ; c : Papille de classe II ; d : Papille de classe III.

Plus récemment, Cardaropoli et *al.* (2004) ont proposé une autre classification de la hauteur papillaire (Figure 16), proche de celle de Nordland et Tarnow, qu'ils ont appelé « IPP » pour « Indice de Présence Papillaire » (525). Ils évaluent la hauteur papillaire par rapport au point de contact et à la jonction amélo-cémentaire et obtiennent ainsi quatre classes :

- IPP-1 : la papille est intacte, son sommet est coronaire au point de contact. Elle est au même niveau que les papilles adjacentes.

- IPP-2 : la papille n'est pas intacte, son sommet est apical au point de contact. Elle n'est pas au même niveau que les papilles adjacentes.
- IPP-3 : le sommet de la papille est très apical à la JEC interproximale
- IPP-4 : le sommet de la papille est apical à la JEC interproximale et vestibulaire.

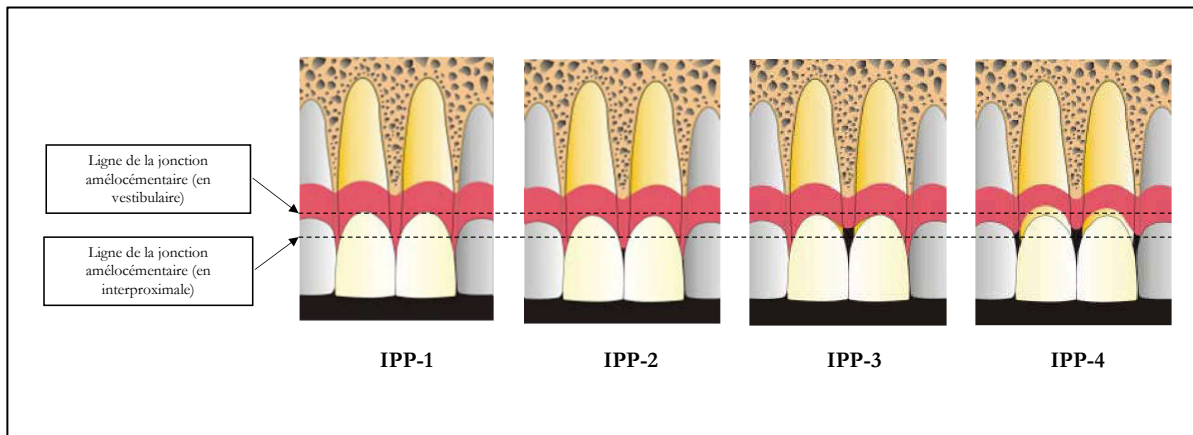


Figure 16. Classification de la hauteur des papilles dentaires de Cardaropoli (525).

D'après d' Apoorva (526).

IPP : Indice de Présence Papillaire.

2. Variabilités anatomiques

Plusieurs facteurs impactent sur la présence ou l'absence de papille interdentaire et donc l'anatomie des espaces interdentaires. Ces variabilités peuvent être d'origine physiologiques ou pathologiques.

a. Variabilités « physiologiques »

▪ *Distance entre deux dents, point de contact et espace interdentaire*

Selon Fradeani, la distance entre les racines de deux dents adjacentes est un facteur qui influence la présence ou l'absence de papille interdentaire. Une distance inter-radiculaire faible compromettrait la présence d'os interproximal et s'accompagnerait d'une absence de papille interdentaire (527). Une étude de Cho et *al.* a montré que les papilles interdentaires étaient présentes dans 77,8% des cas lorsque la distance interproximale au niveau de la crête osseuse était de 1 mm, dans 53,7% des cas lorsque la distance était de 2 mm, dans 23,5% des cas lorsque la distance était de 3 mm et que la papille était toujours perdue lorsque la distance interproximale des racines était de 4 mm (528). L'étude de Chang (529) et celle de Chow et *al.* (511) ont montré que la largeur de l'espace interdentaire avait plus d'influence que la hauteur sur la présence de la papille. Un espace

interdentaire plus large entraînait une récession accrue des papilles. A l'inverse, Chen et *al.* ont déterminé que la hauteur avait plus d'influence que la largeur (530).

En 2017, De Santana et *al.* ont montré que chez de jeunes adultes parodontalement sains, les dimensions de la papille interdentaire étaient significativement augmentée au niveau des dents sans point de contact en comparaison aux dents controlatérales avec point de contact. Ainsi, le point de contact ne déterminerait pas la présence et la taille de la papille interdentaire (531).

- *Distance entre la crête osseuse et le point de contact*

L'étude de Tarnow et *al.* a montré que la papille interdentaire était présente dans 98% des espaces interdentaires étudiés lorsque la distance entre la crête osseuse et le point de contact était de 5 mm alors que lorsque cette distance était de 6 mm, la papille était présente dans seulement 56% des cas et lorsque la distance était supérieure à 7 mm, la papille était présente dans moins de 27% des cas (Figure 17)(532). Le remplissage des embrasures gingivales avec la papille interdentaire est complet lorsque la distance entre le point de contact et la crête osseuse interproximale est de 5 mm ou moins (532).

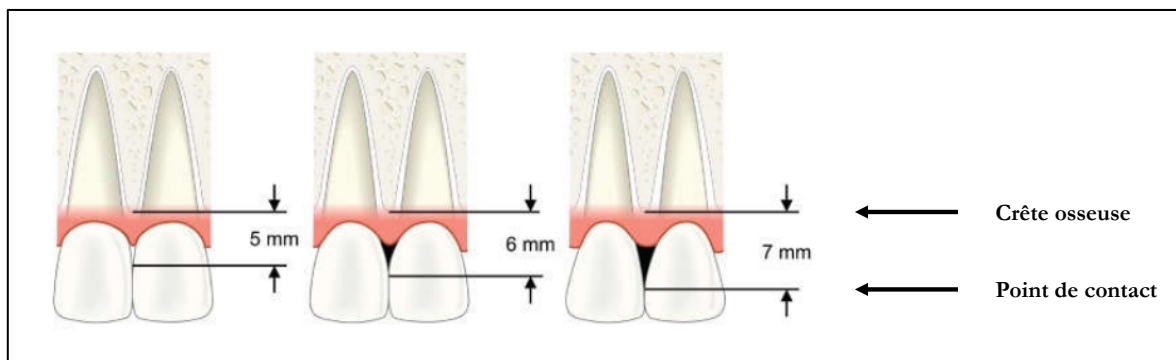


Figure 17. Position de la papille interdentaire en fonction de la distance entre la crête osseuse et le point de contact (526).

- *Biotype parodontal*

Le biotype parodontal correspond à la morphologie gingivale et osseuse du parodonte. Il existe plusieurs classifications pour caractériser le biotype parodontal.

Deux biotypes tissulaires distincts ont été décrits par Siebert et Lindhe en 1991 : un parodonte épais et plat ou fin et festonné (533). En général, un biotype épais est préférable à un biotype fin pour la présence des papilles interdentaires (511). Les tissus fins et festonnés sont plus susceptibles de réagir aux traumatismes ou à l'inflammation (534). Les patients présentant des biotypes épais et plats présentent des papilles courtes, alors que les biotypes fins et festonnés présentent des papilles longues (535). Selon Koïs, un biotype parodontal fin possède un support

osseux moins important et une vascularisation plus réduite par rapport à un biotype épais (536). Les patients présentant des biotypes festonnés minces sont considérés comme étant à risque de perte papillaire car ils ont été associés à une réponse des tissus mous compromise après un traitement chirurgical ou de restauration (536–539). Cependant, une étude portant sur 333 papilles n'a révélé aucun effet du biotype parodontal sur la présence de triangles noirs (540).

- *Morphologie dentaire*

Les formes de dents (circulaires, carrées ou triangulaires) déterminent le degré du feston gingival (512). Les dents triangulaires forment un feston prononcé et prédisposent aux « triangles noirs » (541).

De plus, les dents triangulaires ont des racines divergentes avec un os interproximal plus épais, ce qui réduit la perte osseuse verticale par rapport aux dents carrées. Cependant, les dents carrées permettent un meilleur maintien de la papille interproximale en raison d'une distance interproximale plus petite entre la crête osseuse et le point de contact (541). Ces dents ayant des points de contact larges, les chances de triangles noirs sont minimales par rapport aux dents triangulaires ayant des points de contact étroits, plus incisifs (532).

- *Age du patient*

L'âge apparaît comme un facteur de risque pour la perte des papilles interdentaires (542,529,511). Plusieurs études ont montré qu'il existait une corrélation positive entre la récession papillaire et l'augmentation de l'âge (523,543). Ainsi, une augmentation de l'âge est corrélée à une augmentation progressive de la distance verticale entre le point de contact et la crête osseuse (543). Ceci est en grande partie dû aux conséquences physiologiques du vieillissement. En fait, la distance entre le point de contact et la crête osseuse augmente avec l'âge en raison de la résorption physiologique de la crête osseuse. De plus, il est possible que la récession des papilles augmente avec l'âge en raison d'un amincissement de la muqueuse (544).

Ainsi, comme l'a rapporté de manière similaire Chang, les résultats en matière d'âge sont un facteur de prédiction significatif et fort du degré de récession papillaire (529). Ko-Kimura et *al.* ont montré que les patients âgés de plus de 20 ans sont plus susceptibles de présenter une perte de papille dentaire que ceux âgés de moins de 20 ans (545). Ainsi, 67% des plus de 20 ans présentaient une perte de papille interdentaire alors que seul 18% des moins de 20 ans étaient dans la même situation. Ceci est dû à l'amincissement de l'épithélium oral, à la diminution de la kératinisation et à la diminution de la hauteur de la papille en raison de l'âge (545).

Van der Velden (542) a présenté les modifications du tissu parodontal dues au vieillissement : les changements de l'épithélium oral de l'homme causés par le vieillissement sont liés à un amincissement de l'épithélium (546) et à une diminution de la kératinisation (547). Il a conclu qu'il n'y avait pas suffisamment de preuves de migration physiologique gingivale ou papillaire lors du vieillissement (542). Cependant, il a souligné que la récession des tissus parodontaux due à la plaque, à l'inflammation et aux traumatismes augmente avec l'âge et que la dégradation parodontale se développe plus rapidement en raison d'un taux de cicatrisation plus lent.

Vandana et Savitha ont montré une association de tissus plus minces avec le vieillissement (548). La gencive était plus épaisse dans le groupe d'âge plus jeune que dans le groupe plus âgé. Ils ont associé l'amincissement du parodonte aux effets croissants d'habitudes traumatiques et à la diminution de la couche kératinisée au cours du vieillissement. Une étude rétrospective sur 60 sujets a révélé que l'incidence de la perte papillaire entre les incisives centrales mandibulaires était plus élevée chez les patients plus âgés (549).

b. Variabilités « pathologiques »

▪ *Maladie parodontale*

Lors d'une inflammation initiale de la papille, les conditions anatomiques et physiologiques présentes au niveau de la zone interdentaire sont propices pour permettre l'apparition et le développement d'un biofilm pathogène, qui favorisera l'apparition d'une MP (550,551). Cette inflammation gingivale contribue au long terme à la perte des papilles interdentaires (533). Novak *et al.* ont obtenu des résultats chez des patients atteints de MP chronique et généralisé (552).

La MP a été associée à la perte de papilles en raison de la perte d'os alvéolaire (553). Une distance de 5 mm entre la crête alvéolaire et le point de contact est retrouvée des patients indemnes de MP (553). Dans la MP, la perte osseuse alvéolaire augmente la distance entre le point de contact et la crête alvéolaire, ce qui entraîne une perte de papilles interdentaires et l'apparition du triangle noir (554). Les poches avec une profondeur de sondage supérieure à 3 mm entraîneront une augmentation de la rétention de la plaque, de l'inflammation et une résorption osseuse (553).

▪ *Racines divergentes et traitement orthodontique*

Les traitements orthodontiques peuvent être à l'origine de la perte des papilles interdentaires et à l'apparition de triangles noirs (506). Mais ils peuvent également recréer des conditions propices pour l'amélioration de la santé gingivale (555).

La fermeture orthodontique des sites d'extraction peut entraîner soit une invagination gingivale soit une accumulation de tissu gingival (556). D'autre part, Burke et *al.* ont examiné 500 cas d'orthodontie et ont souligné que le mouvement orthodontique pour traiter les encombrements au niveau des dents antérieures pouvait séparer les racines et donc étirer la papille interdentaire, augmentant ainsi la présence d'un triangle noir entre les incisives (557). Les auteurs ont également fait part de leurs préoccupations concernant le fait que les racines étant déplacées pendant le traitement orthodontique soient très proches les unes des autres, mettant en péril l'os interdentaire et la papille interdentaire (557).

Le déplacement orthodontique de dents séparées par un diastème permet de créer un point de contact et donc d'induire la formation d'une papille dans certains cas (524). Le déplacement du point de contact de manière plus apicale lors du rapprochement orthodontique des dents, pourrait permettre d'obtenir de bons résultats esthétiques au niveau de la zone interdentaire (558). La technique d'extrusion orthodontique peut être utilisée pour gérer la hauteur de l'os alvéolaire et donc la présence de la papille (554). Des racines divergentes sont associées aux triangles noirs. Avec le traitement orthodontique, la correction de l'axe des racines peut corriger ces espaces. Au fur et à mesure que les racines deviennent parallèles, le point de contact s'étire et se dirige vers le sommet de la papille (510).

- *Dentisterie restauratrice, prothétique et implantaire*

En dentisterie restauratrice, il est important de recréer un point de contact qui offrira un espace suffisant pour la gencive interdentaire, minimisera l'impaction et la rétention alimentaire et permettra au patient de retirer facilement la plaque (559).

La conception de la zone de contact dans la mise en place de couronnes, bridges et tout autre type de restauration affecte la zone interdentaire. Taeki a mis l'accent sur la largeur et l'emplacement appropriés de la zone de contact dans la dimension vestibulo-lingual. Il a souligné que l'emplacement de la zone de contact était lié au contour de la crête marginale et dictait la forme de l'embrasure (503).

En ce qui concerne le traitement par restaurations, une des options est de changer la position du point de contact avec la facette ou la couronne. Il est possible d'ajouter de la céramique rose sur la restauration pour masquer la perte de papille interdentaire (553). Le composite peut être inséré près du sillon gingival pour guider la forme de la papille interdentaire (506).

Une autre méthode de correction des triangles noirs est la réduction interproximale de l'émail, réalisée avec un disque diamanté pour remodeler la surface mésiale de l'incisive centrale

maxillaire. La réduction interproximale élimine environ 0,5 à 0,75 mm d'émail, ce qui augmente le point de contact et le déplace apicalement (560). La réduction interproximale de l'émail au niveau des dents avec des couronnes triangulaires modifiera le point de contact pour une zone plus grande, ce qui réduira ainsi l'embrasure gingivale (506).

Lors de la mise en place d'implants, il y a une chance importante de perdre la papille en raison de l'augmentation de la distance entre le point de contact et la crête alvéolaire. Pour préserver la papille, il est important de respecter la distance entre le point de contact et le niveau osseux de 5 mm ou moins (561). Les espaces noirs sont encore plus prononcés lorsque deux implants adjacents sont placés (562). De plus, afin de prévenir la perte osseuse et donc la perte de papille, il est important que la distance entre les deux implants soit de minimum 3 mm (563). Cependant, une distance supérieure ou égale à 3 mm ne garantit pas systématiquement la présence de papille interdentaire (504).

L'ensemble des variabilités anatomiques des espaces interdentaires va permettre au microbiote interdentaire de se structurer au sein de ces espaces.

II. CARACTERISTIQUES DU MICROBIOTE INTERDENTAIRE

En santé bucco-dentaire, l'espace interdentaire est un site très spécifique. D'un point de vue anatomique, il n'est pas facilement accessible au brossage. D'un point de vue physiologique, c'est le siège de nombreuses bactéries plus ou moins virulentes. De ce fait, l'espace interdentaire sera le point initiateur de caries interdentaires, mais aussi des MP (gingivite et parodontite) qui sont des maladies multifactorielles dont le déterminant principal est la présence de bactéries pathogènes.

La majorité des lésions carieuses chez les adolescents, période pendant laquelle la carie dentaire est encore très active (564,565), sont observées sur les surfaces interdentaires des dents postérieures en raison des caractéristiques anatomiques, physiologiques, histologiques et du régime alimentaire (566,567). Le risque de lésions carieuses interdentaires est notamment important chez les adolescents à haut risque carieux, principalement en raison du manque de respect des programmes de prévention des caries dans ce groupe (568). Chez les enfants âgés de 12 ans, la prévalence des caries interdentaires est de 39% et augmente à 72% entre 20 et 21 ans (569). Chez les adolescents de 16 ans, les lésions de l'émail représentent plus de 80% de toutes les lésions carieuses, que la prévalence de carie dans la population soit faible ou élevée (17).

Bien qu'il soit plus courant d'observer des MP chez les adultes, les jeunes et les adolescents n'en sont pas indemne. Plusieurs études ont montré qu'environ 80% des adolescents souffraient de gingivites. Une faible prévalence de MP a été observée chez les adolescents (321,570).

Dans l'espace interdentaire, la papille interdentaire n'est que légèrement kératinisée et est donc plus perméable aux produits bactériens tels que les LPS (endotoxines), les peptides chimiotactiques, les toxines et les acides organiques (571,572). L'épithélium gingival, qui est exposé au microbiote oral, protège le tissu sous-jacent en maintenant l'homéostasie au sein du parodonte (573). Pour ce faire, les kératinocytes possèdent des récepteurs de reconnaissance de motifs capables de reconnaître spécifiquement différents motifs bactériens. Les informations cellulaires transmises par ces récepteurs induisent la réponse immunitaire innée, en particulier la production de peptides antimicrobiens et de médiateurs de l'inflammation (574). Dans certains cas, cette réponse est insuffisante, ce qui peut entraîner une gingivite ou une parodontite (575). La majorité des MP qui affectent les adolescents sont réversibles et causent peu de dommages tissulaires comparativement aux adultes (576).

Par exemple, les adolescents peuvent souffrir de gingivite (576,577). Même si le microbiote associé à cette pathologie n'est pas encore très bien caractérisé, *Aggregatibacter (Actinobacillus) sp.*, *Capnocytophaga sp.*, *Leptotrichia sp.*, and *Selenomonas sp.* ont été mises en évidence dans la plaque sousgingivale d'adolescent atteints de gingivite (576,578,579). Une autre pathologie parodontale caractéristique de l'adolescence est la gingivite pubertaire ou gingivite en relation aux hormones stéroïdes qui se caractérise par un saignement au niveau de la papille interdentaire (576,577). Une pathologie parodontale plus grave qui affecte les adolescents est la parodontite juvénile. Cette parodontite agressive est prévalente chez les enfants et les adolescents lors de la puberté. Il existe des formes localisées qui sont associées à la présence d'*Aggregatibacter (Actinobacillus) sp.*, *Bacteroides sp.* et *Eubacterium sp.* dans le microbiote sous-gingival et des formes généralisées associées à *P. gingivalis* et *T. denticola* (576,577).

L'espace interdentaire apparaît donc comme un site stratégique d'initiation des maladies carieuses et gingivales chez les adolescents. Pour ces deux pathologies, le facteur clé de leur apparition est le microbiote dentaire. Quelques études récentes se sont intéressées aux microbiote interdentaire de jeunes adultes sains, et ont montré qu'ils étaient composés d'environ 10^{10} bactéries dans chaque espace interdentaire (580).

Bourgeois et *al.* (2017) ont montré, chez des jeunes adultes sains âgés de 18 à 35 ans, que le microbiote interdentaire était composé de bactéries cariogènes telles que *Streptococcus spp.* qui était l'espèce la plus abondante, suivie de *Lactobacillus spp.* et *Enterococcus spp.* (Figure 18)(581). *Streptococcus spp.* et *Lactobacillus spp.* étaient détectés dans tous les sites interdentaires testés et *Enterococcus spp.* dans 99% des sites. *S. mutans* était présent dans seulement 28% des sites testés et *C. albicans* était détecté dans 11% des sites. *Enterococcus faecalis* n'a jamais été mis en évidence (581).

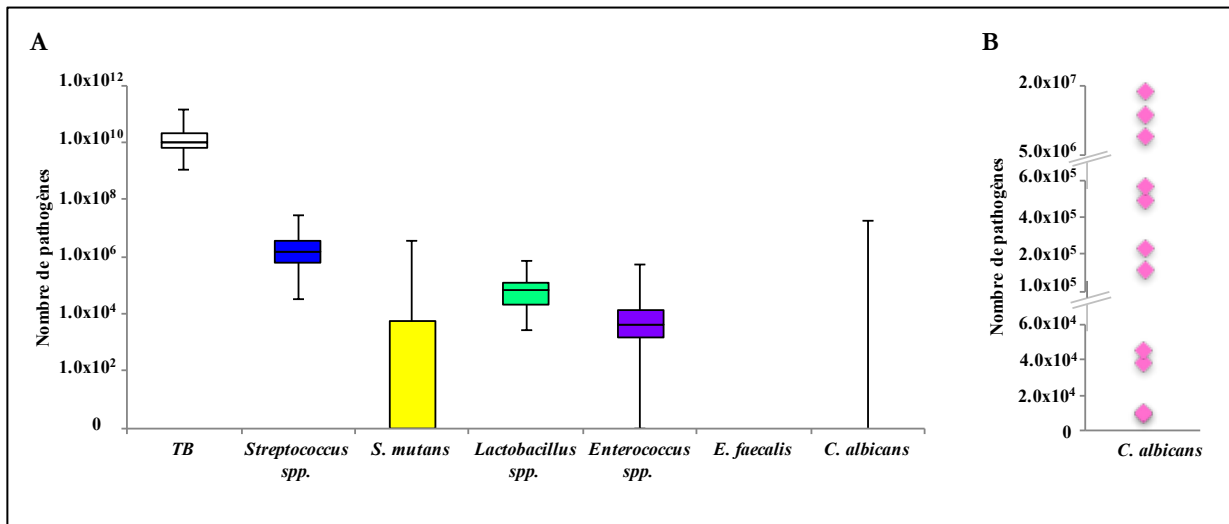


Figure 18. Quantification des organismes cariogènes chez l'adulte sain (581).

A. Diagramme en boîte représentant pour chaque pathogène, de bas en haut, le premier quartile, la médiane et le troisième quartile.

B. Quantification de *C. albicans* en fonction des sites interdentaires.

TB = Total des bactéries.

Carrouel et *al.* (2016) ont montré que le microbiote interdentaire de jeunes adultes sains était composé des principaux agents pathogènes parodontaux (Figure 19) dont ceux : (i) du complexe bleu (*Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*)), (ii) du complexe violet (*A. odontolyticus*, *V. parvula*), (iii) du complexe vert (*A. actinomycetemcomitans*, *C. concisus*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *E. corrodens*), (iv) du complexe jaune (*S. mitis* and *Streptococcus spp.*), (v) du complexe orange (*C. gracilis*, *C. rectus*, *F. nucleatum*, *Parvimonas micra*, *P. intermedia* et *P. nigrescens*), et (vi) du complexe rouge (*P. gingivalis*, *T. forsythia* et *T. denticola*).

F. nucleatum était l'espèce la plus abondante alors que les moins abondantes étaient *A. viscosus*, *P. gingivalis* et *A. actino*. Le complexe rouge, connu pour regrouper les agents pathogènes les plus importants dans la MP chez l'adulte, représente 8,08% des 19 bactéries analysées. *P. gingivalis* a été détecté chez 19% des sujets en bonne santé et représente 0,02% du biofilm interdentaire. *T. forsythensis* et *T. denticola* (0,02 et 0,04% du biofilm interdentaire) ont été détectés chez 93 et 49% des sujets en bonne santé, respectivement.

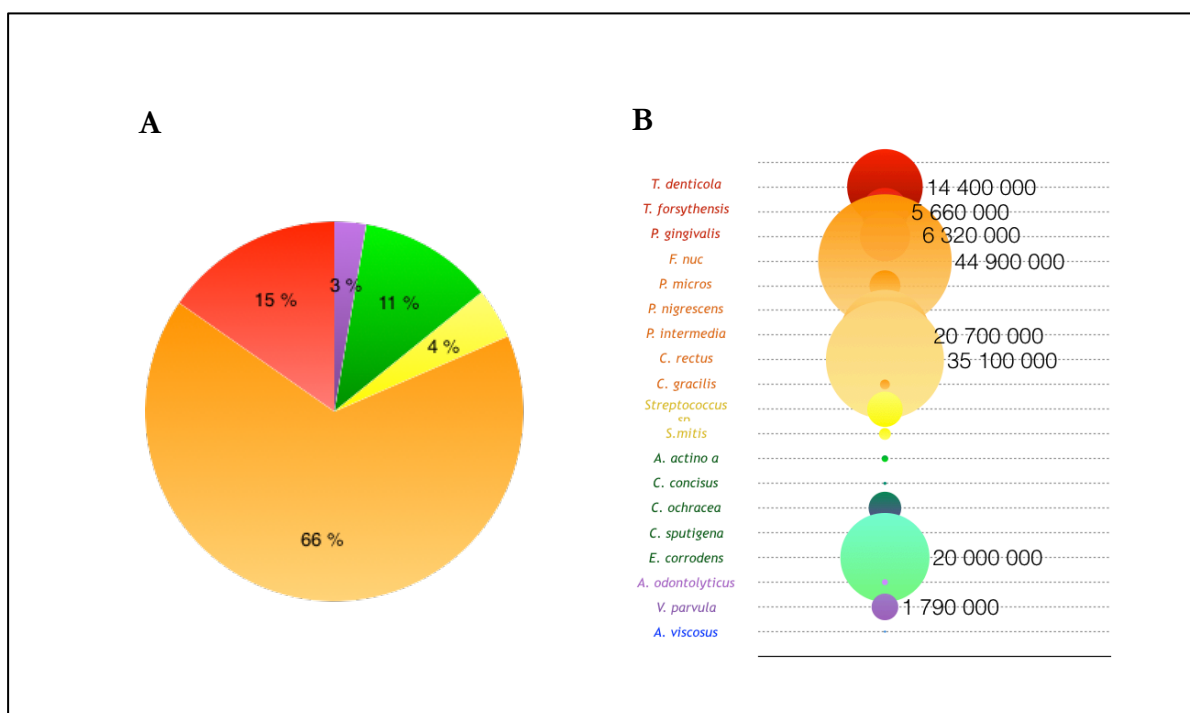


Figure 19. Caractérisation du microbiote interdentaire parodontal de jeunes adultes sains (10).

A. Répartition des complexes de Socransky au niveau des espaces interdentaires.

B. Quantification de 19 espèces parodontopathogènes au niveau des espaces interdentaires. Les couleurs représentent les couleurs des complexes de Socransky.

Ainsi, la présence effective d'agents pathogènes carieux et parodontaux est un indicateur fort de la nécessité de développer de nouvelles méthodes pour perturber le biofilm interdentaire dans l'hygiène orale quotidienne.

III. PROPHYLAXIE INDIVIDUELLE INTERDENTAIRE

Une meilleure connaissance de la physiopathologie orale a conduit à l'introduction d'un concept plus moderne de perturbation du biofilm au lieu de l'élimination de la plaque dentaire (582,583). L'hygiène orale, associée à la santé générale et à la qualité de vie, est importante pour la préservation de la santé bucco-dentaire. Diverses techniques de brossage ont été décrites pour s'adapter à la dextérité du patient, à l'anatomie du complexe gingival et à l'état parodontal. Des brosses à dents manuelles et électriques de différents modèles sont disponibles pour répondre à ces exigences (584). L'hygiène dentaire est généralement assurée *via* l'utilisation deux fois par jour d'une brosse à dent adaptée. Une bonne condition parodontale est liée par exemple au contrôle de l'accumulation de la plaque dans la zone supra-gingivale (585,586).

Cependant, le brossage seul ne suffit pas pour atteindre et maintenir un niveau satisfaisant d'hygiène orale à moyen et long terme (587,588,14). Concrètement, il n'est pas efficace pour désorganiser le biofilm au niveau des espaces interdentaires (589) qui représentent jusqu'à un tiers des surfaces accessibles (372). En principe, il est raisonnable d'affirmer que le contrôle idéal de la plaque dentaire doit se faire avec une brosse à dents souple, de faible dimension, comportant une densité élevée de brins et combiné à l'utilisation d'accessoires interdentaires (590)

Plusieurs dispositifs et méthodes existent pour le nettoyage de l'espace interdentaire. Le choix doit être principalement basé sur l'anatomie de la papille, la taille des embrasures, le volume de l'espace interdentaire, la capacité de pénétration et l'alignement des dents. Lors de l'évaluation des produits existants, la facilité d'utilisation, l'efficacité de l'élimination de la plaque et les éventuels traumatismes tissulaires doivent être pris en compte (590).

Divers dispositifs médicaux pour accéder aux espaces interdentaires ont été proposés. Ceux-ci comprennent principalement le fil dentaire, les brossettes interdentaires (BID), les jets dentaires (591). Une étude récente de Marchesan *et al.* a fourni des données convaincantes concernant l'utilisation de ces dispositifs pour favoriser la santé orale. Ainsi, le nettoyage interdentaire est associé à moins de maladies parodontales, moins de caries occlusales et interproximales et moins de dents manquantes (592). Une fréquence plus élevée de nettoyage interdentaire, 4 à 7 fois par semaine, était également associée à une diminution de l'inflammation dans les espaces interproximaux (592). Ces résultats sont en accord avec ceux de Crocombe *et al.* qui ont constaté qu'un nettoyage interdentaire régulier était associé à moins de plaque, de tartre et de gingivite (593).

1. Fil dentaire

Traditionnellement, les recommandations pour le nettoyage interdentaire consistaient le plus souvent en l'utilisation du fil dentaire, qui était probablement la méthode la plus universellement applicable (594,595).

L'ADA a rapporté que jusqu'à 80% de la plaque pouvait être éliminée par le fil dentaire (596). Cependant, la plupart des utilisateurs trouvent le fil dentaire difficile et trop long dans son utilisation. Pour faciliter l'utilisation du fil dentaire, des porte-fils manuels ont été fabriqués. Des études ont montré que peu de personnes utilisent correctement le fil dentaire et que les patients ont des difficultés à le passer quand les points de contacts sont trop serrés. Il a été constaté que l'utilisation du fil dentaire sans surveillance n'entraîne pas de réduction substantielle de l'inflammation gingivale (597).

Chez les individus avec une papille intacte qui ne permet que la pénétration du fil dentaire, le fil reste la meilleure option pour le nettoyage interdentaire (590). Toutefois, les professionnels de santé devraient consacrer du temps à motiver et à informer correctement les patients sur l'utilisation du fil dentaire, car l'efficacité dépend de la technique. Les études ont principalement attribué le manque d'efficacité du fil dentaire à la complexité manuelle de la technique et / ou au manque d'observance des patients (598). D'autre part, dans une étude récente menée chez des sujets jeunes sans perte d'attache interdentaire, le brossage des dents associé au fil dentaire pouvait réduire à la fois la plaque et l'inflammation gingivale (599).

Berchier et *al.* ont réalisé une méta-analyse comprenant 11 essais cliniques randomisés (ECR) comparant le brossage des dents et le fil dentaire au brossage des dents seul (600). Les résultats de cette méta-analyse n'ont révélé aucune différence significative entre les groupes en termes d'indice de plaque et d'indice gingival.

En 2011, dans une revue systématique, Sambunjak et *al.* ont étudié l'intérêt d'utiliser du fil dentaire en plus du brossage des dents (594). Cette revue comprenait 12 ECR avec un total de 582 participants. A l'inverse de Berchier et *al.*, les auteurs ont conclu que le brossage des dents combiné au fil dentaire réduisait la gingivite par rapport au brossage des dents seul. L'apport de l'utilisation du fil dentaire en plus du brossage quotidien pour la prévention de la gingivite à court et moyen terme a été confirmé dans une récente revue Cochrane (13). A l'inverse, les résultats concernant la réduction de la plaque dentaire étaient variables et discordants (13). Aucune information en termes de prévention de la carie dentaire n'était disponible en raison des courtes périodes d'essai et des difficultés de détection de la carie précoce. La littérature actuelle n'est pas en faveur de l'utilisation du fil dentaire comme principal accessoire d'hygiène interdentaire. Des ECR à long terme avec des populations de taille d'échantillon plus importantes et des études rétrospectives sont nécessaires pour augmenter la force des données (592).

2. Jets dentaires

Introduits en 1962, ils ont été conçus pour éliminer la plaque et les débris mous par l'action mécanique d'un courant d'eau qui peut également contenir des agents antimicrobiens (601). Les études ont montré que ce dispositif était sans danger et qu'il n'avait aucun effet négatif sur l'épithélium de jonction. Bien que les forces de pulsation et hydrodynamiques produites par les irrigants puissent éliminer les débris alimentaires des zones interdentaires et rétensives, l'irrigation ne peut être une monothérapie pour éliminer le biofilm, mais doit rester un complément à d'autres mesures de contrôle mécanique de la plaque. Le flux de fluide peut être pulsé ou continu. Il a été rapporté qu'un flux d'eau pulsé est préférable à un flux continu (602,603). Une étude au microscope

électronique à balayage *ex vivo* a démontré que les forces hydrauliques et la pulsation d'un jet d'eau dentaire peuvent éliminer le biofilm situé au-dessus ou au-dessous de la JEC (604).

Plusieurs études ont mis en évidence l'efficacité des jets dentaires par rapport à d'autres dispositifs interdentaires pour réduire les saignements et la plaque dentaire (602,605–611). L'étude de Barnes (606) d'une durée de 28 jours incluait 105 sujets au total. Parmi ceux-ci, 35 utilisaient une brosse à dent manuelle et le fil dentaire ; 35 une brosse à dents manuelle et le jet dentaire ; et les 35 derniers une brosse à dent sonique et le jet dentaire. Au bout de 14 et 28 jours, les deux groupes utilisant le jet dentaire associé à une brosse à dent manuelle ou sonique avaient un indice de saignement significativement plus bas que le groupe utilisant la brosse à dent manuelle et le fil dentaire.

L'utilisation des jets dentaires peut également être étendue à la maintenance implantaire (612).

Dans une revue Cochrane de 2019, Worthington et *al.* ont conclu que le brossage des dents et le jet dentaire peuvent réduire la gingivite à court terme, mais rien ne le prouve à moyen terme (613). Aucune preuve d'une différence en termes de plaque dentaire n'a été mise en évidence. Cependant, il existe des preuves que le jet dentaire peut être meilleure que l'utilisation du fil dentaire pour réduire la gingivite (mais pas la plaque dentaire) à court terme.

Pour expliquer la divergence des résultats obtenus entre la diminution de la gingivite et la non-réduction de la plaque dentaire, des auteurs ont émis l'hypothèse qu'avec le jet dentaire, les parodontopathogènes clés sont modifiées, ce qui réduirait l'inflammation gingivale. Il est également possible que l'activité bénéfique d'un jet dentaire soit dû en parti à l'élimination partielle des dépôts alimentaires et des débris, à l'élimination de la plaque vaguement adhérente par la plaque, à l'élimination des cellules bactériennes, à la stimulation des réponses immunitaires et à l'interférence avec la maturation de la plaque (614). D'autres possibilités incluent une stimulation mécanique de la gencive ou une combinaison de facteurs présumés antérieurs. Les irrigants buccaux pourraient réduire l'épaisseur de la plaque qui peut ne pas être détectée par les systèmes de notation bidimensionnelle. Ce fait pourrait également expliquer l'absence d'effet sur la réduction de la plaque mais sur l'effet positif sur l'inflammation gingivale (615).

Les mécanismes d'action des jets dentaires ne sont pas clairs et d'autres ECR sont nécessaires pour étudier leur efficacité en complément des mesures d'hygiène orale régulières pour le maintien à long terme de la santé parodontale.

3. Brossettes interdentaires

Un autre dispositif de nettoyage interdentaire est la BID qui a été introduites dès 1976 comme alternative au fil dentaire (616). Une revue systématique a conclu que l'élimination de la plaque interdentaire avec une BID était la méthode la plus efficace pour le nettoyage interproximal (600). Dans un ECR, Christou et *al.* ont comparé l'efficacité clinique du fil dentaire et de la BID, en complément du brossage des dents. Après une période de 6 semaines, l'utilisation de la BID s'est avérée plus efficace dans l'élimination de la plaque et dans la réduction de la poche parodontale alors qu'aucune différence en termes de scores de saignement n'a été relevé (617). L'analyse de ces données par modélisation à l'aide d'une équation structurelle a démontré que la réduction de la profondeur des poches chez les utilisateurs de BID était due à l'élimination de la plaque et non à la dépression mécanique de la papille interdentaire (618). Dans un autre ECR, la BID et le fil dentaire ont montré des effets similaires sur la plaque sous-gingivale et l'inflammation gingivale. Cependant, les patients ont préféré la BID au fil dentaire en raison de la facilité d'utilisation (617,619,620).

Slot et *al.* ont procédé à une revue systématique pour évaluer l'efficacité des BID et autres dispositifs de nettoyage interdentaires sur la plaque et les paramètres de l'inflammation parodontale (14). En ce qui concerne la plaque, l'utilisation supplémentaire de la BID a entraîné une réduction de la plaque significativement plus importante par rapport au brossage des dents seul. Aucune différence n'a été trouvée pour l'indice gingival ou les indices de saignement. Poklepovic et *al.*, avec la standardisation des résultats obtenus à partir de différents indices parodontaux, ont trouvé que l'utilisation complémentaire de la BID au brossage donne des réductions de 34 et 32% de la gingivite et des scores de plaque (621).

Pour améliorer la facilité d'utilisation, en particulier dans les régions prémolaire et molaire, des BID inclinés ont été introduites. Jordan et *al.* ont rapporté une meilleure efficacité d'élimination de la plaque avec une BID droite par rapport à une BID inclinée (622). Cependant, aucun examen systématique n'est disponible en ce qui concerne l'évaluation de l'efficacité d'une BID droite ou inclinée (622).

La BID représente actuellement la méthode principale et la plus efficace pour réaliser le nettoyage interproximal comparée au brossage seul ou à l'utilisation combinée du brossage et du fil dentaire (623,624,620,625,626). Dans une revue Cochrane de 2019, Worthington et *al.* ont conclu que l'utilisation des BID en complément du brossage diminuait la plaque et la gingivite plus efficacement qu'un brossage seul (627).

Le choix de la taille de la BID est le point clé de l'efficacité clinique interdentaire. Le 11^{ème} « European Workshop in Periodontology on the primary prevention of periodontal diseases » a

publié un rapport recommandant aux professionnels, d'enseigner à leurs patients l'utilisation de la BID, en cas d'inflammation gingivale, de récession gingivale, de perte d'attache et d'exposition radiculaire (628). Cependant, lorsque l'espace interdentaire est rempli par les papilles, en particulier chez les jeunes, le fil dentaire est le meilleur choix pour atteindre cette zone (629). Les BID ont la capacité d'atteindre les sillons ou fissures interdentaires par rapport aux autres dispositifs de nettoyage interdentaires (590,630).

L'ensemble de ces études ont été réalisées chez des personnes présentant des signes de gingivites ou de parodontite mais peu de données existent concernant l'adulte sain.

Une étude transversale de 2016 réalisée chez de jeunes adultes sains (absence de signes de MP) âgés de 18 à 25 ans, a montré que les BID pouvaient être utilisés chez tous les sujets et que les BID pouvaient être utilisées dans 94% des sites interdentaires (Figure 20)(580).

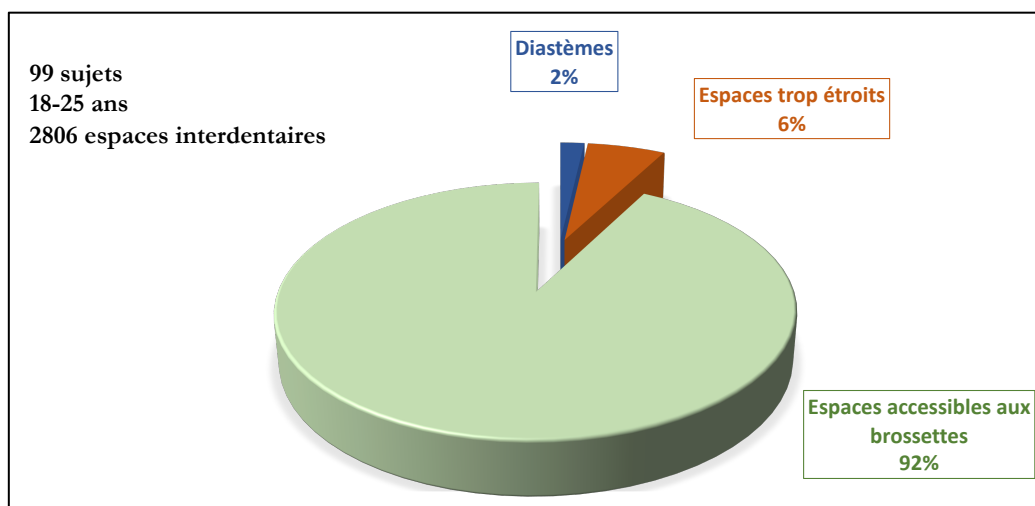


Figure 20. Répartition de 2806 espaces interdentaires chez 99 sujets âgés de 18 à 25 ans (10).

56 espaces interdentaires présentaient un diastème, 168 espaces interdentaires étaient trop étroits pour permettre le passage d'une brossette interdentaire et 2582 espaces interdentaires permettaient le passage d'une brossette interdentaire.

Les sites interdentaires non accessibles au BID étaient situés dans les zones antérieurs (Figure 21). Les espaces interdentaires postérieurs nécessitaient l'utilisation de BID de diamètre supérieur aux espaces interdentaires antérieurs (580).

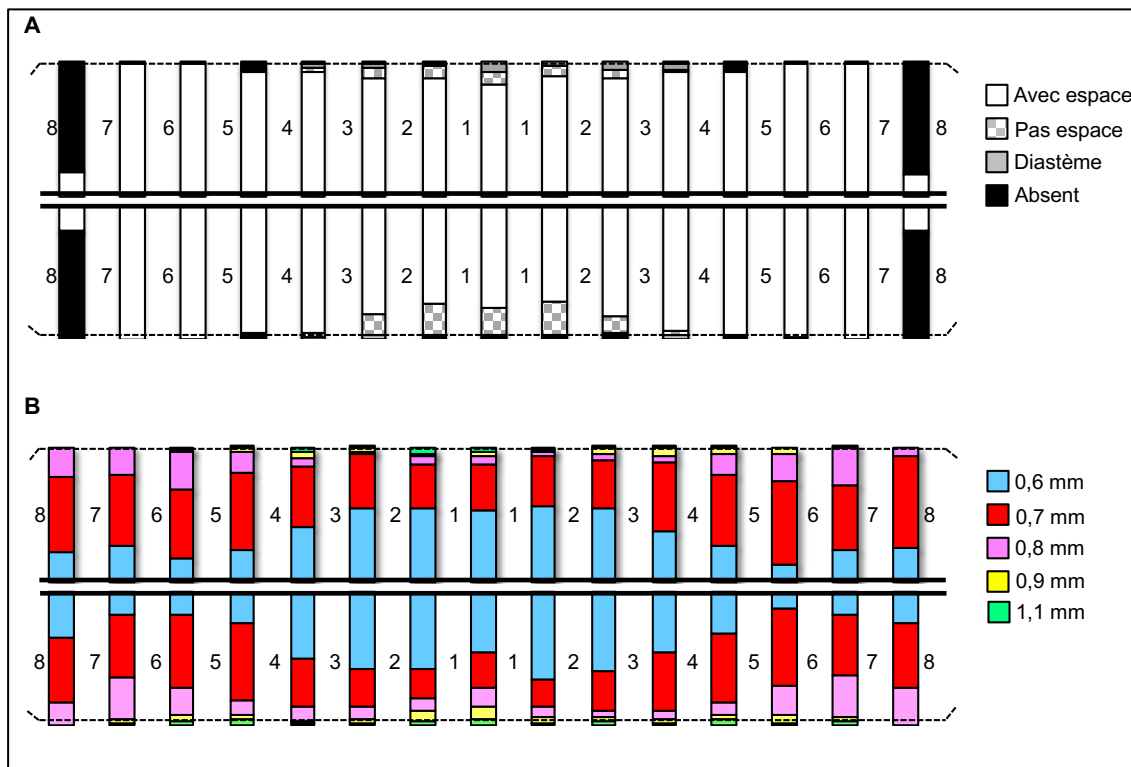


Figure 21. Distribution des caractéristiques dans les sites interproximaux (30/sujet), en barres, chez 99 adultes (10).

A. Répartition des sites interdentaires (99x30 = 2970 sites) selon le type de dent.

B. Répartition des différents diamètres interdentaires des 2408 sites accessibles aux brossettes interdentaires.

En ce qui concerne la détermination de la taille appropriée, la BID doit s'adapter à la zone interdentaire et se déplacer sans induire d'abrasion des tissus durs, ni de traumatisme des tissus mous. Une utilisation inappropriée ou une sélection de taille inappropriée peut entraîner une hypersensibilité dentinaire ainsi que des lésions des tissus mous (631). Le choix de la taille de la BID adaptée à la morphologie de la bouche est empirique, avec un risque de sous-dimensionnement avec un impact sur l'efficacité et un surdimensionnement avec un impact sur l'acceptabilité, l'efficacité et le traumatisme des gencives. De même, l'accessibilité des zones à nettoyer est un critère fondamental pour motiver les utilisateurs. Prescrit à l'origine pour les grands espaces interdentaires, les BID ont ensuite été recommandés pour les espaces interdentaires mixtes et étroits compte tenu de la grande variété de diamètres disponibles (621). Certains cas ne permettront pas le passage d'une BID, comme des chevauchements importants ou la présence d'un diastème large (632). Le principe de base est d'utiliser les BID qui s'adaptent facilement à l'espace interdentaire et dont les soies peuvent atteindre les surfaces dentaires pour perturber le biofilm.

Le choix d'une BID calibrée à l'espace interdentaire reste un choix souvent empirique. La mise au point d'une sonde colorimétrique de diamètre progressif, basée sur le modèle de sonde à

indice parodontale communautaire de l'OMS (Community Periodontal Index of Treatment Needs CPITN), apparaît comme indispensable dans le choix du diamètre optimal des BID (Figure 22)(633,634). En 2015, Bourgeois et *al.* ont montré que l'utilisation d'une sonde colorimétrique permettait de déterminer le diamètre de la BID adapté à l'espace interdentaire de manière plus efficace qu'en l'absence de sonde (635).

Concrètement, la procédure consiste à introduire la sonde colorimétrique dans l'espace interdentaire vestibulaire, en l'insérant complètement, puis en notant la couleur émergeant de l'espace interdentaire du côté vestibulaire. La pression utilisée pour introduire l'embout de la sonde à la base des sites interdentaires est d'environ 50 N/cm^2 (force de 0,20 g)(635,636,10,637). A chaque couleur correspond un diamètre de BID.

Ainsi l'utilisation d'une sonde colorimétrique permet de choisir une sonde calibrée à l'espace interdentaire qui va permettre de désorganiser le biofilm sans induire de traumatisme gingival chez de jeunes adultes sains dans la quasi-totalité des sites interdentaires (10,635).

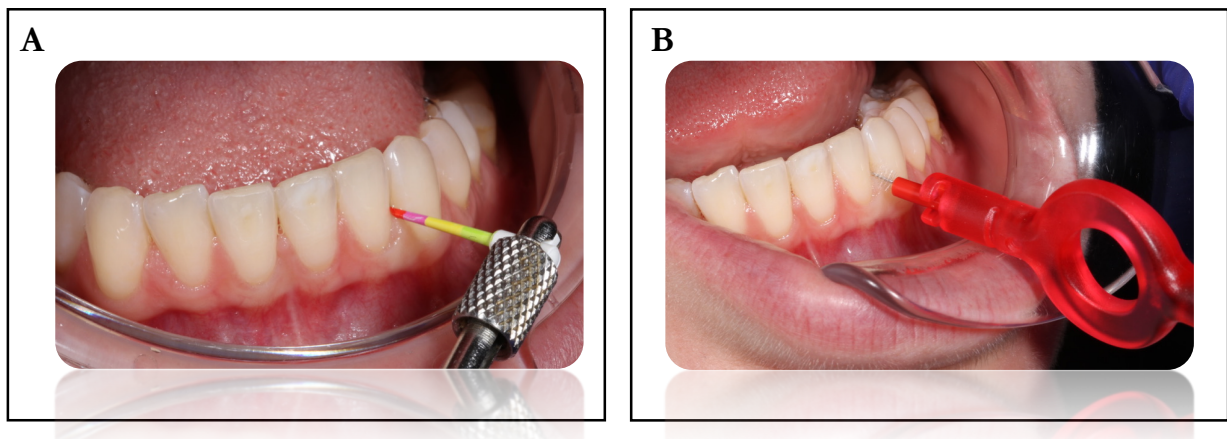


Figure 22. Photographies intra-orales chez une adolescente de 17 ans au niveau de l'arcade mandibulaire antérieure.

A. Passage de la sonde colorimétrique dans l'espace interdentaire.

B. Passage de la brosse interdentaire calibrée et adaptée à l'espace interdentaire.

D'autre part, chez les jeunes adultes sains, qui ne présentent pas de signes cliniques de gingivite ni de parodontite (reprendre caractéristique PD, CAL...), une inflammation gingivale interdentaire est détectée dans 35% des sites interdentaires (28).

Une étude de 2016 a démontré que l'utilisation quotidienne des BID permettait de lutter contre l'inflammation gingivale interdentaire (638). Pour chaque patient, 4 sites interdentaires localisés entre prémolaire-molaire (15-16, 25-26, 35-36 et 45-46) ont été étudiés. Parmi ces 4 sites étudiés, 2 ont été définis en tant que sites test et 2 en tant que sites contrôle. Les 50 sites test et les

50 sites contrôle ont été randomisés de manière symétrique sur chaque arcade supérieure et inférieure. Au niveau des sites test, après le brossage des dents, les patients ont été formés à l'utilisation des BID calibrées. À T0, le pourcentage de sites saignant au passage de la BID était de 34,8% dans le groupe contrôle et de 35,9% dans le groupe test ($p = 0,88$). Entre 0 et 3 mois, aucune évolution significative du pourcentage de sites présentant des saignements n'a été observée. Dans le groupe test, la pourcentage de sites présentant des saignements a significativement diminué, passant de 35,9% à T0, à 14,6% à 1 semaine, à 10,9% à 1 mois et à 10,4% à 3 mois ($p = 0,008$)(638).

Un nettoyage quotidien efficace des espaces interdentaires est un défi. La perturbation du biofilm interdentaire est considérée comme importante pour le maintien de la santé gingivale, la prévention de la MP et la réduction des lésions carieuses (639). Le contrôle mécanique de la plaque stoppe le développement du biofilm supra-gingival, ce qui permet à la composition du biofilm d'être compatible avec la santé orale chez la plupart des patients (583). Les espaces interdentaires ont donc un rôle majeur et ils sont souvent totalement négligés. Ce sont de véritables niches bactériologiques qui fonctionnent en parfaite autarcie dans la sphère orale. Il est donc indispensable de mettre en place des techniques d'hygiène interdentaire adaptées, afin d'éviter l'apparition de maladies carieuses et/ou parodontales.

**RESULTATS DES ETUDES CLINIQUES SUR LE
MICROBIOTE INTERDENTAIRE**

Microbiote de l'espace interdentaire des adolescents en fonction du risque carieux : un protocole d'étude transversale (ARTICLE 2)

L'article « Microbiota of interdental space of adolescents according to Risk of Caries: A cross-sectional study protocol », accepté le 21 août 2019 dans la revue Contemporary Clinical Trials Communications, décrit le protocole de l'étude clinique « Microbiote Interdentaire des Adolescents en fonction du risque carieux » (MIARC).

Comme décrit précédemment, la carie dentaire est une maladie orale majeure résultant d'une interaction complexe entre le microbiote commensal, la susceptibilité de l'hôte (hérédité, immunité, maladies, etc.) et des facteurs environnementaux (alimentation, hygiène dentaire, etc.). Pour prédire le risque qu'un patient présente de nouvelles lésions carieuses ou que des lésions existantes se propagent, l'évaluation du risque carieux prend en compte des facteurs cliniques, biologiques et comportementaux. Ainsi, l'évaluation du risque carieux peut prédire si le patient présente un risque élevé ou faible de développer une carie. Le praticien peut ainsi mettre en place un suivi adapté au risque du patient. Cependant, bien que les bactéries soient le principal facteur étiologique des lésions carieuses, l'évaluation du risque carieux ne tient pas compte de la quantification bactérienne ou se concentre uniquement sur le niveau de *Streptococcus mutans* dans la salive.

L'objectif principal de ce protocole était de pouvoir identifier et quantifier le microbiote interdentaire présent chez des adolescents âgés de 15 à 17 ans car la majorité des cavités sont interproximales à l'adolescence. L'objectif secondaire était de corréler le microbiote interdentaire avec le risque carieux des adolescents afin de déterminer si de nouveaux biomarqueurs associés à une lésion carieuse pourrait être ajoutée à l'évaluation du risque carieux pour l'améliorer.

Ce protocole était basé sur l'inclusion de 50 adolescents âgés de 15 à 17 ans dont 25 présentant un risque carieux faible et 25 présentant un risque carieux élevé. La catégorisation en fonction du risque carieux a été faite en adaptant la classification du risque carieux des adolescents définie par l'ADA. Cette classification prend en compte différents facteurs tels que des données biologiques (statut socio-économique des parents, fréquence des prises alimentaires), des données concernant le comportement (habitudes de brossage, visite chez le dentiste) et des données cliniques (tests salivaires et ICDAS).

Par la suite, plusieurs indices cliniques ont été relevés tels que l'indice de plaque, l'indice gingival, le diamètre des espaces interdentaires et l'indice de saignement après le passage d'une

brossette interdentaire (BOIB). Des prélèvements ont été réalisés à l'aide de brochettes interdentaires calibrées au niveau de quatre sites interdentaires (15-16, 25-26, 35-36 et 45-46).

Après extraction de l'ADN, une quantification du nombre total de bactéries et de 26 agents pathogènes a été effectuée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel : *Actinomyces odontolyticus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bifidobacterium dentium*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga ochracea*, groupe de *Clostridium IV*, groupe de *Clostridium XIV*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus spp.*, *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Rothia dentocariosa*, *Scardovia wiggisiae*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* et *Veillonella parvula*.



Microbiota of interdental space of adolescents according to Risk of Caries: A cross-sectional study protocol

Camille Inquimbert^{a,b}, Denis Bourgeois^a, Nicolas Giraudeau^b, Paul Tramini^b, Stéphane Viennot^a, Claude Dussart^a, Florence Carrouel^{a,c,*}

^a Systemic Healthcare Laboratory EA4129, Faculty of Medicine Laennec, University Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France

^b Department of Public Health, Faculty of Oral Medicine, University of Montpellier, Montpellier, France

^c Department of Fundamental and Clinical Biological Sciences, Faculty of Oral Medicine, University Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Interdental microbiota
Adolescent
Dental caries
Cariou risk

ABSTRACT

Dental caries is a major oral disease resulting from a complex interaction between the commensal microbiota, host susceptibility (heredity, immunity, diseases, etc.) and environmental factors (diet, dental hygiene, etc.). To predict the patient's risk of new carious lesions or progression of existing lesions, the Caries Risk Assessment (CRA) takes account of clinical, biological and behavioural factors. Thus, the CRA can predict whether the patient is at high or low risk of developing caries. The practitioner can thus set up a follow-up adapted to the risk of the patient. However, although bacteria are the main etiological factor of carious lesions, the CRA does not consider bacterial quantification or just focus on the level of *S. mutans* in the saliva. As the majority of cavities are interproximal in adolescence, the aim of this trial is to identify and quantify the interdental microbiota of adolescents aged from 15 to 17 years with low or high carious risk. So, the quantification of new biomarkers associated with carious lesion could be added to the CRA to improve it.

1. Introduction

Caries is a major oral clinical disorder induced by a compound of microbiota whose composition varies continuously depending on the chemistry and environment of the dental site but also other more general factors such as saliva [1]. The main determinant of the evolution of the biofilm at a particular tooth site is its environment and whether the severity level of the disorder is such that it would lead to demineralization and visible changes at the site [1]. Although caries are clearly bacterial diseases, they are not infectious diseases in the classical sense because they result from a complex interaction between the commensal microbiota, host susceptibility (heredity, immunity, diseases ...) and environmental factors (diet, dental hygiene ...) [2].

The risk factors for caries are clinical, biological and behavioural. They predict the patient's risk of new carious lesions or progression of existing lesions [3]. By analysing all the risk and protective factors for a patient's carious disease, the clinician can assess the patient's risk for the future. This analysis procedure is called a Caries Risk Assessment (CRA) [1]. If there is an increasing interest in incorporating CRA into routine, the determining factors of caries disease are mainly dental practice, age, gender, ethnicity, oral hygiene habits, diet, education and socio-economic status [4].

The CRA for children and adolescents doesn't consider bacterial quantification, a factor highly linked to the development of caries [5]. In fact, the main factor initiating dental decay is the oral microbial dysbiosis [6]. During the carious process, the composition of the microbiota evolves. In the absence of carious lesion, the microbiota of dental enamel is principally composed of non-mutans streptococcal and actinomyces bacteria. Aciduric bacteria, like "low-pH" non-mutans streptococcal bacteria, progressively accumulate. Then, acidogenic and aciduric bacteria, like *streptococcus mutans*, *lactobacillus*, *actinomyces*, and *bifidobacterium*, become dominant [6].

Moreover, depending on the location of the dental site, the risk of developing caries varies considerably [7,8], however CRA tools do not currently use this information. The majority of carious lesions in adolescents, a period during which tooth decay is still very active [9,10], are observed on the interproximal surfaces of posterior teeth due to specific anatomical, physiological, diet-related and histological considerations [11,12]. So, the analysis of the interdental microbiota of adolescents is essential for improving our understanding of the carious process factors and for providing means to facilitate caries prediction and prevention.

This trial aims to identify as well as quantify interdental microbiota in adolescents aged from 15 to 17 years. As a contribution to increase the sensitivity of CRA, the secondary outcome is to evaluate qualitatively and

* Corresponding author. Systemic Healthcare Laboratory EA4129, Faculty of Medicine Laennec, University Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France.
E-mail address: florence.carrouel@univ-lyon1.fr (F. Carrouel).

<https://doi.org/10.1016/j.conctc.2019.100444>

Received 22 April 2019; Received in revised form 21 July 2019; Accepted 21 August 2019

Available online 18 October 2019

2451-8654/ © 2019 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

quantitatively the microbiota of interdental space association according to Carious Risk.

2. Methods

2.1. Ethics statement

The protocol and design of the study named MIARC “Microbiota of Interdental space of Adolescents according to Risk of Caries”, have been endorsed by ethical and regulatory authorities and will be carried out in conformance with the Declaration of Helsinki. The Protection of Individuals Board of South-Est VI (France) approved the protocol on November 6, 2017. The National Agency for Medical and Health Product Safety registered it on February 13, 2017 (ID-RCB ref: 2017–A00425–48). The National Commission for Information Technology and Liberties gave its approval on November 6, 2017. This study was registered with ClinicalTrials.gov (identification number NCT03700840).

All participants, their parents or legal guardians will give their informed consent before participating in the study. The consent form will be composed of the following details: name and affiliation of investigator, explanations concerning the aim readily understandable by all, the course and the duration of the study, as well as the freedom to withdraw at any time, the endorsement of the ethics committee and the guarantee of confidentiality. Each participant will receive oral assessment free of charge.

2.2. Study design, site and population

The MIARC trial is a cross-sectional observational clinical study (Fig. 1). The cross-sectional studies guidelines set out in the statement, Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE), will be followed [13]. Programmed for a period of 2 months in 2019, the MIARC trial will be conducted with healthy adolescents aged 15–17 years at the Dentistry Clinic Department of the Hospital of Montpellier, France. Most of the patients belong to an urban and mainly low-income population living in or around Montpellier. However, in some cases, patients come from far away to have specific care under general anaesthetic or for non-standard dental or medical treatments.

Patients will be recruited during their follow-up visit in the Public Health Department of the Oral Medicine Hospital. All potential participants (Caucasian subjects aged 15–17 years) will receive a document about the study. A toll-free number will be made available for potential participants to obtain additional information should they wish. Adolescents who agree to participate will be provided with verbal and written information about the study. They will then be interviewed at the reception area of the Public Health Department. The oral examination will be conducted at the dentistry clinic to verify the individual eligibility criteria. All patients will be contacted again to schedule an appointment if they agree.

2.3. Study population

Fifty Caucasian subjects will be selected from a group of first-time volunteers. The male/female ratio will be 1.0 as well as the CRA high risk/low risk ratio in the enrolled population.

The individual eligibility criteria are (i) aged 15–17 years-old, (ii) presence of teeth (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46), (iii) having at least 22 natural teeth, (iv) good understanding of the French language, (v) one of the parents/legal guardians accepts the study's terms and conditions and signs the informed consent form, (vi) the adolescent accepts the terms and conditions of the study and signs the informed consent form. Moreover, the eligibility of the participant depends upon the presence of all his/her four premolar-molar pairs.

The clinical interdental site inclusion criteria are: (i) interdental brushes can penetrate into the four sites analysed, (ii) absence of diastemata, (iii) no interdental caries or prosthetics restorations in the

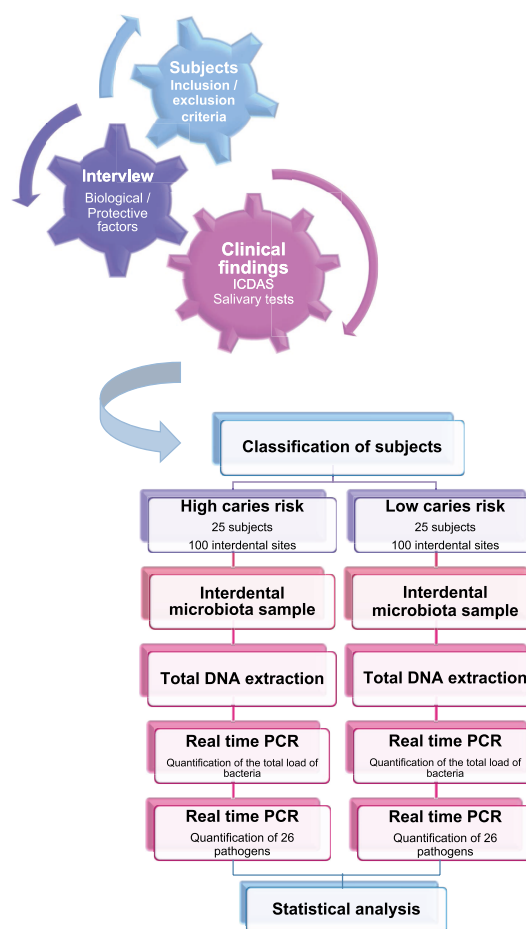


Fig. 1. Workflow of the experiment. ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; PCR: Polymerase Chain Reaction.

teeth surrounding the interdental sites, (iv) absence of oral inflammation and bleeding on probing (BOP) after 30 s, (v) no clinical attachment loss (CAL) > 3 mm or pocket depth (PD) > 3 mm.

The criteria for exclusion are: (i) smokers, (ii) having an immune system disorder, (iii) having any other concomitant systemic illness, (iv) taking medication, (v) had a professional prophylaxis within the 4 weeks preceding the initial examination, (vi) taken antibiotics in the past 3 months, (vii) regularly using interdental brushes and/or dental floss and/or mouthwash, (viii) having a history of periodontal disease or treatment, (ix) undertaking a course of dental or orthodontic treatment, and (x) unable to answer questions or non-cooperative.

2.4. Repartition of subjects according to caries risk conditions

The American Academy of Pediatric Dentistry [3] sets out criteria which will be used, with certain modifications, to classify patients according to their carious risk (Table 1). The low carious risk subjects presented Caries Protective Terms, i.e., brushing daily with fluoridated toothpaste and regular dental care, Caries Risk Indicators, i.e., socio-economic status (medium, high) and snacking (low, medium) and Clinical Indicators, i.e., less than one interproximal lesion and no

Table 1
Adolescent caries risk assessment.

FACTORS	HIGH RISK	LOW RISK
Biological (interview)		
- Patient with low socioeconomic status	Yes	No
- Patient has > 3 between meal sugar-containing snacks or beverages per day	Yes	No
Protective (interview)		
- Patient brushes teeth daily with fluoridated toothpaste	No	Yes
- Patient has regular dental care	No	Yes
Clinical Findings (International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and salivary tests)		
ICDAS		
- Patient has > 1 interproximal lesion	Yes	No
- Patient has active white spot lesions or enamel defects	Yes	No
Salivary tests (hydration, salivary consistency, resting saliva pH, stimulated saliva flow, stimulated saliva pH and saliva buffering capacity)		
- Patient has high salivary risk	Yes	No

enamel defects nor active white spot lesions and adequate saliva flow rate. The high carious risk subjects presented Caries Protective Terms, i.e., no daily brushing with fluoridated toothpaste and/or irregular dental care and/or Caries Risk Indicators, i.e., low socio-economic status and high snacking and/or Clinical Indicators, i.e., more than one interproximal lesion and/or active white spot lesions and/or enamel defects and/or inadequate saliva flow rate.

2.5. Clinical examination

One trained and calibrated dentist who is experienced with the clinical indices will perform the clinical examination.

2.5.1. Dental examination

In reference to the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) criteria [14], adolescents will receive a clinical oral examination. After removing the dental plaque with a toothbrush or a professional prophylaxis, drying with gauze or air (5 s), the teeth will be observed under light (Orascope Endeavor headlamp system) without magnification and, a ball-end probe (WHO probe) could be used to determine the ICDAS score. This score will permit to determine the presence or absence of carious lesion (code 0: absence of carious lesion, code 1 to 6: carious lesion at different stages) [14]. There will be no radiography carried out. Adolescents will be informed of any conditions requiring treatment.

2.5.2. Salivary tests

This aims at investigating hydration, salivary consistency, resting saliva pH, stimulated saliva flow, stimulated saliva pH and saliva buffering capacity. All tests will be performed according to the instructions of the manufacturer (Saliva-Check Buffer test, GC France SAS, Sucy-en-Brie, France). All patients were refrained from eating, drinking, smoking, and performing oral hygiene procedures for 2 h before saliva collection. The tests will be realized 30 min after awakening at least, between 9:00 a.m. and 11:00 a.m. [15–17]. The resting saliva consistency will be classified as sticky frothy or frothy bubbly or watery clear by observing the saliva in the floor of the mouth. The resting flow saliva will be evaluated by measuring the time to see new saliva droplets after drying the lip labial mucosa with a gauze (> 60 s: low resting flow rate, 30–60 s: normal resting flow rate, < 30 s: high resting flow rate). The resting saliva pH will be measured with a pH strip (pH 5.0–5.8: highly acidic saliva, pH 6.0–6.8: moderately acidic saliva, pH 6.8–7.8: healthy saliva). The stimulated salivary flow rate will be analysed as the volume of saliva collected while the patient chewed a paraffin pellet for 5 min (< 3.5 ml: very low, 3.5–5 ml: low, > 5 ml: normal). The salivary buffering capacity will be evaluated by depositing stimulated saliva on a test strip containing three different acid challenges.

2.6. Interdental microbiota sample

Four interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46), free from caries (ICDAS code 0), will be assessed for each subject. The adapted interdental brush (Curaden, Kriens, Switzerland) will be determined by using a Curaprox IAP calibration probe (Curaden) [18]. Then, the isolation of each tooth selected for sampling will be performed by using sterile dental cotton rolls and a calibrated, sterile interdental brushes (IDB) will serve to remove the interdental biofilm. The IDBs containing the individual samples will be stored in sterile tubes at 4 °C for later laboratory treatment [19,20].

2.7. Microbiological analysis

Quantification of the total number of bacteria and 26 pathogens will be performed by real-time PCR. The pathogens selected periodontal or carious bacteria: *Actinomyces odontolyticus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Bifidobacterium dentium*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Clostridium cluster IV*, *Clostridium cluster XIV*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Lactobacillus* spp., *Parvimonas micra*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Rothia dentocariosa*, *Scardovia wiggsiae*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, and *Veillonella parvula*. Simplex quantitative real-time PCR assays will be performed in a volume of 10 µL (2 µL of DNA extract, 1 × SYBR® Premix Ex Taq™ Tli RNaseH Plus and 1 µM of each primer) (TaKaRa, Shiga, Japan).

2.8. Statistical analysis

2.8.1. Sample size

With an alpha error of 5% (2-sided test), a power of 80%, an intraclass correlation coefficient of 0.8 and a mean difference of bacteria counts between the two caries risk groups of 1,300,000, a total of 200 sites, meaning 50 subjects, needs to be selected.

2.8.2. Analysis

Three main steps will be realized: preparation of descriptive summaries, modelling using a mixed (linear) model and correlating bacterial abundances. A mixed linear model for the log-count abundance of each species at a measured site will be used to test for potential effects of gender, interdental space and the location of each site. Two categorical variables (site location and gender), and one numerical variable (interdental space) will be modelled as fixed effects and one categorical variable will be modelled as a random effect (subject). This random effect will be included to model correlation between the four interdental sites of a given study participant. In the regression, each coefficient will be tested according to the null hypothesis which indicates that the coefficient is zero when a likelihood-ratio test is applied. The p-values less than 0.001, 0.05, and 0.01 will be respectively considered strong, medium and low evidence with respect to the null hypothesis. To perform the correlation analysis and avoid over-estimating the inter-site correlation, the residuals of the model described above will be used. The trees associated with the correlation plot will be generated by hierarchical cluster analysis with complete linkage. Other multivariate analyses, such as factor analysis, will be used to graphically check the correlations between bacteria quantification and all potential caries risk factors. A multilevel logistic regression analysis will finally be performed to test which oral characteristics are significantly linked with the two caries risk groups. The linear mixed effects modelling package, lme4 [21] in R environment [22] will be used to generate all statistical analyses and associated plots.

3. Discussion

To our knowledge, the MIARC trial is the first cross-sectional clinical study which analyses the interdental microbiota according to the caries risk factors of adolescents aged 15–17 years.

The sampling of site-specific microbiota for analysing the molecular properties of caries needs to reflect the localised nature of this clinical disorder. A previous study has demonstrated that the proximal surfaces were the most exposed surfaces, after the occlusal surfaces to carious lesions [23]. Indeed, the risk of interproximal carious lesions is important among the high-risk adolescents, mainly due to the lack of compliance with caries-prevention programs in this group [24]. In children aged 12 years, the prevalence of interproximal caries is 39% and increases to 72% at 20–21 years [25]. Enamel lesions on the approximal surfaces among 16-year-olds account for more than 80% of all caries lesions on these surfaces, no matter whether the caries prevalence in the population is high or low [26].

Whilst no standard benchmark or criteria for evaluating a CRA's quality exists, a universal rating of the clinical examination from 'low to high' will be used in this study for testing the criterion validity of carious risk. The classification criteria for CRA systems were determined by combining scientific evidence and expert opinion. From these CRAs, practitioners analyse the various clinical and social factors of a patient and can thus assign a carious risk status [27]. Our study classified patients into two risk categories: low carious risk and high carious risk. There is no necessity for further preventive professional treatment for the low risk patients and they should be offered an extended follow-up [28]. For high-risk patients, preventive actions must be taken to reduce the incidence and severity of future carious lesions [28]. This individual scheduling of preventive and follow-up activity better appropriates the use of dental resources and lowers dental costs for certain individuals [28].

In some CRA classifications, the quantification of *S. mutans* in the saliva is considered [3]. However, the results concerning the link between *S. mutans* and the development of dental caries is not clear. Some studies demonstrated a real association between *S. mutans* and the carious lesion whereas others revealed no clear association [29]. Moreover, the amount of *S. mutans* needed to initiate the carious lesion varies according to the study [30]. Recent studies revealed that the decrease of the taxonomy and the presence of key pathogens are signals preceding the carious disease [31,32]. The issue of one pathogen could be integrated with the interdental microbiota taxonomy variation. Thus, to use *S. mutans* or other bacteria as a biomarker in the CRA classification, it is necessary to identify specific biomarkers associated with carious lesions and to normalize their quantification. For this, the MIARC study had the advantage of an extensive sample of interproximal sites. Moreover, although the list is not exhaustive, the bacteria identified by the real-time PCR technique correspond mainly to those identified in the current literature as being potentially at cariogenic risk.

As we will focus on interdental microbiota, results should be more significant and correlated to the carious risk. The real-time PCR method presents the advantage of quantifying bacteria specifically. Furthermore, comparatively speaking, this method is straightforward, economical and reliable [33].

Recent progress achieved in understanding the "systems biology" of dental caries has broadened the research beyond individual factors (e.g., fluoride content, salivary pH, or measuring quantities of bacterial species) and has established a platform for the advancement of innovative approaches in caries diagnosis and management [34]. This advancement will certainly be facilitated by the development of innovative applications to monitor biomarkers and manifestations of disease as they occur.

Thus, the MIARC trial allows one to evaluate if carious pathogens are present in the interdental space of adolescents and to determine if the interdental microbiota of adolescents with a high carious risk is

different from the one of adolescents with a low carious risk. This should allow one to determine a specific biomarker of each carious risk. This quantification of determined bacteria could be added to CRA to improve them. This study should help optimize recommendations in terms of oral prevention in this at-risk age group. Furthermore, the expected results will provide new information on the association between the level of carious risk, measurement of the state of oral hygiene, clinical signs of gingival inflammation, diameter of the interdental spaces and interdental microbiota composition.

In conclusion, the MIARC study is a first step before further studies, ideally longitudinal clinical studies encompassing large populations which would identify the panel of bacteria as prospective oral health markers. With this new data, oral health professionals will be able to collect and analyse interdental microbiota to prevent the risk of new caries.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors.

Declaration of competing interest

All other authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

Not applicable.

References

- [1] D.A. Young, J.D.B. Featherstone, Caries management by risk assessment, *Community Dent. Oral Epidemiol.* 41 (2013) e53–63, <https://doi.org/10.1111/cdoe.12031>.
- [2] W.G. Wade, The oral microbiome in health and disease, *Pharmacol. Res.* 69 (2013) 137–143, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.11.006>.
- [3] Caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents, *Pediatr. Dent.* 39 (2017) 197–204.
- [4] Y. Tafere, S. Chanie, T. Dessie, H. Gedamu, Assessment of prevalence of dental caries and the associated factors among patients attending dental clinic in Debre Tabor general hospital: a hospital-based cross-sectional study, *BMC Oral Health* 18 (2018) 119, <https://doi.org/10.1186/s12903-018-0581-8>.
- [5] X. Gao, C.-Y.S. Hsu, T. Loh, B. Hwang, D. Koh, Role of microbiological factors in predicting early childhood caries, *Pediatr. Dent.* 36 (2014) 348–354.
- [6] N. Takahashi, B. Nyvad, The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives, *J. Dent. Res.* 90 (2011) 294–303, <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>.
- [7] P.A. Batchelor, A. Sheiham, Grouping of tooth surfaces by susceptibility to caries: a study in 5–16 year-old children, *BMC Oral Health* 4 (2004) 2, <https://doi.org/10.1186/1472-6831-4-2>.
- [8] J.R. Shaffer, X. Wang, R.S. Desensi, S. Wendell, R.J. Weyant, K.T. Cuenco, et al., Genetic susceptibility to dental caries on pit and fissure and smooth surfaces, *Caries Res.* 46 (2012) 38–46.
- [9] Clinical Affairs Committee, American Academy of Pediatric Dentistry, Guideline on adolescent oral health care, *Pediatr. Dent.* 37 (2015) 49–56.
- [10] A. Muntean, A.S. Mesaros, D. Festila, M. Mesaros, Modern management of dental decay in children and adolescents - a review, *Clujul Med.* 88 (1957 2015) 137–139, <https://doi.org/10.15386/cjmed-401>.
- [11] H. Stenlund, I. Mejäre, C. Källestål, Caries incidence rates in Swedish adolescents and young adults with particular reference to adjacent approximal tooth surfaces: a methodological study, *Community Dent. Oral Epidemiol.* 31 (2003) 361–367.
- [12] F. Schwendicke, S. Paris, M. Stolpe, Detection and treatment of proximal caries lesions: milieu-specific cost-effectiveness analysis, *J. Dent.* 43 (2015) 647–655, <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.009>.
- [13] E. von Elm, D.G. Altman, M. Egger, S.J. Pocock, P.C. Gøtzsche, J.P. Vandenbroucke, et al., The strengthening of reporting of observational studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies, *Int. J. Surg. Lond. Engl.* 12 (2014) 1495–1499, <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.07.013>.
- [14] B. Dikmen, Icdas II criteria (international caries detection and assessment system), *J. Istanbul Univ. Fac. Dent.* 49 (2015) 63–72, <https://doi.org/10.17096/jiufd.38691>.
- [15] Y. Ericsson, Clinical investigations of the salivary buffering action, *Acta Odontol. Scand.* 17 (1959) 131–165, <https://doi.org/10.3109/00016355908993928>.
- [16] S. Chiappin, G. Antonelli, R. Gatti, E.F. De Palo, Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 383 (2007) 30–40, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>.

- [17] R.M. Nagler, O. Hershkovich, Relationships between age, drugs, oral sensorial complaints and salivary profile, *Arch. Oral Biol.* 50 (2005) 7–16, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.07.012>.
- [18] D. Bourgeois, F. Carrouel, J.C. Llodra, M. Bravo, S. Viennot, A colorimetric interdental probe as a standard method to evaluate interdental efficiency of interdental brush, *Open Dent. J.* 9 (2015) 431–437, <https://doi.org/10.2174/1874210601509010431>.
- [19] F. Carrouel, S. Viennot, J. Santamaria, P. Veber, D. Bourgeois, Quantitative molecular detection of 19 major pathogens in the interdental biofilm of periodontally healthy young adults, *Front. Microbiol.* 7 (2016), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00840>.
- [20] D. Bourgeois, A. David, C. Inquibert, P. Tramini, N. Molinari, F. Carrouel, Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults, *PLoS One* 12 (2017) e0185804, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804>.
- [21] D. Bates, M. Mächler, B. Bolker, S. Walker, Fitting linear mixed-effects models using lme4, *J. Stat. Softw.* 67 (2015) 1–48, <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- [22] F. Brouers, Statistical foundation of empirical isotherms, *Open J. Stat.* 04 (2014) 687–701, <https://doi.org/10.4236/ojs.2014.49064>.
- [23] Ilona Wojcik-Checincka, Agnieszka Mojsym, Agnieszka Loj-Maczulska, Renata Chalas, Specifics of proximal caries and their diagnostics in posterior teeth, *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 28 (2015).
- [24] H. Hausen, How to improve the effectiveness of caries-preventive programs based on fluoride, *Caries Res.* 38 (2004) 263–267, <https://doi.org/10.1159/000077765>.
- [25] I. Mejäre, I.C. Källest, H. Stenlund, Incidence and progression of approximal caries from 11 to 22 years of age in Sweden: a prospective radiographic study, *Caries Res.* 33 (1999) 93–100, <https://doi.org/10.1159/000016502>.
- [26] A. Alm, L.K. Wendt, G. Koch, D. Birkhed, Prevalence of approximal caries in posterior teeth in 15-year-old Swedish teenagers in relation to their caries experience at 3 years of age, *Caries Res.* 41 (2007) 392–398, <https://doi.org/10.1159/000104798>.
- [27] B.W. Chaffee, J.D.B. Featherstone, S.A. Gansky, J. Cheng, L. Zhan, Caries risk assessment item importance, *JDR Clin. Transl. Res.* 1 (2016) 131–142, <https://doi.org/10.1177/2380084416648932>.
- [28] D.B. Rindal, W.A. Rush, N.A. Perrin, G. Maupomé, J.D. Bader, Outcomes associated with dentists' risk assessment, *Community Dent. Oral Epidemiol.* 34 (2006) 381–386, <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2006.00294.x>.
- [29] L. Guo, W. Shi, Salivary biomarkers for caries risk assessment, *J. Calif. Dent. Assoc.* 41 (107–9) (2013) 112–118.
- [30] B. Krasse, S. Fure, Root surface caries: a problem for periodontally compromised patients, *Periodontology* 2000 4 (1994) 139–147.
- [31] E. Hajishengallis, Y. Parsaei, M.I. Klein, H. Koo, Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries, *Mol. Oral Microbiol.* 32 (2017) 24–34, <https://doi.org/10.1111/omi.12152>.
- [32] H. Xu, J. Tian, W. Hao, Q. Zhang, Q. Zhou, W. Shi, et al., Oral microbiome shifts from caries-free to caries-affected status in 3-year-old Chinese children: a longitudinal study, *Front. Microbiol.* 9 (2018), <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02009>.
- [33] C.J. Smith, A.M. Osborn, Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology, *FEMS Microbiol. Ecol.* 67 (2009) 6–20, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>.
- [34] K. Divaris, Predicting dental caries outcomes in children, *J. Dent. Res.* 95 (2016) 248–254, <https://doi.org/10.1177/0022034515620779>.

Le microbiome bactérien oral des surfaces interdentaires chez les adolescents en fonction du risque carieux (ARTICLE 3)

L'article « The Oral Bacterial Microbiome of Interdental Surfaces in Adolescents According to Carious Risk » a été accepté le 4 septembre 2019 dans la revue *Microorganisms*. Il présente les résultats de l'étude Clinique MIARC obtenus suite à la mise en œuvre du protocole présenté dans l'article « Microbiota of interdental space of adolescents according to Risk of Caries: A cross-sectional study protocol ».

L'objectif de cette étude était d'analyser quantitativement et qualitativement le microbiote interdentaire d'adolescent âgés de 15 à 17 ans et de le corrélérer avec le risque carieux.

Lors de l'inclusion, les deux groupes d'adolescents (risque carieux faible ou élevé), ne présentaient aucune différence significative en ce qui concerne leur âge, leur sexe et leurs caractéristiques cliniques (indice de plaque, indice gingival et saignement interdentaire). Les adolescents étaient âgés d'environ 17 ± 0.77 ans et présentaient $27,6 \pm 1.1$ dents en bouche (dents de sagesse exclues). L'absence de dents (1,3%) résultait d'un traitement orthodontique ou d'agénésie (0,95%) ou de caries (0,35%). Une bonne hygiène orale a été observée dans les deux groupes qui avaient un indice de plaque compris entre 1,0 et 1,9 et un indice gingival compris entre 1,1 et 2,0. Les deux groupes présentaient des saignements interdentaires dans environ 96,5% des sites.

L'analyse par PCR en temps réel du microbiote interdentaire a permis de déterminer, qu'indépendamment du risque carieux, chaque espace interdentaire contenait environ $10^{9,4}$ bactéries. Parmi les 26 bactéries analysées, il y avait des bactéries classifiées comme cariogènes et des bactéries classifiées comme parodontopathogènes car certaines études montrent que ces dernières peuvent aussi impacter le processus carieux. Les résultats indiquent que la quantité de chacune des bactéries testées n'a pas été modifiée de façon significative en fonction du risque carieux, à l'exception de *Tannerella forsythia*, *Eikenella corrodens* et *Streptococcus sobrinus*, qui étaient significativement augmentés dans le groupe à risque carieux élevé par rapport au groupe à risque carieux faible. *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus sanguinis* et *Streptococcus salivarius* étaient les bactéries les plus abondantes dans les deux groupes. *Porphyromonas gingivalis* et *A. actinomycetencomitans* n'ont pas été détectées dans le groupe d'adolescents à faible risque carieux.

Le dendrogramme réalisé pour le groupe d'adolescents à faible risque carieux, a mis en évidence une corrélation forte entre les espèces bactériennes *Streptococcus mitis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium XIV*,

Parvimonas micra, *Treponema denticola* et *Campylobacter rectus*. Alors que celui obtenu pour le groupe à risque carieux élevé a mis en évidence deux clusters. Le premier regroupant *Campylobacter gracilis*, *Parvimonas micra*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Veillonella parvula* et *Fusobacterium nucleatum*. Le deuxième composé de *Lactobacillus spp.*, *Clostridium XIV*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces odontolyticus* et de *Streptococcus salivarius*.

Ainsi, l'analyse du microbiote interdentaire à partir d'un échantillon d'adolescents différencié par le niveau de risque carieux met en évidence le rôle potentiel que pourraient jouer trois bactéries (*Streptococcus sobrinus*, *Eikenella corrodens* et *Tannerella forsythia*) sur le développement prédictif des caries interproximales. *Eikenella corrodens* semble être plus intéressant car il a été trouvé dans tous les sites interdentaires du groupe à risque carieux élevé et présentait la valeur p la plus faible lorsque l'on comparait les groupes à haut et faible risque carieux. De plus, la détection de *Streptococcus sobrinus* et de *Tannerella forsythia* pourrait donner de faux négatifs car ils n'étaient ni détectés dans tous les sites interdentaires ni chez tous les adolescents du groupe à haut risque carieux. Bien que les outils existants d'évaluation du risque carieux et de prédiction interproximale des caries à l'adolescence aient une valeur clinique gérable, l'introduction d'un marqueur biologique, non subjectif et personnalisé pourrait être recommandée pour augmenter la valeur prédictive de la classification du risque carieux.



Article

The Oral Bacterial Microbiome of Interdental Surfaces in Adolescents According to Carious Risk

Camille Inquimbert ^{1,2,†}, Denis Bourgeois ^{1,†}, Manuel Bravo ³, Stéphane Viennot ¹, Paul Tramini ², Juan Carlos Llodra ³, Nicolas Molinari ⁴, Claude Dussart ¹ , Nicolas Giraudeau ^{2,†} and Florence Carrouel ^{1,*,†}

¹ Laboratory “Systemic Health Care”, EA4129, University Lyon 1, University of Lyon, 69008 Lyon, France

² Department of Public Health, Faculty of Dental Medicine, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France

³ Department of Preventive and Community Dentistry, Faculty of Odontology, University of Granada, 18010 Granada, Spain

⁴ Service DIM, CHU de Montpellier, UMR 5149 IMAG, University of Montpellier, 34090 Montpellier, France

* Correspondence: florence.carrouel@univ-lyon1.fr; Tel.: +334-7878-5744

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 August 2019; Accepted: 4 September 2019; Published: 5 September 2019



Abstract: Adolescence is closely associated with a high risk of caries. The identification of specific bacteria in an oral microniche, the interdental space of the molars, according to carious risk can facilitate the prediction of future caries and the anticipation of the progression or stabilization of caries in adolescents. A cross-sectional clinical study according to the bacteriological criteria of interdental healthy adolescents and carious risk factors—low and high—using a real-time polymerase chain reaction technique was conducted. The presence of 26 oral pathogens from the interdental microbiota of 50 adolescents aged 15 to 17 years were qualitatively and quantitatively analyzed. Bacteria known to be cariogenic (*Bifidobacterium dentium*, *Lactobacillus* spp., *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sobrinus*, and *Streptococcus wiggsiae*) did not present differences in abundance according to carious risk. Periodontal bacteria from the red complex are positively correlated with carious risk. However, only 3 bacteria—*S. sobrinus*, *E. corrodens* and *T. forsythia*—presented a significant increase in the highest group. Estimating the risk of caries associated with bacterial factors in interdental sites of molars in adolescents contributes to the better definition of carious risk status, periodicity and intensity of diagnostic, prevention and restorative services.

Keywords: oral microbiome; adolescents; carious risk; interdental microbiota

1. Introduction

In 2017, the three most common causes of the global burden of diseases in the world were oral disorders (3.47 billion, 95% UI 3.27–3.68), headache disorders (3.07 billion, 95% UI 2.90–3.27), and tuberculosis, including latent tuberculosis infection (1.93 billion, 95% UI 1.71–2.20) [1]. The same year, the prevalence of caries on permanent teeth was 23,019,992,000 [1]. Dental caries associated with periodontal disease are, together, the most prevalent microbe-mediated human disease worldwide [2].

Dental caries is a biofilm-mediated, sugar-driven, multifactorial, dynamic disease that results in the phasic demineralization and remineralization of dental tissues [3]. Dental caries is the result of dissolution of the tooth mineral by a reduction in pH due to the sustained fermentation of carbohydrate by bacteria in a local biofilm structure that limits the ability of saliva to wash away or buffer the acidic metabolic products [4–6]. The biofilm diversity of tooth surfaces is influenced by

carbohydrate consumption and a surface's health status [7]. Caries are associated with dysbiosis of the tooth-colonizing microbiota, characterized by the accumulation of aciduric and acidophilic bacteria [8]. The balance between pathological and protective factors influences the initiation and progression of caries [3].

The risk for developing caries in individuals depends on factors such as the immune system and oral microbiome, which themselves are affected by environmental and genetic determinants [9]. Interdental space is one of the main sites at risk of dental caries. Indeed, due to their anatomical arrangement and location, the biological interdental space in healthy subjects with an estimated diameter of 0.6–1.1 mm is an ecological microniche protected externally by the papillary gingiva [4,10]. Interdental spaces facilitate the structuration and accumulation of oral biofilms [11]. The saliva, due to anatomic accessibility constraints, cannot circulate favorably. Thus, without adequate saliva, the oral clearance of sugary or acidic foods will be longer, and less urea is available to help raise the plaque biofilm pH [12]. Moreover, accessibility to interdental spaces by conventional methods of individual prophylaxis is restricted. If toothbrushing is optimal for cleaning occlusal, facial and lingual/palatal surfaces of teeth, none of the toothbrushing methods is efficient for eliminating the interproximal supragingival dental plaque or disrupting the biofilm [13]. The effectiveness of plaque removal after brushing has been estimated at approximately 42% [14].

Adolescence is closely associated with a high risk and progression for caries. In total, 67% of US teens have experienced tooth caries, with untreated decay in 20% [15]. The interproximal faces of the molars are mainly affected [16]. The prevalence of caries has been reported to be 39% at the age of 12, increasing to 72% at the age of 20–21 [17]. Enamel lesions on the proximal surfaces among 16-year-olds account for more than 80% of all caries lesions on these surfaces, no matter whether the caries prevalence in the population is high or low [18]. During adolescence, the changes in dietary habits associated with excessive high carbohydrate consumption, sugary sodas or popular energy drinks, foods and snacking could contribute to alter the balance of the oral microbiome [19,20]. Admittedly, demineralization can be inhibited by salivary components, antibacterial agents, and fluoride or reversed by remineralization, which requires calcium, phosphate, and fluoride [21]. However, in interdental spaces, the conditions conferred by the topical application of fluoride, a priority in childhood and adolescence for the remineralization of enamel and brought daily by toothpaste, then conveyed by saliva, are not met to provide optimal protection. Adolescents' compliance associated with poor oral hygiene is advanced [22]. Oral hygiene and toothbrushing are not always a priority [23]. Access to community prevention interventions for promoting adolescent oral health, i.e., policy, educational activities, supervised toothbrushing programs, is more complicated because these mainly focus on early childhood and childhood [24].

Previous studies have focused on the oral microbiota of children with and without tooth decay. Moreover, most oral microbiology studies are based on pooled samples [25], rather than characterizing potential differences in microbial composition between discrete sites on teeth. Ribeiro and colleagues have recently studied bacterial diversity in occlusal biofilms and its relationship with the clinical surface diagnosis and dietary habits of 12-year-old children [6]. Our research is the first to target an oral microniche, which represents the interdental (ID) space, using real-time polymerase chain reaction (PCR) in order to analyze qualitatively and quantitatively the bacterial composition and to study its relation with caries risk factors in adolescents.

Better information on changes in community structure—taxonomic identity and abundance—that evolve in the aggressive ecosystem of a potentially cariogenic biofilm is thus significant for caries risk assessment and for progress in developing preventive strategies [6]. Caries-risk assessment models currently involve a combination of factors including diet, fluoride exposure, a susceptible host, and microflora that interplay with a variety of social, cultural, and behavioral factors [26]. Our hypothesis is that the identification of specific bacteria according to the degree of severity of carious risk can contribute to risk assessment to predict future caries and anticipate caries progression or stabilization in the adolescent.

This study investigated the changes in biofilm composition of interdental surfaces in posterior permanent teeth according to carious risk. Data to identify bacteria from the microbiome associated with caries risk will be emphasized.

The hypotheses are: (i) The quantification of the oral microbiome at the interproximal surface of the tooth could contribute to the assessment of carious risk and personalized clinical decision-making, (ii) the qualitative differentiated analysis of the microbiome could help to predict interproximal adolescence caries development, (iii) the identification of specific bacterial species could help to develop novel approaches in their diagnosis and management of carious lesions.

2. Materials and Methods

The Microbiota of Interdental Space of Adolescent according to Risk of Caries (MIARC) trial is a cross-sectional observational clinical study. The workflow of the experiment is described in Figure 1.

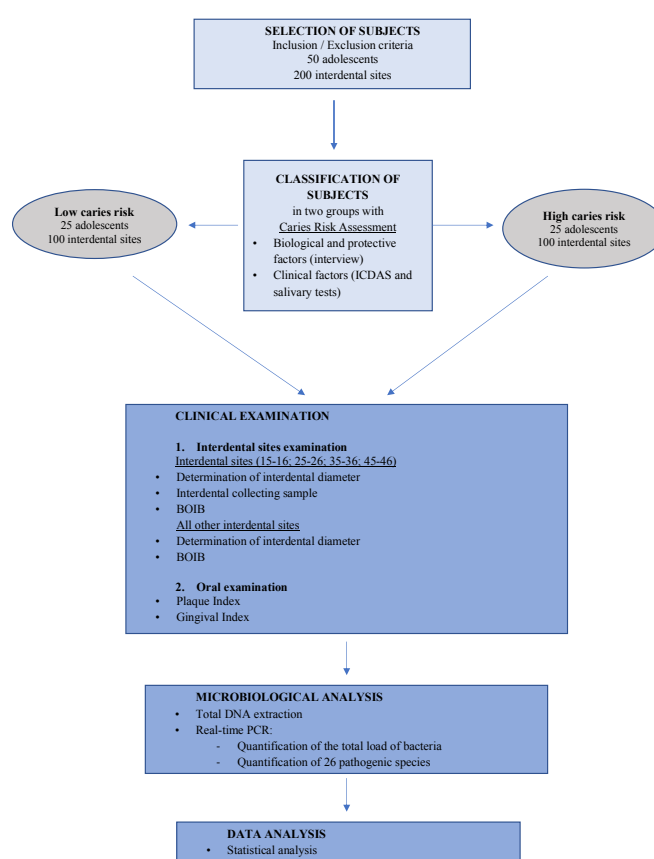


Figure 1. Workflow of the experiment. BOIB: Bleeding on Interdental Brushing; DNA: Deoxyribonucleic acid; ICDAS: International Caries Detection and Assessment System; PCR: Polymerase Chain Reaction.

2.1. Study Population

Fifty subjects (male and female) were recruited between November and December 2018 from a pool of first-time volunteers who were referred to the Department of Public Health of the Oral

Medicine Hospital of Montpellier, France. Written informed consent was obtained from all enrolled subjects in accordance with the Declaration of Helsinki and authorization of the ethics council. The 50 adolescents were selected based on inclusion criteria and carious risk classification to have 25 subjects in the high caries risk (HCR) group and 25 subjects in the low caries risk (LCR) group.

The inclusion criteria were: (i) Age 15–17 years old, (ii) presence of teeth (15, 16, 25, 26, 35, 36, 45, and 46), (iii) accessibility of the interdental space for the four sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) by the interdental brush in each subject, (iv) the presence of at least 22 natural teeth, (v) good understanding of the French language, (vi) one of the parents accepts the terms of the study and signs the written informed consent, (vii) adolescent accepts the terms of the study and signs the written informed consent.

The clinical inclusion criteria for each premolar-molar interdental site were: (i) Accessibility of the interdental site for the four sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) by the interdental brush in each subject, (ii) no interdental caries or prosthetics restorations, (iii) no interdental diastema, (iv) no clinical sign of inflammation such as redness, swelling, or bleeding on probing (BOP) after 30 s, (v) no pocket depth (PD) > 3 mm or clinical attachment loss (CAL) > 3 mm, and (vi) the subjects were judged to be free of gingivitis or periodontitis.

The exclusion criteria were: (i) Smokers, (ii) subjects with any other concomitant systemic disease, (iii) subjects with daily medication, (iv) subjects with an orthodontic appliance, (v) subjects who have taken antibiotics in the past three months, (vi) subjects regularly using interdental brushes and/or dental floss and/or mouthwash, and (vii) subjects unable to answer questions and non-cooperative.

2.2. Ethical Approval and Informed Consent

This study was carried out in accordance with the ethical committee of Sud-Est VI Clermont-Ferrand (Approval number: AU1371) and the National Commission of Informatics and Liberties, France (2116544 v 0). The National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM) approved it on February 13, 2017 (ID-RCB ref: 2017-A00425-48). This study was registered with [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (identification number ID: NCT03700840).

2.3. Classification of Subjects According to Carious Risk

One trained and calibrated dentist, experienced in the clinical indices, realized the clinical examination.

Subjects were classified into two carious risk groups: Low and high risk. In this study, the classification of subjects according to their carious risk was adapted from the caries-risk assessment of the American Academy of Pediatric Dentistry that is based on biological, protective and clinical factors [27].

First, to know the biological and protective factors, the dentist interviewed the patient face-to-face. Questions referred to socioeconomic status (mother's and father's occupation based on French socio-economic classifications), snacks, brushing, regular visits and dental care (Table 1).

Then, a clinical examination was performed to fulfil the questions concerning the clinical factors (Table 1). The participants were asked to refrain from oral hygiene measures, eating and drinking for two hours before clinical examination and interdental sampling.

The presence of active caries and interproximal lesions were measured by the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS). This clinical scoring system allows the detection and the assessment of caries activity. ICDAS was developed for use in clinical research, clinical practice and for epidemiological purposes. This scoring system can be used on coronal surfaces and root surfaces and can be applied to enamel caries, dentine caries, non-cavitated lesions (contrary to many systems) and cavitated lesions. The ICDAS II system has two-digit coding for the detection criteria of primary coronal caries. The first one is related to the restoration of teeth and has a coding that ranges from 0 to 9. The second digit ranges from 0 to 6 and is used for coding the caries. A compressed air syringe was used to dry the teeth during the ICDAS assessment [28].

The salivary tests were performed for all subjects using Saliva-Check BUFFER (GC, Sucy-en-Brie, France). The tests aimed to investigate hydration, salivary consistency, resting saliva pH, stimulated saliva flow, stimulated saliva pH and saliva buffering capacity. All tests were performed according to the instructions of the manufacturer to detect low, moderate, or high salivary risk.

The subject was classified as “high carious risk” if at least one “yes” was selected in the column “high risk”. The subject was classified as “low carious risk” only if no “yes” was selected in the column “high risk” for the biological and clinical findings, and “yes” was selected for the protective factors.

Table 1. Adolescent caries risk assessment.

	High Risk	Low Risk
Biological (interview)		
• Patient with low socioeconomic status	Yes	
• Patient has >3 between-meal sugar-containing snacks or beverages per day	Yes	
Protective (interview)		
• Patient brushes teeth daily with fluoridated toothpaste		Yes
• Patient has regular dental care		Yes
Clinical Findings (ICDAS and salivary tests) ICDAS		
• Patient had >1 interproximal lesion	Yes	
• Patient has active white spot lesions or enamel defects	Yes	
Salivary tests (hydration, salivary consistency, resting saliva pH, stimulated saliva flow, stimulated saliva pH and saliva buffering capacity)		
• Patient has high salivary risk	Yes	

2.4. Clinical Examination and Interdental Sample Collection

For all subjects, the same four interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) were assessed (total 200 sites). The interdental diameter was determined using a dedicated probe—the CURAPROX IAP calibration probe (Curaden, Kriens, Switzerland). This probe is a graduated conical instrument with a rounded end. The working portion includes colored bands from the tip to the base corresponding to interdental brushes (IDB) by increasing diameter. The largest section of each colored band corresponds to the cleaning efficiency diameter of the respective brush. This made it possible to select the calibrated IDB (Curaden) appropriate to the diameter of the interdental space. Each previously selected tooth was isolated using sterile cotton rolls, and the interdental biofilm as removed using this sterile IDB. For each sample, the IDBs were placed in 1.5-mL sterile microcentrifuge tubes and stored at 4 °C for further laboratory treatment.

The Bleeding on Interdental Brushing Index (BOIB) [29] was evaluated on the four interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46), as was the bleeding response to the horizontal pressure applied in the interdental area by a calibrated IDB. After 30 s, bleeding at each gingival unit was recorded according to the following scale: 0, absence of bleeding after 30 s; and 1, bleeding after 30 s. Then, interdental diameters and the BOIB were evaluated for all other interdental sites.

Clinical measurements including first the Gingival Index (GI) and, second, the Plaque Index (PI), were performed on the 4 sides (buccal, lingual/palatal, mesial, distal) of 6 teeth (12, 16, 24, 36, 32, 44) (Silness–Löe Index) [30]. To evaluate the GI, the tissues surrounding each tooth was divided into 4 gingival scoring units: Distal facial papilla, facial margin, mesial facial papilla and lingua gingival margin. A periodontal probe was used to assess the bleeding potential of the tissues with a score from 0–3 (0: Absence of inflammation to 3: Severe inflammation). The scores of the four areas of the tooth were summed and divided by four to obtain the GI for the tooth. The index for the patient was calculated by summing the indices for all six teeth and dividing by six. Then, the determination of the PI recorded both soft debris and mineralized deposits on the 6 teeth. Each of the four surfaces of the teeth gave a score from 0–3. The scores from the four areas of the tooth were added and divided by four in order to give the plaque index (0: no plaque to 3: abundance of soft matter within the gingival pocket and/or on the tooth and gingival margin). The index for the patient was obtained by summing the indices for all six teeth and dividing by six.

2.5. Microbiological Analysis

2.5.1. Total Deoxyribonucleic Acid (DNA) Extraction

Total DNA was isolated from the interdental brushes using the QIAcube HT Plasticware and Cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's guidelines. The elution volume used in this study was 150 µL. DNA quality and quantities were measured using an ultraviolet spectrophotometer at 260 and 280 nm. The DNA sample was considered pure if the A260/A280 ratio was in the range of 1.8–2 and the A260/A280 ratio was in the range of 2–2.2.

2.5.2. Quantitative Real-Time PCR Assays

Quantitative real-time PCR was carried out for Total Bacterial Count (TB) and for 26 pathogens: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf), *Treponema denticola* (Td), *Prevotella intermedia* (Pi), *Parvimonas micra* (Pm), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Campylobacter rectus* (Cr), *Eikenella corrodens* (Ec), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Campylobacter gracilis* (Cg), *Capnocytophaga ochracea* (Co), *Actinomyces odontolyticus* (Ao), *Veillonella parvula* (Vp), *Streptococcus mutans* (Smutans), *Streptococcus mitis* (Smitis), *Streptococcus sobrinus* (Ssob), *Streptococcus salivarius* (Ssal), *Streptococcus sanguinis* (Ssan), *Streptococcus cristatus* (Scri), *Rothia dentocariosa* (Rd), *Bifidobacterium dentium* (Bd), *Scardovia wiggisiae* (Sw), *Clostridium cluster IV* (ClosIV) (*Clostridium leptum* subgroup, includes *Faecalibacterium* (*Fusobacterium*) *prausnitzii*), *Clostridium cluster XIVa* and *XIVb* (ClosXIV) (*Clostridium coccoides*–*Eubacterium rectale* subgroup), and *Lactobacillus* spp. (Lspp).

Simplex quantitative real-time PCR assays were performed in a volume of 10 µL composed of 1× SYBR Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, Shiga, Japan), 2 µL of DNA extract and each primer at 1 µM. The bacterial species-specific PCR primers used in this study were provided by Institut Clinident SAS (Aix-en-Provence, France) and manufactured by Metabion international AG (Planegg, Germany). The bacterial primers used in this study are derived from sequences already published and have been adapted to the real-time PCR conditions (Supplementary Table S1).

The assays were performed on the Rotor-Gene Q thermal cycling system (Qiagen, Hilden, Germany) with the following program: 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at the appropriate annealing temperature (Supplementary Table S1), and 35 s at 72 °C. For the total bacterial load and that of all species, a final melting curve analysis (70–95 °C in 1 °C steps at 5 s increments) was performed. Fluorescence signals were measured every cycle at the end of the extension step and continuously during the melting curve analysis. The resulting data were analyzed using Rotor-Gene Q Series software (Qiagen, Hilden, Germany).

Serial dilutions of a bacterial standard DNA provided by Institut Clinident SAS (Aix-en-Provence, France) were used in each reaction as external standards for the absolute quantification of the targeted bacterial pathogens. The standard bacterial strains used for standard DNA production came from DSMZ (Germany), CIP Collection of Institut Pasteur or from BCMM/LMG Bacteria Collection: Aa (DSM No. 8324), Pg (DSM No. 20709), Tf (CIP No. 105220), Td (DSM No. 14222), Pi (DSM No. 20706), Pm (DSM No. 20468), Fn (DSM No. 20482), Cr (LMG No. 7613), Ec (DSM No. 8340), Pn (DSM No. 13386), Cg (DSM No. 19528), Co (DSM No. 7271), Ao (DSM No. 43760), Vp (CIP No. 60.1), Rd (DSM No. 43762), Bd (DSM20436), Sw (DSM No. 22547), Lspp (CIP No. 102237), Smitis (DSM No. 12643), Smutans (DSM No. 20523), Ssob (DSM No. 20742), Ssal (DSM No. 20067), Ssan (DSM No. 20068), Scri (DSM No. 8249), ClosIV (DSM 753), and ClosXIV (DSM No. 935).

The pathogenic strains were cultivated on the appropriate selective media. The total number of cells (number of colony-forming units) was enumerated three times using a Neubauer chamber. Serial dilutions ranging from 10×E+2 to 10×E+12 cells were utilized, and each of these dilutions was enumerated in duplicate. The DNA from each of these dilutions was extracted. A standard curve for each pathogen was generated as a plot between the crossing point (cycle number) and the initial cell count. The absolute counts of pathogen were determined using these calibration curves [31].

The limit of quantification (LOQ) of the method is summarized in Supplementary Table S1.

2.6. Statistical Analysis

2.6.1. Sample Size

With an alpha error of 5% (2-sided test), a power of 80%, an intraclass correlation coefficient of 0.8, and a mean difference of bacteria counts between the two caries risk groups of 1,300,000, a total of 200 sites (which means 50 subjects i.e., 25 subjects per caries risk group) was necessary.

2.6.2. Statistical Tests

The statistical analysis consisted of three main steps: Producing descriptive summaries of the data, modeling the data using a mixed (linear) model and assessing the correlations between bacterial abundances. Prior to these steps, we transformed the original count data to handle missing data points, namely, the measurements that fell under the quantification threshold (LOQ) of the quantitative real-time PCR device. The missing values for a given species were replaced by half of the corresponding quantification thresholds given in Supplementary Table S1. We performed simulations to ensure that this simple strategy provided a reasonable estimation of the mean and standard deviation of the original count distribution. To test for potential effects of gender, interdental space, and the location of each site, we used a mixed linear model for the log-count abundance of each species at a measured site. This model includes three categorical variables as fixed effects (gender, mouth location, and interdental space) and one categorical variable as a random effect (subject). This random effect was introduced for a subject to model the correlation between the four sites of a given subject. Each coefficient in the regression was tested against the null hypothesis, which indicates that the coefficient is zero using a likelihood ratio test, and we reported that *p*-values less than 0.05, 0.01, and 0.001 were low, medium, and strong evidence against the null hypothesis, respectively. To perform the correlation analysis, we used the residuals of the model described above to avoid over-estimating the inter-site correlation (sites from the same patient are positively correlated, and we observed that fixed effects can also induce a correlation among sites). The trees associated with the correlation plot were obtained by hierarchical clustering with complete linkage. The difference between the two groups of caries risk relative to age, gender, mouth location, interdental space, BOIB, PI and GI were tested with chi-square tests. Kruskal–Wallis tests were performed to compare the mean counts for the different bacterial species relative to each clinical characteristic.

All statistical analyzes and associated plots were performed using the R environment (R Core Team, 2015), specifically the lme4 package [32], to estimate the mixed model.

3. Results

3.1. Age, Gender, and Clinical Characteristics in the Two Carious Risk Groups

Table 2 summarizes the age, the sex, and clinical assessments of the study groups. The two groups were each composed of 25 subjects. The age, gender and clinical characteristics were similar in the two groups (Mann–Whitney and chi-square tests). The low caries risk (LCR) group was composed of 18 females and 7 males, whereas the high caries risk (HCR) group was composed of 15 females and 10 males. The mean age was 16.98 ± 0.77 years. The mean number of teeth present was 27.6 ± 1.1 (excluding wisdom teeth). Missing teeth (1.3%) were due to orthodontic treatment or agenesis (0.95%) and caries (0.35%). The mean BOIB score in the low risk group was 96.52% and 96.55% in the high-risk group. No problems due to oral hygiene were observed (fair plaque index 1.0–1.9, gingival index 1.1–2.0). The interdental spaces studied had a diameter between 0.8 and 1.1 mm.

3.2. Quantification of the Total Genome Count and Bacteria Count According to Carious Risk

The mean counts for the total bacterial load and that of the 26 evaluated species in the interdental biofilm according to carious risk are reported in Figure 2 and Table 3. An average of approximately $10^{9.4}$ bacteria was collected in one interdental space for both groups. The quantity of total bacteria and of

bacteria tested was not significantly modified except for *T. forsythia*, *E. corrodens*, and *S. sobrinus*, which were significantly increased in the HCR group relative to the LCR group. *T. forsythia* was 26.3 times, *E. corrodens* 4.7 times and *S. sobrinus* 3.3 times higher in the HCR group than in the LCR group.

Table 2. Age, sex, and characteristics of the full mouth of the study group.

	High Caries Risk	Low Caries Risk	p-Value
Subjects			
Age (years)	16.08 ± 0.81	15.88 ± 0.73	0.49
Gender			0.37
Male	10 (40%)	7 (28%)	
Female	15 (60%)	18 (72%)	
Full mouth			
Teeth	27.80 ± 0.82	27.48 ± 1.23	0.89
BOIB (%)	96.55 ± 7.87	96.52 ± 5.13	0.52
PI	1.56 ± 0.51	1.76 ± 0.43	0.22
GI	1.92 ± 0.28	1.72 ± 0.46	0.22
Interdental space diameter			
0.8 mm	10 (10%)	10 (10%)	0.35
0.9 mm	22 (22%)	31 (31%)	
1.1 mm	68 (68%)	59 (59%)	

The values are mean ± standard deviation, the numbers and percentages of subjects are indicated. BOIB: Bleeding On Interdental Brushing, GI: Gingival Index, PI: Plaque Index.

Table 3. Description (mean ± sd) of bacterial counts ($\log_{10} \times + 1$) in 200 quadrants ($n = 50$ patients $\times 4$ quadrants/patient) and comparison according to caries risk.

Variable	All ($n = 200$)	Caries Risk		p-Value
		High ($n = 100$)	Low ($n = 100$)	
TB	9.42 ± 0.48	9.43 ± 0.47	9.40 ± 0.48	0.796
<i>B. dentium</i>	0.76 ± 2.20	0.60 ± 1.95	0.91 ± 2.41	0.522
<i>Lactobacillus</i> spp.	4.54 ± 0.67	4.57 ± 0.72	4.50 ± 0.60	0.591
<i>R. dentocariosa</i>	5.91 ± 1.14	5.73 ± 1.43	6.08 ± 0.70	0.226
<i>S. cristatus</i>	4.41 ± 3.02	4.97 ± 2.83	3.85 ± 3.11	0.096
<i>S. mutans</i>	1.96 ± 2.76	1.95 ± 2.81	1.97 ± 2.72	0.969
<i>S. salivarius</i>	6.90 ± 0.70	7.05 ± 0.70	6.75 ± 0.67	0.068
<i>S. sobrinus</i>	0.30 ± 1.19	0.56 ± 1.58	0.04 ± 0.43	0.049
<i>S. wiggsiae</i>	5.85 ± 2.35	6.09 ± 1.88	5.59 ± 2.72	0.412
<i>A. odontolyticus</i>	3.77 ± 1.19	3.97 ± 1.18	3.56 ± 1.18	0.120
<i>V. parvula</i>	5.05 ± 1.36	5.07 ± 1.38	5.02 ± 1.32	0.881
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.28 ± 1.32	0.55 ± 1.83	0.00 ± 0.00	0.076
<i>C. ochracea</i>	4.04 ± 2.26	4.18 ± 2.11	3.89 ± 2.40	0.609
<i>E. corrodens</i>	5.84 ± 1.27	6.17 ± 1.01	5.50 ± 1.40	0.006
<i>S. mitis</i>	5.35 ± 0.62	5.48 ± 0.63	5.22 ± 0.58	0.075
<i>S. sanguinis</i>	7.00 ± 0.98	7.05 ± 1.22	6.94 ± 0.65	0.580
<i>C. rectus</i>	5.89 ± 1.79	6.00 ± 1.71	5.77 ± 1.86	0.560
<i>C. gracilis</i>	4.22 ± 1.14	4.31 ± 0.89	4.12 ± 1.34	0.524
<i>F. nucleatum</i>	7.42 ± 0.54	7.40 ± 0.56	7.43 ± 0.50	0.801
<i>P. intermedia</i>	2.85 ± 3.43	3.31 ± 3.53	2.38 ± 3.27	0.153
<i>P. micra</i>	5.05 ± 2.50	4.95 ± 2.55	5.14 ± 2.45	0.741
<i>P. nigrescens</i>	2.12 ± 1.99	2.43 ± 1.92	1.80 ± 2.01	0.131
<i>P. gingivalis</i>	0.34 ± 1.47	0.68 ± 2.02	0.00 ± 0.00	0.082
<i>T. denticola</i>	1.82 ± 3.16	2.17 ± 3.39	1.45 ± 2.88	0.345
<i>T. forsythia</i>	4.95 ± 3.20	5.66 ± 2.77	4.24 ± 3.43	0.046
<i>Clostridium</i> IV	0.43 ± 1.25	0.52 ± 1.39	0.34 ± 1.09	0.441
<i>Clostridium</i> XIV	6.39 ± 0.75	6.54 ± 0.67	6.23 ± 0.79	0.078

The colors refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color.

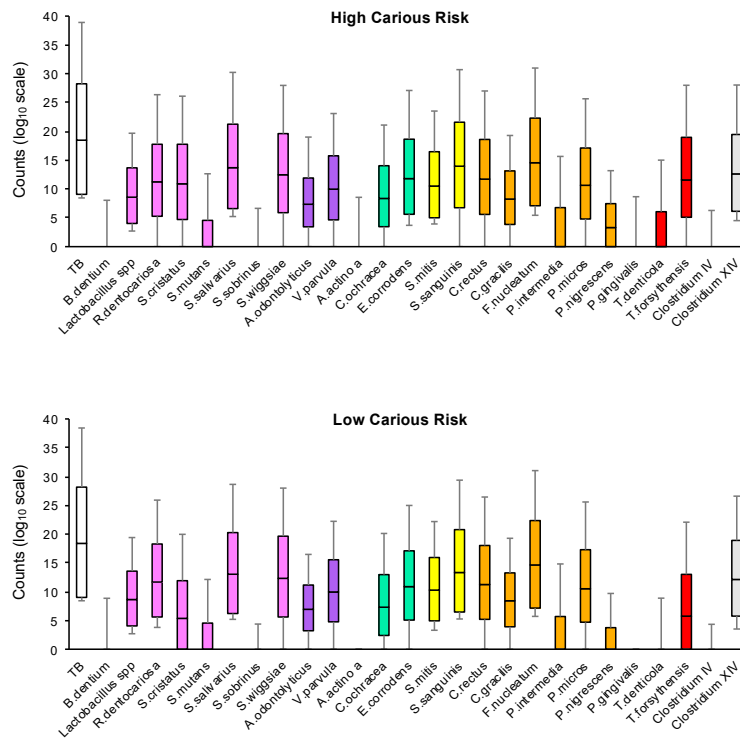


Figure 2. Abundance of bacterial species among the interdental sites in the low carious risk and high carious risk groups. The counts are reported on a log₁₀ scale. Each box represents the first quartile, median quartile, and third quartile, from bottom to top. The first box on the left (TB) corresponds to the total bacteria. The colors in boxes refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color. TB, total bacterial load.

In the HCR group, all species tested were detected. The most abundant species were *F. nucleatum* ($10^{7.4}$ bacteria in one ID space), *S. salivarius* ($10^{7.05}$ bacteria in one ID space) and *S. sanguinis* ($10^{7.05}$ bacteria in one ID space). The least abundant species were *Clostridium IV* ($10^{0.52}$ bacteria in one ID space), *A. actinomycetencomitans* ($10^{0.55}$ bacteria in one ID space), and *S. sobrinus* ($10^{0.56}$ bacteria in one ID space).

In the LCR group, the most abundant species were *F. nucleatum* ($10^{7.43}$ bacteria in one ID space), *S. sanguinis* ($10^{6.94}$ bacteria in one ID space) and *S. salivarius* ($10^{6.75}$ bacteria in one ID space). *A. actinomycetencomitans* and *P. gingivalis* were not detected.

Table 4 describes the distribution of pathogens according to sites and subjects. *Lactobacillus spp.*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *F. nucleatum*, and *Clostridium XIV* were detected in all subjects and in all interdental spaces, whatever the carious risk. Other bacteria were not expressed in each interdental site nor in each subject. For example, *P. gingivalis* was detected in 11% of HCR subjects and 12% of interdental sites from HCR subjects, but this bacterium was not detected in LCR subjects. *E. corrodens* was observed in all subjects, in 100% of interdental sites from HCR subjects and in 96% of interdental sites from LCR subjects.

Table 4. Distribution of the pathogens according to sites and subjects.

	All				Sex				0.6 mm				0.7 mm				IDB Size				0.9 mm				1.1 mm							
	Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²		Positive Sites ¹		Positive Subjects ²					
	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR	HCR	LCR				
<i>n</i>	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22
TB	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22
BB	9	13	6	6	1	2	1	1	8	11	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	2	4	2	3	5	9	3	5
Lspp	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22
Rd	96	100	24	25	36	28	9	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	64	59	20	22
Scri	77	62	24	22	31	20	10	6	46	42	14	16	0	0	0	0	0	0	0	0	6	3	4	3	17	24	11	15	54	35	21	19
Smutans	34	36	15	18	6	10	5	6	28	26	10	12	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	3	4	5	10	5	9	24	20	8	13
Ssal	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22
Ssob	12	1	5	1	3	0	1	0	9	1	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	4	1	2	1	6	0	3	0
Ssw	93	82	24	21	34	27	9	7	59	55	15	14	0	0	0	0	0	0	0	0	10	9	5	6	21	25	13	16	62	48	16	18
TP	96	93	25	25	37	27	10	7	59	66	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	5	7	20	29	12	18	67	54	21	22
Vp	95	95	25	25	37	25	10	7	58	70	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	29	13	19	63	56	21	22
Aa	9	0	3	0	3	0	1	0	6	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ca	83	76	23	23	27	22	8	6	56	54	15	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	3	5	3	19	28	12	17	54	45	15	19
Ec	100	96	25	25	40	27	10	7	60	69	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	9	5	6	22	30	13	19	68	57	21	22
Smitis	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	21	31	13	20	68	59	21	22
Ssan	98	100	25	25	39	28	10	7	59	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	21	31	13	20	67	59	21	22
Cr	95	93	25	25	37	26	10	7	58	67	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	7	5	6	20	30	13	20	65	56	21	22
Cg	99	93	25	24	39	27	10	7	60	66	15	17	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	30	13	19	67	53	21	21
Fu	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22
Pi	48	36	19	18	17	9	7	4	31	27	12	14	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	2	3	10	9	7	8	35	23	14	13
Pn	65	47	21	20	17	10	6	5	48	37	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	3	2	14	16	9	6	56	29	19	14
Pm	81	84	24	24	32	26	10	7	49	58	14	17	0	0	0	0	0	0	0	0	7	8	4	6	17	26	11	15	57	50	20	21
Pg	11	0	3	0	4	0	1	0	7	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	9	0	3	0
Td	30	21	12	8	10	8	5	4	20	13	7	4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	7	6	4	3	22	15	10	6
Tf	83	62	24	20	30	14	10	4	53	48	14	16	0	0	0	0	0	0	0	0	9	7	5	5	16	19	10	12	58	36	20	16
ClosIV	13	9	7	7	4	5	2	3	9	4	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	2	5	2	8	7	6	6
ClosXIV	100	100	25	25	40	28	10	7	60	72	15	18	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	5	7	22	31	13	20	68	59	21	22

¹ Positive sites correspond to the number of sites expressing one pathogenic species or the total bacteria (TB). ² Positive subjects indicate the number of subjects expressing one pathogenic species or the total bacteria. The colors refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the clostridium group for the gray color. Aa: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Ao: *Actinomyces odontolyticus*, Bd: *Bifidobacterium dentium*, Cg: *Campylobacter gracilis*, ClosIV: *Clostridium cluster IV*, ClosXIV: *Clostridium cluster XIVa and XIVb*, Co: *Capnocytophaga ochracea*, Cr: *Campylobacter rectus*, Ec: *Eikenella corrodens*, Fn: *Fusobacterium nucleatum*, HCR: High Carious risk group, LCR: Low Carious Risk group, Lspp: *Lactobacillus spp.*, n: total number of sites or subjects tested, Pg: *Porphyromonas gingivalis*, Pi: *Prevotella intermedia*, Pm: *Parvimonas micra*, Pn: *Prevotella nigrescens*, Rd: *Rothia dentocariosa*, Scri: *Streptococcus cristatus*, Smitis: *Streptococcus mitis*, Smutans: *Streptococcus mutans*, Ssal: *Streptococcus salivarius*, Ssan: *Streptococcus sanguinis*, Ssob: *Streptococcus sobrinus*, Ssw: *Scarlotia wiggsiae*, Td: *Treponema denticola*, Tf: *Tannerella forsythia*, Vp: *Veillonella parvula*.

3.3. Effects of Gender, Interdental Diameter and BOIB on the Total Genome Count and Bacteria Count

Table 5 summarizes the interactions between caries risk and gender, IDB size or BOIB. For the majority of the pathogens tested, the gender, the interdental diameter and the BOIB had no significant effect on the bacteria count. However, the sex significantly impacted the quantity of *E. corrodens*, *P. nigrescens* and *S. mutans*. The IDB size significantly modified the bacteria counts of *T. denticola*, *P. nigrescens*, *C. ochracea*, *V. parvula*, *B. dentium*, *S. cristatus*, *Clostridium IV*, and *Clostridium XIV*. The BOIB significantly influenced the quantity of *T. denticola*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *S. salivarius*, and *S. sanguinis*.

Table 5. Interactions (*p*-values) between caries risk and selected variables on bacterial counts ($\log_{10} \times + 1$) in 200 quadrants ($n = 50$ patients \times 4 quadrants/patient).

Variable	<i>p</i> -Values Interaction Caries Risk x...		
	Sex	IDB Size	BOIB%
TB	0.835	0.812	0.376
<i>B. dentium</i>	0.246	0.009 ¹	0.208
<i>Lactobacillus</i> spp.	0.857	0.332	0.716
<i>R. dentocariosa</i>	0.595	0.492	0.348
<i>S. cristatus</i>	0.253	0.048 ¹	0.166
<i>S. mutans</i>	0.008 ¹	0.280	0.057
<i>S. salivarius</i>	0.136	0.144	0.023 ¹
<i>S. sobrinus</i>	0.123	0.103	0.147
<i>S. wiggsiae</i>	0.139	0.666	0.426
<i>A. odontolyticus</i>	0.179	0.331	0.166
<i>V. parvula</i>	0.882	0.012 ¹	0.075
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0.203	0.064	0.194
<i>C. ochracea</i>	0.124	<0.001 ¹	0.374
<i>E. corrodens</i>	0.020 ¹	0.070	0.015 ¹
<i>S. mitis</i>	0.299	0.362	0.119
<i>S. sanguinis</i>	0.643	0.421	0.034 ¹
<i>C. rectus</i>	0.809	0.199	<0.001 ¹
<i>C. gracilis</i>	0.400	0.752	0.605
<i>F. nucleatum</i>	0.853	0.674	0.594
<i>P. intermedia</i>	0.421	0.095	0.186
<i>P. micra</i>	0.940	0.559	0.105
<i>P. nigrescens</i>	0.001 ¹	0.024 ¹	0.281
<i>P. gingivalis</i>	0.198	0.203	0.209
<i>T. denticola</i>	0.762	<0.001 ¹	0.020 ¹
<i>T. forsythia</i>	0.112	0.130	0.056
<i>Clostridium IV</i>	0.306	0.005 ¹	0.473
<i>Clostridium XIV</i>	0.341	0.014 ¹	0.062

¹ *p* < 0.05. BOIB: Bleeding on Interdental Brushing, IDB: Interdental Brush, TB: Total of bacteria. The colors refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color.

The counts of *E. corrodens* and *P. nigrescens* were lower in the LCR group than in the HCR group for males and females, but the decreases were significant only for females (Figure 3). No significant effect was observed for *S. mutans* for males and females. A significant decrease in the counts of *B. dentium*, and *C. ochracea* was observed for IDB of 0.8 mm. For other bacteria tested and other diameters of IDB, no significant effect was observed.

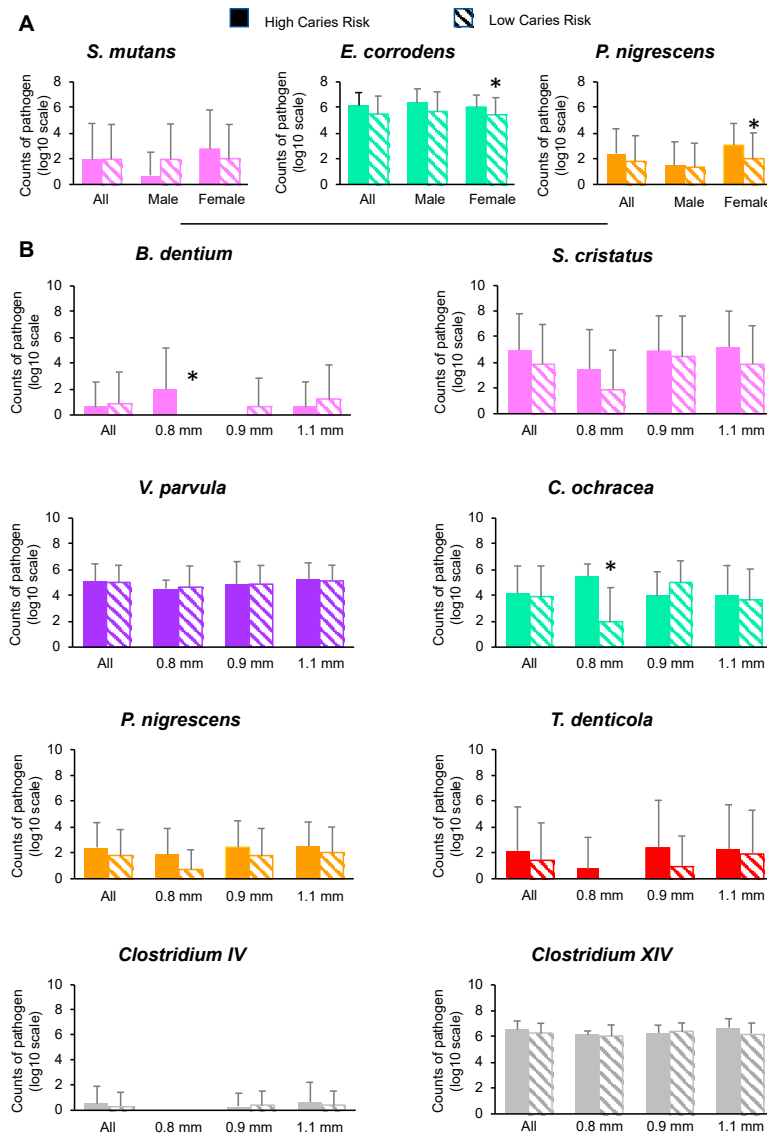


Figure 3. Abundance of bacterial species according to sex and interdental diameter in the low carious risk group and in the high carious risk group. The counts are reported on a log₁₀ scale. Total counts from each pathogen were averaged across sites in each subgroup. Error bars represent standard deviations. This stratified analysis is restricted to those situations where the interaction between caries risk and sex (A) or caries risk and IDB size (B) on bacterial counts is significant ($p < 0.05$) (detailed results not shown). Comparisons: * $p < 0.05$, by using SUDAAN 7.0 (procedures DESCRIPT and REGRESS) to account for clustering (multiple sites within the subjects). The colors in boxes refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color. TB: total bacterial load.

Table 6 details the effect of BOIB on bacterial count according to caries risk. The quantity of *S. salivarius* and *S. sanguinis* significantly increased in the HCR group, whereas no significant effect was observed for the LCR group. *E. corrodens* was not significantly correlated with the BOIB. *T. denticola* was significantly increased with the BOIB in the LCR group but not in the HCR group. *C. rectus* was correlated with the increase in BOIB in both groups.

Table 6. Stratified analysis of the effect of BOIB on bacterial counts¹, according to caries risk level in 200 quadrants ($n = 50$ patients \times 4 quadrants/patient).

Variable	Caries Risk	
	High ($n = 100$)	Low ($n = 100$)
<i>Streptococcus salivarius</i>	$r = 0.22, p = 0.011$	$r = 0.21, p = 0.198$
<i>Eikenella corrodens</i>	$r = 0.07, p = 0.388$	$r = 0.22, p = 0.164$
<i>Streptococcus sanguinis</i>	$r = 0.16, p = 0.008$	$r = 0.23, p = 0.213$
<i>Campylobacter rectus</i>	$r = 0.36, p < 0.001$	$r = 0.35, p = 0.030$
<i>Treponema denticola</i>	$r = 0.12, p = 0.138$	$r = 0.23, p = 0.035$

¹ This stratified analysis is restricted to those situations where the interaction between caries risk and sex (or IDB size) on bacterial counts is significant ($p < 0.05$) (detailed results not shown). The colors refer to (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color.

3.4. Pathogen Correlations According to Carious Risk

The dendrogram (Figure 4) underscores the correlations between the 26 pathogenic species and the ID sites for the HCR group and the LCR group. Even after the removal of the fixed effects related to interdental space and age, and the subtraction of the inter-site correlations, the matrix still revealed a strong correlation structure, which appeared as two groups (or clusters) of correlated species for the HCR group and one for the LCR group.

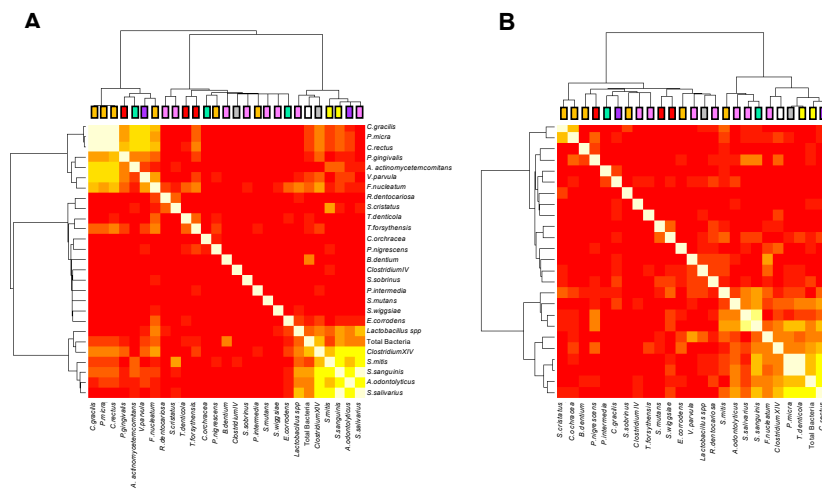


Figure 4. Correlation plot of the abundances of the bacterial species, corrected for age, interdental space and individual-specific effects. (A) High caries risk group, (B) low caries risk group. Yellow indicates positive correlations, whereas red indicates the absence of correlations. The colored leaves on the top dendrogram represent (i) the colors of the Socransky complexes for the purple, green, yellow, orange, and red colors, (ii) cariogenic bacteria for the pink color and (iii) bacteria from the *clostridium* group for the gray color.

The first cluster of the HCR group was composed of *C. gracilis*, *P. micra*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *V. parvula*, and *F. nucleatum*, whereas the second cluster was composed of *Lactobacillus* spp., *Clostridium XIV*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *A. odontolyticus*, and *S. salivarius*.

The cluster from the LCR group was composed of *S. mitis*, *A. odontolyticus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *F. nucleatum*, *Clostridium XIV*, *P. micra*, *T. denticola*, and *C. rectus*.

4. Discussion

This study provides a comprehensive survey of the interdental microbiota in adolescents, a target group that remains poorly explored, according to carious risk. To our knowledge, there is no scientific reference in the literature that jointly targets a cross-sectional clinical study (MIARC), according to the bacteriological criteria of interdental healthy adolescents, caries risk factors and the use of a real-time PCR technique. A few studies focused on the carious microbiota of adolescents, but these studies were concerned with the subgingival microbiota without specific location, during and/or after orthodontic treatment [33,34], and quantified few bacteria (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*) [35].

Most research investigating the commensal oral microbiome are focused on disease or are restricted in methodology. To diagnose and treat caries at an early and reversible stage, an in-depth definition of health is indispensable [36]. Our research option consisted of carrying out real-time PCR analysis of the interdental microbiota of caries-free sites in healthy adolescents with or without a carious risk. All pathogens considered in our study have been before identified in oral samples of children, adolescents, or young adults [37–40]. Our study did not only focus on cariogenic bacteria because the classification of oral bacteria seems more complex. Effectively, some studies demonstrated a positive association between periodontitis and caries, whereas others demonstrated a negative association [41–43]. These studies observed clinical signs, and only one study considered the microbiota, but the subjects were clinically affected by these oral diseases [44]. Qualitatively and quantitatively, the presence of 26 oral pathogens was analyzed. Among them were bacteria commonly classified as cariogenic bacteria—*B. dentium*, *Lactobacillus* spp., *R. dentocariosa*, *S. cristatus*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. wiggsiae*; bacteria considered periodontopathogenic—bacteria from the purple complex (*A. odontolyticus*, *V. parvula*), the green complex (*A. actinomycetemcomitans*, *C. orchrocea*, *E. corrodens*), the yellow complex (*S. mitis*, *S. sanguinis*), the orange complex (*C. rectus*, *C. gracilis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*), the red complex (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*); and others such as *Clostridium IV* and *Clostridium XIV*.

A particular focus of our study is a Caries Risk Assessment (CRA) system. Indeed, the carious lesion is a multifactorial disease principally due to carious biofilm and sugar consumption. Caries-risk assessment models currently involve a combination of factors including diet, fluoride exposure, a susceptible host, and microflora that interplay with a variety of social, cultural, and behavioral factors [26]. The initiation of dental caries results from the balance between risk and protective factors. This interplay between factors underpins the classification of individuals and groups into caries risk categories, allowing an increasingly tailored approach to care. The classification criteria for CRA systems were determined by combining scientific evidence and expert opinion. From these CRAs, practitioners analyze the various clinical and social factors of a patient and can thus assign a carious risk status [45]. For low-risk patients, there is no necessity for further preventive professional treatment, and they should be offered an extended follow-up [46]. For high-risk patients, preventive actions must be taken to reduce the incidence and severity of future carious lesions [46]. This individual scheduling of preventive and follow-up activity better appropriates the use of dental resources and lowers dental costs for certain individuals [46]. At present, the criteria needed to perform quantitative caries risk assessment evaluations are still incomplete [26].

Few CRA classifications consider the quantification of bacteria, and generally such bacteria are singular and unique. In these few CRA classifications, the quantification of *S. mutans* in the saliva has been considered [47]. However, the results concerning the link between *S. mutans* and the development

of dental caries is not clear. Some studies demonstrated a real association between *S. mutans* and the carious lesion, whereas others revealed no clear association [48]. Moreover, the amount of *S. mutans* needed to initiate the carious lesion varies according to the study [49]. Thus, to use this bacterium or other bacteria as a biomarker in a CRA classification, it is necessary to identify specific biomarkers associated with carious lesions and to normalize their quantification.

Concerning bacteria classified as cariogenic bacteria (*B. dentium*, *Lactobacillus* spp., *R. dentocariosa*, *S. cristatus*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. wiggsiae*), no significant difference was observed in the HCR subjects relative to the LCR subjects. Therefore, these bacteria do not represent good predictive factors for CRA. Cariogenic bacteria are acidogenic and acid-tolerant species [50].

For many years, *S. mutans* was considered the major oral pathogen implicated in the initiation of caries. However, this role has been questioned [51]. Effectively, caries have been observed without the presence of *S. mutans* [50,52–54]. In our study, *S. mutans* was expressed in small quantities ($10^{1.97}$ for the LCR and $10^{1.95}$ for the HCR group). Our results confirmed that *S. mutans* alone could not be used to predict carious risk as previously demonstrated by Gross and colleagues [50]. A CRA classification that uses the quantification of *S. mutans* in the saliva must be used with care [21]. In some studies, caries was associated with the absence of *S. mutans* and the presence of *Lactobacillus* [55,56], *B. dentium* [55], and *S. wiggsiae* [57].

S. sobrinus, closely related to *S. mutans*, is described as a major bacterium in the apparition of carious lesions [58]. This pathogen was significantly increased by three times in the HCR group relative to the LCR group, and it could also be a predictive marker for caries, as described by Gross and colleagues for the supragingival biofilm [50]. However, contrary to this previous study, this pathogen was expressed only in 20% of the subjects from the HCR group, which limits its detection and its potential to be an interesting predictive marker of caries.

S. salivarius has been associated with caries due to its high cariogenic capacity [55]. Moreover, in a rat model, this pathogen was able to induce caries. Contrary to these results, in our study, this pathogen was expressed in all subjects at equal levels in both groups [59]. These divergent results could be explained by the fact that some *S. salivarius* strains such as *S. salivarius* M18 have probiotic activity and help to fight against cariogenic bacteria [60].

S. wiggsiae is classified as cariogenic because it is able to tolerate acid and to produce acid from several sugars at low pH [65]. This pathogen was significantly associated with severe-early childhood caries and was also observed in adolescents presenting initial carious lesions with fixed orthodontic appliances [61,62]. Contrary to these studies, our results indicated that *S. wiggsiae* was highly expressed whatever the carious risk and in more than 84% of subjects in both groups.

S. cristatus is considered an important cariogenic species due to its association with childhood caries [57,63]. Our results are in accordance with those of Dzidic and colleagues because, the quantity of *S. cristatus* is 13 times higher in HCR subjects but not significantly [63]. This pathogen is known to be inversely correlated to the presence of *P. gingivalis* [64]. Our results are in accordance with this because *P. gingivalis* represented $10^{0.35}$ counts in one ID space, whereas *S. cristatus* represented $10^{4.42}$ counts in one ID space.

The relationship between *Lactobacillus* and caries is well established [65,66]. *Lactobacillus* spp. produces water-insoluble polysaccharides that promote bacterial attachment to the tooth surface. Therefore, other bacteria are able to fix the organic acids that are confined that modify the microenvironment to enrich the aciduric microflora [67]. Although *lactobacilli* play an important role in the prognosis of caries, they are unlikely to play an important role in the development of caries [68,69]. Therefore, the number of salivary *lactobacilli* may be indirectly related to the progression of caries. Our study revealed that *Lactobacillus* spp. was present in all caries-free subjects, but the rate was higher in the HCR group, although not significant.

B. dentium was isolated from the oral biofilm and from saliva [70]. *Bifidobacterium* was isolated from 80% of plaque samples from early childhood caries patients [55,71] and from the saliva of children with a higher frequency in caries-affected children than in caries-free children [72]. *B. dentium* was defined

as a novel caries-associated bacterium with an acidogenic potential and a high fluoride tolerance [73]. Our results revealed that this pathogen is only in 24% of the subjects in the HCR and LCR groups, and no significant difference was observed between the two groups. Therefore, this bacterium cannot be used for CRA.

R. dentocariosa was identified as a cariogenic bacteria [74,75]. Jiang and colleagues observed that the quantity of this pathogen was higher in the saliva from children with caries than caries-free children. They suggested that it could be a predictive marker for CRA. However, our results indicated that *R. dentocariosa* was expressed in 96% of subjects from the HCR group and 100% of subjects from the LCR group with no significant difference in quantity between the two groups. Therefore, this pathogen alone cannot be used for CRA.

Studies agree that oral diseases are not only attributable to specific bacteria but that they result from dysbiosis of the oral microbiota. The apparition of oral disease could be due to the decrease of bacterial taxon and to the presence of key pathogens [76,77].

Concerning bacteria classified as periodontal bacteria, as previously described, bacteria from the blue, yellow, green, and purple complexes of Socransky are associated with oral health, whereas bacteria from the orange and red complexes are associated with dysbiosis of the microbiota and the apparition of gingivitis and, later, periodontitis [78]. Our study reveals that bacteria associated with Socransky complexes and thus with gingivitis and periodontitis are present in adolescents that present no signs of gingivitis. The higher quantity of bacteria from the red complex in the HCR group than the LCR group indicated a positive correlation between periodonthopathogenic bacteria and carious risk. Previously, Durand and colleagues demonstrated a positive correlation between periodontal disease severity and the decayed, missing, filled teeth surfaces index [44].

Concerning the red complex, our results indicated that *P. gingivalis* was not detected in the subjects of the LCR group and was only detected in 11% of the interdental sites in the HCR group. This could be explained because in both groups the quantity of *S. mutans* ($10^{1.97}$ in the LCR group and $10^{1.95}$ in the HCR group) and *S. sanguinis* ($10^{6.94}$ in the LCR group and $10^{7.05}$ in the HCR group) were high compared with quantity of *P. gingivalis* (not detected in the LCR group and $10^{0.68}$ in the HCR group). A previous study demonstrated that the growth of *P. gingivalis* was significantly inhibited by supernatants from *S. mutans* and *S. sanguinis* [79]. Moreover, *S. cristatus* ($10^{4.97}$ in the HCR group) could also inhibit the growth of *P. gingivalis* because *S. cristatus* is able to inhibit the expression of virulence genes of *P. gingivalis* and consequently delay the growth of dental plaques [80].

T. denticola was detected in low quantities ($10^{2.17}$ in the HCR group) and was higher in the HCR group than the LCR group. This bacterium was detected in interdental sites expressing bacteria from the red or the orange complex. This is in accordance with previous studies that demonstrated that *T. denticola* is unable to adhere on oral surfaces as it is only able to colonize to form oral biofilms when other periodontal bacteria are present. In subgingival dental biofilms, *T. denticola* is typically associated with *P. gingivalis* [81]. A chymotrypsin-like proteinase found within a high-molecular-mass complex on the cell surface of *T. denticola* mediates its adherence to other potential periodontal pathogens such as *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* and *P. micra* [82].

T. forsythia was expressed in 96% of adolescents (83% of interdental sites) from the HCR group and was the only bacteria from the red complex that significantly increased in the HCR group relative to the LCR group. This bacterium could represent an interesting biomarker for the CRA system. However, as it was expressed in 93% of subjects and 83% of interdental spaces from the HCR group, some false negatives could appear. *T. forsythia* acts with *P. gingivalis* to initiate chronic periodontitis and was not described in carious lesions. In our study, *T. forsythia* was not correlated with *P. gingivalis* and so could act with other bacteria such as *S. cristatus* and *R. dentocariosa*, which are known to be implicated in caries [74,83]. Moreover, *T. forsythia* was correlated with *T. denticola*, confirming previous results demonstrating that *T. denticola* and *T. forsythia* are involved in protein-protein interactions through a leucine-rich repeat in proteins [84].

Bacteria from the orange complex do not seem to have a key role in carious risk because no significant difference was observed by comparing the HCR and the LCR groups. In fact, these bacteria have a key role in the initiation of subgingival microbiota dysbiosis [85], but no role in carious lesions was described.

P. nigrescens was previously detected in children caries [86], which is in accordance with our results indicating that this pathogen was detected in 76% of subjects from the HCR group. For this pathogen, sex significantly impacted carious risk. A higher quantity was detected in females than males and in the female HCR group relative to the female LCR group. Nakagawa and colleagues previously demonstrated that *P. nigrescens* was significantly increased in puberty compared with prepuberty in females but not in males. This could be associated with sex hormone modifications [87].

Contrary to the study of Gross and colleagues that demonstrated that *C. rectus* decreased as caries progressed, our study revealed no modification according to caries risk that could be explained because those authors sampled supragingival biofilm from carious lesions, whereas we analyzed interdental biofilms associated with a healthy surface [56]. However, our study revealed that *C. rectus* increased significantly in the HCR group with the BOIB, suggesting that this pathogen could also be associated with interdental inflammation. Indeed, *C. rectus* is known to be present in chronic gingivitis [88].

From the yellow complex, *S. mitis* and *S. sanguinis* were not significantly modified when the HCR and the LCR group were compared. This result aligns with those from previous studies indicating that *S. sanguinis* and *S. mitis* are significantly associated with dental health [89–91]. *S. sanguinis* is known to be a pioneer colonizer that permits the adhesion of other microorganisms and biofilm formation [50,92,93]. Our results indicated that the quantity of *S. sanguinis* is 90 times higher than that of *S. mutans*. This result is in accordance with the study of Caufield and colleagues, who demonstrated a higher level of *S. sanguinis* relative to the level of *S. mutans* in the saliva [94].

Of the green complex bacteria studied, only *E. corrodens* was significantly increased with carious risk. Moreover, this pathogen was expressed in each subject and in each interdental space from the HCR group and in 96% of subjects from the LCR group. These results are in accordance with those from Choi and colleagues, who demonstrated that this pathogen was present in the saliva from periodontally healthy subjects [95]. Previous studies have demonstrated that *E. corrodens* is important for the progression of periodontal disease in young subjects [95,96]. This bacterium participates in the early stage of biofilm formation by mediating the specific co-aggregation of bacteria from the oral cavity. It is a middle colonizer, linking early colonizers such as Streptococci and late colonizers such as *P. gingivalis* [97]. As our results indicated that this pathogen could be a key factor for the carious process and that it was phylogenetically close to the cluster (*Lactobacillus* spp., *Clostridium* XIV, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *A. odontolyticus*, and *S. salivarius*) from the HCR group, it could participate, as previously described in periodontitis, in biofilm formation and could permit cariogenic bacteria to adhere to biofilm. In our study, females from the HCR group had a higher quantity of *E. corrodens* than females from the LCR group. This could be explained because females have higher caries prevalence than males [98–101]. Moreover, *E. corrodens* is associated with systemic diseases such as spinal, head, and neck infection or endocarditis [102–106]. Therefore, it could be a predictive marker of carious disease but also of systemic diseases.

Concerning the purple complex, *V. parvula* and *A. odontolyticus* were not linked with carious risk but were expressed in more than 90% of the interdental spaces tested. Groos and colleagues demonstrated that *V. parvula* increased with the carious lesion step [50], and Kanasi and colleagues identified it in carious lesions from children [107]. *V. parvula* is important in biofilm formation. It can co-aggregate with other microorganisms such as *S. mutans*. Indeed, *V. parvula* cannot fix itself on the surface of teeth and attaches to *S. mutans* [108]. *A. odontolyticus* also acts in the early formation of biofilm [109]. *A. odontolyticus* was previously detected in carious lesions [86,110,111].

A recent study demonstrated that *Clostridium* was positively and significantly correlated to caries and pigment in primary dentition [112]. However, even in our study, all subjects expressed *Clostridium* XIV, while only 13% of the HCR group and 9% of the LCR group expressed *Clostridium* IV, and no

significant differences were observed between the HCR and LCR groups. However, *Clostridium* XIV was 2 times higher in the HCR than in the LCR group, which could be in accordance with the study by Li and colleagues [112].

The human oral microbiota has recently become a new focus for its involvement in systemic diseases [113,114]. Our work underlines the presence in the interdental niche of healthy adolescents of a number of oral bacteria described in the literature for their association with systemic diseases. Effectively, *B. dentium* is known to cause bacteraemia [115]. *A. odontolyticus* has been identified in actinomycosis throughout the body [116,117]. *R. dentocariosa* and *S. mutans* are known to be associated with bacteraemia and infective endocarditis [118,119]. *E. corrodens* has been described in cardiovascular diseases (CVD) [120,121], and *C. ochracea* has also been described in lupus [122,123]. *F. nucleatum* has been related to CVD, Alzheimer's, and adverse pregnancy [124]. *P. gingivalis* was linked to CVD, respiratory tract infection, cancer, Alzheimer's, rheumatoid arthritis, and adverse pregnancy [124,125]. CVD and Alzheimer's were also associated with *P. intermedia*, *T. denticola*, and *T. forsythia*, which was also implicated in respiratory tract infection [124]. *C. rectus* and *V. parvula* were linked to CDV [124]. *P. nigrescens* was discovered in rheumatoid arthritis [125]. Therefore, the accumulation of these pathogenic bacteria in the interdental space must be considered. These bacteria represent a risk-predisposing factor to the development of systemic diseases in the future. As interdental hygiene is often neglected (the toothbrush is not used enough), it is necessary to introduce interdental brushing as early as adolescence.

5. Conclusions

Estimating the risk of caries associated with bacterial factors in interproximal sites in adolescents will permit a more evidence-based strategy for medical referrals for certain individuals and contribute to a better definition of carious risk status, periodicity and intensity of diagnostic, prevention and restorative services. In our study, the analysis of the interdental microbiota from a sample of adolescents differentiated by level of caries risk highlights the potential role that three bacteria (*S. sobrinus*, *E. corrodens*, and *T. forsythia*) could have on the predictive development of interproximal caries. *E. corrodens* appears to be more interesting because it was found in all interdental sites from the HCR group and, it had the lowest *p*-value when comparing HCR and LCR groups. Moreover, the detection of *S. sobrinus* and *T. forsythia* could give false negatives because they were not detected in all the interdental sites and all the adolescents for the HCR group. While existing tools for caries risk assessment and interproximal adolescence caries prediction have restricted manageable clinical value, introducing a biological, non-subjective and personalized marker could be recommended to increase the CRA classification. Sensitive assessment of metabolic process using microbial biomarkers at the biofilm–enamel interface could thus perform it possible to specify endpoints prior to the clinical expression. The knowledge obtained from our trial contributes to generating active hypotheses related to the composition and variability of the oral microbiome in the interdental space of adolescents. These hypotheses can be prospectively explored in longitudinal cohort studies, using next generation sequencing techniques, essential to identify other biomarkers of the disease in real time.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/9/319/s1>, Table S1: Species-specific and ubiquitous real-time PCR primers for 26 bacteria, annealing temperatures, and the limits of quantification.

Author Contributions: Conceptualization, D.B. and F.C.; methodology, F.C. and C.I.; validation, C.I., S.V. and P.T.; formal analysis, M.B., P.T. and N.M.; investigation, C.I.; writing—original draft preparation, D.B., F.C. and C.I.; writing—review and editing, D.B., M.B., F.C., C.D., N.G., C.I., J.C.L., N.M., P.T., S.V.; visualization, F.C., M.B., C.I., N.M., P.T.; project administration, F.C. and P.T.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We acknowledge the support of our work by Institut Clinident sas (Aix-en-Provence, France) and all the participants.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) Data Resources[GHDx. Available online: <http://ghdx.healthdata.org/gbd-2017> (accessed on 14 December 2018).
- Valm, A.M. The structure of dental plaque microbial communities in the transition from health to dental caries and periodontal disease. *J. Mol. Biol.* **2019**, *431*, 2957–2969. [[CrossRef](#)]
- Pitts, N.B.; Zero, D.T.; Marsh, P.D.; Ekstrand, K.; Weintraub, J.A.; Ramos-Gomez, F.; Tagami, J.; Twetman, S.; Tsakos, G.; Ismail, A. Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2017**, *3*, 17030. [[CrossRef](#)]
- Abou Neel, E.A.; Aljabo, A.; Strange, A.; Ibrahim, S.; Coathup, M.; Young, A.M.; Bozec, L.; Mudera, V. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 4743–4763. [[CrossRef](#)]
- Chenicheri, S.R.U.; Ramachandran, R.; Thomas, V.; Wood, A. Insight into oral biofilm: Primary, secondary and residual caries and phyto-challenged solutions. *Open Dent. J.* **2017**, *11*. [[CrossRef](#)]
- Ribeiro, A.A.; Azcarate-Peril, M.A.; Cadenas, M.B.; Butz, N.; Paster, B.J.; Chen, T.; Bair, E.; Arnold, R.R. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PLoS ONE* **2017**, *12*. [[CrossRef](#)]
- Zaura, E.; Brandt, B.W.; Prodan, A.; Teixeira de Mattos, M.J.; Imangaliyev, S.; Kool, J.; Buijs, M.J.; Jagers, F.L.; Hennequin-Hoenderdos, N.L.; Slot, D.E.; et al. On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME J.* **2017**, *11*, 1218–1231. [[CrossRef](#)]
- Takahashi, N.; Nyvad, B. The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 294–303. [[CrossRef](#)]
- Mosaddad; Tahmasebi, E.; Yazdani, A.; Rezvani, M.B.; Seifalian, A.; Yazdani, M.; Tebyanian, H. Oral microbial biofilms: An update. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**. [[CrossRef](#)]
- Carrouel, F.; Llodra, J.C.; Viennot, S.; Santamaria, J.; Bravo, M.; Bourgeois, D. Access to interdental brushing in periodontal healthy young adults: A cross-sectional Study. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0155467. [[CrossRef](#)]
- Ng, E.; Lim, L.P. An Overview of different interdental cleaning aids and their effectiveness. *Dent. J.* **2019**, *7*, 56. [[CrossRef](#)]
- Maheswari, S.U.; Raja, J.; Kumar, A.; Seelan, R.G. Caries management by risk assessment: A review on current strategies for caries prevention and management. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2015**, *7*, S320–S324.
- Worthington, H.V.; MacDonald, L.; Poklepovic Pericic, T.; Sambunjak, D.; Johnson, T.M.; Imai, P.; Clarkson, J.E. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2019**, *4*, CD012018. [[CrossRef](#)]
- Slot, D.E.; Wiggelinkhuizen, L.; Rosema, N.A.M.; Van der Weijden, G.A. The efficacy of manual toothbrushes following a brushing exercise: A systematic review. *Int. J. Dent. Hyg.* **2012**, *10*, 187–197. [[CrossRef](#)]
- Dye, B.A.; Thornton-Evans, G.; Li, X.; Iafolla, T.J. Dental caries and sealant prevalence in children and adolescents in the United States, 2011–2012. *NCHS Data Brief* **2015**, 1–8.
- Schwendicke, F.; Paris, S.; Stolpe, M. Detection and treatment of proximal caries lesions: Milieu-specific cost-effectiveness analysis. *J. Dent.* **2015**, *43*, 647–655. [[CrossRef](#)]
- Mejäre, I.; Källestål, C.; Stenlund, H. Incidence and progression of approximal caries from 11 to 22 years of age in Sweden: A prospective radiographic study. *Caries Res.* **1999**, *33*, 93–100. [[CrossRef](#)]
- Alm, A.; Wendt, L.K.; Koch, G.; Birkhed, D. Prevalence of approximal caries in posterior teeth in 15-year-old Swedish teenagers in relation to their caries experience at 3 years of age. *Caries Res.* **2007**, *41*, 392–398. [[CrossRef](#)]
- Lussi, A.; João-Souza, S.H.; Megert, B.; Carvalho, T.S.; Baumann, T. The erosive potential of different drinks, foodstuffs and medicines—a vade mecum. *Swiss Dent. J.* **2019**, *129*, 479–487.
- Nihtila, A.; West, N.; Lussi, A.; Bouchard, P.; Ottolenghi, L.; Senekola, E.; Llodra, J.C.; Viennot, S.; Bourgeois, D. Oral health behavior and lifestyle factors among overweight and non-overweight young adults in Europe: A cross-sectional questionnaire study. *Healthc. Basel Switz.* **2016**, *4*, 21. [[CrossRef](#)]
- Featherstone, J.D.B.; Chaffee, B.W. The evidence for caries management by risk assessment (CAMBRA®). *Adv. Dent. Res.* **2018**, *29*, 9–14. [[CrossRef](#)]
- Kasmaei, P.; Amin Shokravi, F.; Hidarnia, A.; Hajizadeh, E.; Atrkar-Roushan, Z.; Karimzadeh Shirazi, K.; Montazeri, A. Brushing behavior among young adolescents: Does perceived severity matter. *BMC Public Health* **2014**, *14*, 8. [[CrossRef](#)]

23. Erbe, C.; Klees, V.; Ferrari-Peron, P.; Ccahuana-Vasquez, R.A.; Timm, H.; Grender, J.; Cunningham, P.; Adam, R.; Farrell, S.; Wehrbein, H. A comparative assessment of plaque removal and toothbrushing compliance between a manual and an interactive power toothbrush among adolescents: A single-center, single-blind randomized controlled trial. *BMC Oral Health* **2018**, *18*, 130. [CrossRef]
24. De Silva, A.M.; Hegde, S.; Akudo Nwagbara, B.; Calache, H.; Gussy, M.G.; Nasser, M.; Morrice, H.R.; Riggs, E.; Leong, P.M.; Meyenn, L.K.; et al. Community-based population-level interventions for promoting child oral health. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2016**, *9*, CD009837.
25. Huang, Y.K.; Lee, W.F.; Wang, M.J.; Chang, Y.H.S.; Tchaou, W.S.; Chang, W.J.; Lee, S.Y.; Sheu, J.R.; Teng, N.C. Chair-side quantitative oral-microflora screening for assessing familial correlation of periodontal status and caries prevalence. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87100. [CrossRef]
26. American Academy of Pediatric Dentistry. *Guideline on Caries-Risk Assessment and Management for Infants, Children, and Adolescents*. 2010. Available online: http://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/G_CariesRiskAssessment.pdf (accessed on 15 March 2013).
27. Clinical Affairs Committee, American Academy of Pediatric Dentistry Guideline on Adolescent Oral Health Care. *Pediatr. Dent.* **2015**, *37*, 49–56.
28. Pitts, N.B.; Ekstrand, K.R. ICDAS Foundation International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS)—methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2013**, *41*, e41–e52. [CrossRef]
29. Rosenauer, T.; Wagenschwanz, C.; Kuhn, M.; Kensche, A.; Stiehl, S.; Hannig, C. The bleeding on brushing index: A novel index in preventive dentistry. *Int. Dent. J.* **2017**, *67*, 299–307. [CrossRef]
30. Löe, H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.* **1967**, *38*, 610–616. [CrossRef]
31. Kralik, P.; Ricchi, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 108. [CrossRef]
32. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.; Walker, S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* **2015**, *67*, 1–48. [CrossRef]
33. Paolantonio, M.; Festa, F.; di Placido, G.; D’Attilio, M.; Catamo, G.; Piccolomini, R. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **1999**, *115*, 423–428. [CrossRef]
34. Ristic, M.; Vlahovic Svabic, M.; Sasic, M.; Zelic, O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod. Craniofac. Res.* **2007**, *10*, 187–195. [CrossRef]
35. Pan, S.; Liu, Y.; Zhang, L.; Li, S.; Zhang, Y.; Liu, J.; Wang, C.; Xiao, S. Profiling of subgingival plaque biofilm microbiota in adolescents after completion of orthodontic therapy. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0171550. [CrossRef]
36. Zaura, E.; Keijser, B.J.F.; Huse, S.M.; Crielaard, W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol.* **2009**, *9*, 259. [CrossRef]
37. Gomez, A.; Nelson, K.E. The oral microbiome of children: Development, disease, and implications beyond oral health. *Microb. Ecol.* **2017**, *73*, 492–503. [CrossRef]
38. Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.R.; Yu, W.H.; Lakshmanan, A.; Wade, W.G. The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 5002–5017. [CrossRef]
39. Wade, W.G. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 137–143. [CrossRef]
40. Carrouel, F.; Viennot, S.; Santamaria, J.; Veber, P.; Bourgeois, D. Quantitative molecular detection of 19 major pathogens in the interdental biofilm of periodontally healthy young adults. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [CrossRef]
41. Iwano, Y.; Sugano, N.; Matsumoto, K.; Nishihara, R.; Iizuka, T.; Yoshinuma, N.I.K. Salivary microbial levels in relation to periodontal status and caries development. *J. Periodontol. Res.* **2010**, *45*, 165–169. [CrossRef]
42. Sewón, L.A.; Parvinen, T.H.; Sinisalo, T.V.; Larmas, M.A.; Alanen, P.J. Dental status of adults with and without periodontitis. *J. Periodontol.* **1988**, *59*, 595–598. [CrossRef]
43. Sioson, P.B.; Furgang, D.; Steinberg, L.M.; Fine, D.H. Proximal caries in juvenile periodontitis patients. *J. Periodontol.* **2000**, *71*, 710–716. [CrossRef]
44. Durand, R.; Roufegarinejad, A.; Chandad, F.; Rompré, P.H.; Voyser, R.; Michalowicz, B.S.; Emami, E. Dental caries are positively associated with periodontal disease severity. *Clin. Oral Investig.* **2019**, 1–9. [CrossRef]

45. Chaffee, B.W.; Featherstone, J.D.B.; Gansky, S.A.; Cheng, J.; Zhan, L. Caries risk assessment item importance. *JDR Clin. Transl. Res.* **2016**, *1*, 131–142. [[CrossRef](#)]
46. Rindal, D.B.; Rush, W.A.; Perrin, N.A.; Maupomé, G.; Bader, J.D. Outcomes associated with dentists' risk assessment. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2006**, *34*, 381–386. [[CrossRef](#)]
47. The American Academy of Pediatric Dentistry. *Caries-Risk Assessment and Management for Infants, Children, and Adolescents*. 2014. Available online: https://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/BP_CariesRiskAssessment.pdf (accessed on 5 November 2018).
48. Guo, L.; Shi, W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J. Calif. Dent. Assoc.* **2013**, *41*, 107–109.
49. Krasse, B.; Fure, S. Root surface caries: A problem for periodontally compromised patients. *Periodontol.* **1994**, *4*, 139–147. [[CrossRef](#)]
50. Gross, E.L.; Beall, C.J.; Kutsch, S.R.; Firestone, N.D.; Leys, E.J.; Griffen, A.L. Beyond *Streptococcus mutans*: Dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e47722. [[CrossRef](#)]
51. Thenisch, N.L.; Bachmann, L.M.; Imfeld, T.; Leisebach Minder, T.; Steurer, J. Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res.* **2006**, *40*, 366–374. [[CrossRef](#)]
52. Beighton, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **2005**, *33*, 248–255. [[CrossRef](#)]
53. Johansson, I.; Witkowska, E.; Kaveh, B.; Lif Holgerson, P.; Tanner, A.C.R. The microbiome in populations with a low and high prevalence of caries. *J. Dent. Res.* **2016**, *95*, 80–86. [[CrossRef](#)]
54. Eriksson, L.; Lif Holgerson, P.; Esberg, A.; Johansson, I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* **2018**, *97*, 275–282. [[CrossRef](#)]
55. Aas, J.A.; Griffen, A.L.; Dardis, S.R.; Lee, A.M.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E.; Leys, E.J.; Paster, B.J. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 1407–1417. [[CrossRef](#)]
56. Gross, E.L.; Leys, E.J.; Gasparovich, S.R.; Firestone, N.D.; Schwartzbaum, J.A.; Janies, D.A.; Asnani, K.; Griffen, A.L. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 4121–4128. [[CrossRef](#)]
57. Tanner, A.C.R.; Mathney, J.M.J.; Kent, R.L.; Chalmers, N.I.; Hughes, C.V.; Loo, C.Y.; Pradhan, N.; Kanasi, E.; Hwang, J.; Dahlan, M.A.; et al. Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 1464–1474. [[CrossRef](#)]
58. Conrads, G.; de Soet, J.J.; Song, L.; Henne, K.; Sztajer, H.; Wagner-Döbler, I.; Zeng, A.P. Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J. Oral Microbiol.* **2014**, *6*, 26189. [[CrossRef](#)]
59. Drucker, D.B.; Shakespeare, A.P.; Green, R.M. The production of dental plaque and caries by the bacterium *Streptococcus salivarius* in gnotobiotic WAG/RIJ rats. *Arch. Oral Biol.* **1984**, *29*, 437–443. [[CrossRef](#)]
60. Burton, J.P.; Drummond, B.K.; Chilcott, C.N.; Tagg, J.R.; Thomson, W.M.; Hale, J.D.F.; Wescombe, P.A. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Med. Microbiol.* **2013**, *62*, 875–884. [[CrossRef](#)]
61. Kressirer, C.A.; Smith, D.J.; King, W.F.; Dobeck, J.M.; Starr, J.R.; Tanner, A.C.R. *Scardovia wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. *J. Oral Biosci.* **2017**, *59*, 135–141. [[CrossRef](#)]
62. Tanner, A.C.R.; Sonis, A.L.; Lif Holgerson, P.; Starr, J.R.; Nunez, Y.; Kressirer, C.A.; Paster, B.J.; Johansson, I. White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *J. Dent. Res.* **2012**, *91*, 853–858. [[CrossRef](#)]
63. Dzidic, M.; Collado, M.C.; Abrahamsson, T.; Artacho, A.; Stensson, M.; Jenmalm, M.C.; Mira, A. Oral microbiome development during childhood: An ecological succession influenced by postnatal factors and associated with tooth decay. *ISME J.* **2018**, *12*, 2292–2306. [[CrossRef](#)]
64. Ho, M.H.; Lamont, R.J.; Xie, H. Identification of streptococcus cristatus peptides that repress expression of virulence genes in porphyromonas gingivalis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
65. Teanpaisan, R.; Thitasomakul, S.; Piwat, S.; Thearmontree, A.; Pithpornchaiyakul, W.; Chankanka, O. Longitudinal study of the presence of *mutans streptococci* and lactobacilli in relation to dental caries development in 3–24 month old Thai children. *Int. Dent. J.* **2007**, *57*, 445–451. [[CrossRef](#)]

66. Piwat, S.; Teanpaisan, R.; Thitasomakul, S.; Thearmontree, A.; Dahlén, G. Lactobacillus species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol. Oral Microbiol.* **2010**, *25*, 157–164. [\[CrossRef\]](#)
67. Hamada, S.; Slade, H.D. Biology, immunology, and cariogenicity of streptococcus mutans. *Microbiol. Rev.* **1980**, *44*, 331–384.
68. Corby, P.M.; Lyons-Weiler, J.; Bretz, W.A.; Hart, T.C.; Aas, J.A.; Boumenna, T.; Goss, J.; Corby, A.L.; Junior, H.M.; Weyant, R.J.; et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 5753–5759. [\[CrossRef\]](#)
69. Caufield, P.W.; Schön, C.N.; Saraithong, P.; Li, Y.; Argimón, S. Oral lactobacilli and dental caries: A model for niche adaptation in humans. *J. Dent. Res.* **2015**, *94*, 1105–118S. [\[CrossRef\]](#)
70. Modesto, M.; Biavati, B.; Mattarelli, P. Occurrence of the family bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res.* **2006**, *40*, 271–276. [\[CrossRef\]](#)
71. Tanner, A.C.R.; Kent, R.L.; Holgerson, P.L.; Hughes, C.V.; Loo, C.Y.; Kanasi, E.; Chalmers, N.I.; Johansson, I. Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *J. Dent. Res.* **2011**, *90*, 1298–1305. [\[CrossRef\]](#)
72. Nair, S.; Kumar, V.S.; Krishnan, R.; Rajan, P. A comparative evaluation of bifidobacteria levels in early childhood caries and severe early childhood caries. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2017**, *9*, S82–S84. [\[CrossRef\]](#)
73. Manome, A.; Abiko, Y.; Kawashima, J.; Washio, J.; Fukumoto, S.; Takahashi, N. Acidogenic potential of oral bifidobacterium and its high fluoride tolerance. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1099. [\[CrossRef\]](#)
74. Jiang, S.; Gao, X.; Jin, L.; Lo, E.C.M. Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1978. [\[CrossRef\]](#)
75. Ferrazzano, G.F.; Scioscia, E.; Sateriale, D.; Pastore, G.; Colicchio, R.; Pagliuca, C.; Cantile, T.; Alcidì, B.; Coda, M.; Ingenito, A.; et al. In vitro antibacterial activity of pomegranate juice and peel extracts on cariogenic bacteria. *BioMed Res. Int.* **2017**, *2017*, 2152749. [\[CrossRef\]](#)
76. Hajishengallis, E.; Parsaei, Y.; Klein, M.I.; Koo, H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol. Oral Microbiol.* **2017**, *32*, 24–34. [\[CrossRef\]](#)
77. Xu, H.; Tian, J.; Hao, W.; Zhang, Q.; Zhou, Q.; Shi, W.; Qin, M.; He, X.; Chen, F. Oral microbiome shifts from caries-free to caries-affected status in 3-year-old chinese children: A longitudinal study. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2009. [\[CrossRef\]](#)
78. Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **2014**, *35*, 3–11. [\[CrossRef\]](#)
79. Tu, Y.; Ling, X.; Chen, Y.; Wang, Y.; Zhou, N.; Chen, H. Effect of *S. Mutans* and *S. Sanguinis* on growth and adhesion of *P. Gingivalis* and their ability to adhere to different dental materials. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2017**, *23*, 4539–5445. [\[CrossRef\]](#)
80. Hua, X.; Guy, S.; Cook, J.; William, C.; Greg, B.; Timothy, M.; Richard, J.; Lamont, R.J. Intergeneric communication in dental plaque biofilms. *J. Bacteriol.* **2000**, *128*, 7067–7069.
81. Zhu, Y.; Dashper, S.G.; Chen, Y.Y.; Crawford, S.; Slakeski, N.; Reynolds, E.C. Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e71727. [\[CrossRef\]](#)
82. Cogoni, V.; Morgan-Smith, A.; Fenno, J.C.; Jenkinson, H.F.; Dymock, D. Treponema denticola chymotrypsin-like proteinase (CTLP) integrates spirochaetes within oral microbial communities. *Microbiol. Read. Engl.* **2012**, *158*, 759–770. [\[CrossRef\]](#)
83. Peterson, S.N.; Snesrud, E.; Liu, J.; Ong, A.C.; Kilian, M.; Schork, N.J.; Bretz, W. The dental plaque microbiome in health and disease. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58487. [\[CrossRef\]](#)
84. Sharma, A.; Inagaki, S.; Sigurdson, W.; Kuramitsu, H.K. Synergy between Tannerella forsythia and Fusobacterium nucleatum in biofilm formation. *Oral Microbiol. Immunol.* **2005**, *20*, 39–42. [\[CrossRef\]](#)
85. Nath, S.G.; Raveendran, R. Microbial dysbiosis in periodontitis. *J. Indian Soc. Periodontol.* **2013**, *17*, 543–545. [\[CrossRef\]](#)
86. Kanasi, E.; Johansson, I.; Lu, S.C.; Kressin, N.R.; Nunn, M.E.; Kent, R.; Tanner, A.C.R. Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 378–383. [\[CrossRef\]](#)
87. Nakagawa, S.; Fujii, H.; Machida, Y.; Okuda, K. A longitudinal study from prepuberty to puberty of gingivitis. Correlation between the occurrence of Prevotella intermedia and sex hormones. *J. Clin. Periodontol.* **1994**, *21*, 658–665. [\[CrossRef\]](#)
88. Lee, H.J.; Kim, J.K.; Cho, J.Y.; Lee, J.M.; Hong, S.H. Quantification of subgingival bacterial pathogens at different stages of periodontal diseases. *Curr. Microbiol.* **2012**, *65*, 22–27. [\[CrossRef\]](#)

89. Becker, M.R.; Paster, B.J.; Leys, E.J.; Moeschberger, M.L.; Kenyon, S.G.; Galvin, J.L.; Boches, S.K.; Dewhirst, F.E.; Griffen, A.L. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 1001–1009. [[CrossRef](#)]
90. Belda-Ferre, P.; Alcaraz, L.D.; Cabrera-Rubio, R.; Romero, H.; Simón-Soro, A.; Pignatelli, M.; Mira, A. The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* **2012**, *6*, 46–56. [[CrossRef](#)]
91. Bik, E.M.; Long, C.D.; Armitage, G.C.; Loomer, P.; Emerson, J.; Mongodin, E.F.; Nelson, K.E.; Gill, S.R.; Fraser-Liggett, C.M.; Relman, D.A. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **2010**, *4*, 962–974. [[CrossRef](#)]
92. Aas, J.A.; Paster, B.J.; Stokes, L.N.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 5721–5732. [[CrossRef](#)]
93. Abusleme, L.; Dupuy, A.K.; Dutzan, N.; Silva, N.; Burleson, J.A.; Strausbaugh, L.D.; Gamonal, J.; Diaz, P.I. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* **2013**, *7*, 1016–1025. [[CrossRef](#)]
94. Ge, Y.; Caufield, P.W.; Fisch, G.S.; Li, Y. Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis colonization correlated with caries experience in children. *Caries Res.* **2008**, *42*, 444–448. [[CrossRef](#)]
95. Choi, H.; Kim, E.; Kang, J.; Kim, H.J.; Lee, J.Y.; Choi, J.; Joo, J.Y. Real-time PCR quantification of 9 periodontal pathogens in saliva samples from periodontally healthy Korean young adults. *J. Periodontal Implant Sci.* **2018**, *48*, 261–271. [[CrossRef](#)]
96. Suda, R.; Lai, C.H.; Yang, H.W.; Hasegawa, K. Eikenella corrodens in subgingival plaque: Relationship to age and periodontal condition. *J. Periodontol.* **2002**, *73*, 886–891. [[CrossRef](#)]
97. Noiri, Y.; Li, L.; Ebisu, S. The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J. Dent. Res.* **2001**, *80*, 1930–1934. [[CrossRef](#)]
98. Dye, B.A.; Tan, S.; Smith, V.; Lewis, B.G.; Barker, L.K.; Thornton-Evans, G.; Eke, P.I.; Beltrán-Aguilar, E.D.; Horowitz, A.M.; Li, C.H. Trends in oral health status: United States, 1988–1994 and 1999–2004. *Vital Health Stat.* **2007**, *11*, 1–92.
99. Yin, W.; Yang, Y.M.; Chen, H.; Li, X.; Wang, Z.; Cheng, L.; Yin, Q.D.; Fang, H.Z.; Fei, W.; Mi, F.L.; et al. Oral health status in Sichuan Province: Findings from the oral health survey of Sichuan, 2015–2016. *Int. J. Oral Sci.* **2017**, *9*, 10–15. [[CrossRef](#)]
100. Hou, R.; Mi, Y.; Xu, Q.; Wu, F.; Ma, Y.; Xue, P.; Xiao, G.; Zhang, Y.; Wei, Y.; Yang, W. Oral health survey and oral health questionnaire for high school students in Tibet, China. *Head Face Med.* **2014**, *10*, 17. [[CrossRef](#)]
101. Hu, J.; Jiang, W.; Lin, X.; Zhu, H.; Zhou, N.; Chen, Y.; Wu, W.; Zhang, D.; Chen, H. Dental caries status and caries risk factors in students ages 12–14 years in Zhejiang, China. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **2018**, *24*, 3670–3678. [[CrossRef](#)]
102. Yetimoglu, C.; Rafeiner, P.; Engel, D.; Fournier, J.Y. Spinal infections due to Eikenella corrodens: Case report and literature review. *Neurochirurgie.* **2014**, *60*, 197–200. [[CrossRef](#)]
103. Udaka, T.; Hiraki, N.; Shiomori, T.; Miyamoto, H.; Fujimura, T.; Inaba, T.; Suzuki, H. Eikenella corrodens in head and neck infections. *J. Infect.* **2007**, *54*, 343–348. [[CrossRef](#)]
104. Angulo López, I.; Aguirre Quiñonero, A.; Fernández Torres, M.; Alegría Echaury, E. Chorioamnionitis and neonatal septicaemia due to Eikenella corrodens. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* **2017**, *35*, 266–267. [[CrossRef](#)]
105. Sheng, W.S.; Hsueh, P.R.; Hung, C.C.; Teng, L.J.; Chen, Y.C.; Luh, K.T. Clinical features of patients with invasive Eikenella corrodens infections and microbiological characteristics of the causative isolates. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2001**, *20*, 231–236. [[CrossRef](#)]
106. Elikowski, W.; Małek-Elikowska, M.; Lisiecka, M.; Wróblewski, D.; Fertala, N. Eikenella corrodens endocarditis of the tricuspid valve in an intravenous drug user. *Pol. Merkur. Lek. Organ Pol. Tow. Lek.* **2017**, *42*, 81–83.
107. Kanasi, E.; Dewhirst, F.E.; Chalmers, N.I.; Kent, R.; Moore, A.; Hughes, C.V.; Pradhan, N.; Loo, C.Y.; Tanner, A.C.R. Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Res.* **2010**, *44*, 485–497. [[CrossRef](#)]
108. Luppens, S.B.I.; Kara, D.; Bandounas, L.; Jonker, M.J.; Wittink, F.R.A.; Bruning, O.; Breit, T.M.; Ten Cate, J.M.; Crielaard, W. Effect of veillonella parvula on the antimicrobial resistance and gene expression of Streptococcus mutans grown in a dual-species biofilm. *Oral Microbiol. Immunol.* **2008**, *23*, 183–189. [[CrossRef](#)]

109. Liljemark, W.F.; Bloomquist, C.G.; Bandt, C.L.; Pihlstrom, B.L.; Hinrichs, J.E.; Wolff, L.F. Comparison of the distribution of actinomyces in dental plaque on inserted enamel and natural tooth surfaces in periodontal health and disease. *Oral Microbiol. Immunol.* **1993**, *8*, 5–15. [[CrossRef](#)]
110. Tanner, A.C.R.; Milgrom, P.M.; Kent, R.; Mokeem, S.A.; Page, R.C.; Riedy, C.A.; Weinstein, P.; Bruss, J. The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J. Dent. Res.* **2002**, *81*, 53–57. [[CrossRef](#)]
111. Marchant, S.; Brailsford, S.R.; Twomey, A.C.; Roberts, G.J.; Beighton, D. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res.* **2001**, *35*, 397–406. [[CrossRef](#)]
112. Li, Y.; Zou, C.G.; Fu, Y.; Li, Y.; Zhou, Q.; Liu, B.; Zhang, Z.; Liu, J. Oral microbial community typing of caries and pigment in primary dentition. *BMC Genomics* **2016**, *17*, 558. [[CrossRef](#)]
113. Sampaio-Maia, B.; Caldas, I.M.; Pereira, M.L.; Pérez-Mongiovi, D.; Araujo, R. The Oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases. *Adv. Appl. Microbiol.* **2016**, *97*, 171–210.
114. Jia, G.; Zhi, A.; Lai, P.F.H.; Wang, G.; Xia, Y.; Xiong, Z.; Zhang, H.; Che, N.; Ai, L. The oral microbiota—A mechanistic role for systemic diseases. *Br. Dent. J.* **2018**, *224*, 447–455. [[CrossRef](#)]
115. Weber, E.; Reynaud, Q.; Suy, F.; Gagneux-Brunon, A.; Carricajo, A.; Guillot, A.; Botelho-Nevers, E. Bifidobacterium species bacteremia: Risk factors in adults and infants. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2015**, *61*, 482–484. [[CrossRef](#)]
116. Könönen, E.; Wade, W.G. Actinomyces and related organisms in human infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28*, 419–442. [[CrossRef](#)]
117. Datta, S.; Soliman, M.; Laguio, M. Actinomyces in blood: Is it clinically significant or insignificant? *Open Forum Infect. Dis.* **2017**, *4*, S554. [[CrossRef](#)]
118. Binder, D.; Zbinden, R.; Widmer, U.; Opravil, M.; Krause, M. Native and prosthetic valve endocarditis caused by *Rothia dentocariosa*: Diagnostic and therapeutic considerations. *Infection* **1997**, *25*, 22–26. [[CrossRef](#)]
119. Dhotre, S.V.; Davane, M.S.; Nagoba, B.S. Periodontitis, bacteremia and infective endocarditis: A review study. *Arch. Pediatr. Infect. Dis.* **2017**, *5*, e41067. [[CrossRef](#)]
120. Gondivkar, S.; Gadbaile, A.; Parikh, R.V. Role of oral foci in systemic diseases: An update. *Int. J. Contemp. Dent. Med. Rev.* **2017**, *1*–8.
121. Nordholm, A.C.; Vøgg, R.O.B.; Permin, H.; Katzenstein, T. Eikenella corrodens endocarditis and liver abscess in a previously healthy male, a case report. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 35. [[CrossRef](#)]
122. Beck, J.D.; Eke, P.; Heiss, G.; Madianos, P.; Couper, D.; Lin, D.; Moss, K.; Elter, J.; Offenbacher, S. Periodontal disease and coronary heart disease: A reappraisal of the exposure. *Circulation* **2005**, *112*, 19–24. [[CrossRef](#)]
123. Bagavant, H.; Dunkleberger, M.L.; Wolska, N.; Sroka, M.; Rasmussen, A.; Adrianto, I.; Montgomery, C.; Sivils, K.; Guthridge, J.M.; James, J.A.; et al. Antibodies to periodontogenic bacteria are associated with higher disease activity in lupus patients. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2019**, *37*, 106–111.
124. Bui, F.Q.; Almeida-da-Silva, C.L.C.; Huynh, B.; Trinh, A.; Liu, J.; Woodward, J.; Asadi, H.; Ojcius, D.M. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed. J.* **2019**, *42*, 27–35. [[CrossRef](#)]
125. Larsen, J.M. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* **2017**, *151*, 363–374. [[CrossRef](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Quantification des pathogènes carieux dans le microbiote interdentaire de jeunes adultes indemnes de caries (ARTICLE 4)

L'article « Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults » a été accepté le 19 septembre 2017 dans la revue PLoS ONE.

L'objectif de cette étude, menée entre le mois de janvier et d'avril 2015, était de décrire quantitativement et qualitativement le microbiote interdentaire de jeunes adultes âgés de 20 à 35 ans indemnes de caries afin de mieux appréhender le processus de lésions interproximales.

Lors de l'inclusion des vingt-cinq sujets, l'indice épidémiologique CAO a été utilisé afin de vérifier l'absence de lésions carieuses. Les sujets ont été soumis à un questionnaire médical et à un examen dentaire. Le biofilm interdentaire a été recueilli au niveau de 4 sites interdentaires (15-16, 25-26, 35-36 et 45-46) grâce à des brossettes interdentaires calibrées. Après extraction de l'ADN bactérien du biofilm, la PCR en temps réel a été utilisée pour analyser qualitativement et quantitativement les bactéries suivantes : *Streptococcus spp.*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterococcus faecalis* et le champignon *Candida albicans*.

L'échantillon était composé de 15 hommes et de 10 femmes avec un âge moyen de 26.8 ± 4.3 ans. Les sujets présentaient $28,9 \pm 1,2$ dents en bouche. Les dents manquantes étaient dues à l'absence des troisièmes molaires (97%) et aux extractions orthodontiques (3%). Au total, 60% des espaces interdentaires avaient un diamètre inférieur à 0,7 mm.

L'analyse par PCR en temps réel a montré que *Streptococcus spp.* était l'espèce la plus abondante ($3,2 \times 10^6$ bactéries dans un espace interdentaire), suivis de *Lactobacillus spp.* ($1,1 \times 10^5$ bactéries) et d'*Enterococcus spp.* ($2,2 \times 10^4$ bactéries), alors que *Enterococcus faecalis* n'a jamais été détecté.

Streptococcus mutans représentait $2,0 \times 10^5$ bactéries en moyenne dans un espace interdentaire. Les résultats démontraient que seulement 28% des sujets exprimés *Streptococcus mutans*. Une diminution de 3,5 fois s'observait entre les sujets âgés de 20 à 25 ans et ceux âgés de 30 à 35 ans.

Le sexe n'a eu aucun impact sur les valeurs moyennes de chaque agent pathogène. De même, le nombre total de bactéries et la moyenne de chaque agent pathogène n'ont pas été affectés de manière significative en fonction de la localisation, maxillaire ou mandibulaire. Le nombre total de *Streptococcus spp.*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.* et *Enterococcus spp.* a augmenté avec le diamètre de l'espace interdentaire, à l'exception du diamètre 0,9 mm, où la quantité était inférieure au diamètre 0,8 mm. Le nombre de *Candida albicans* a augmenté de manière significative pour les diamètres compris entre 0,6 et 0,9 mm et a diminué pour le diamètre 1,1 mm.

Le dentogramme réalisé a mis en évidence une corrélation forte entre les espèces bactériennes qui se présente sous la forme de deux clusters. *Candida albicans* et la bactérie *Enterococcus spp.* se regroupent et *Streptococcus spp.*, *Streptococcus mutans* et *Lactobacillus spp.* forment un groupe distinct.

L'espace interdentaire représente un lieu très spécifique qui est anatomiquement difficilement accessible au brossage. Le biofilm présent dans cet espace interdentaire des jeunes adultes indemnes de lésions carieuses est composé d'agents pathogènes tel que *Streptococcus spp.*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* et *Candida albicans*. Ces bactéries peuvent induire des caries interproximales mais aussi intervenir dans le processus parodontal.

RESEARCH ARTICLE

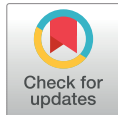
Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults

Denis Bourgeois^{1,2}*, Alexandra David¹*, Camille Inquimbert¹, Paul Tramini³, Nicolas Molinari⁴, Florence Carrouel^{1,5}

1 Laboratory "Systemic Health Care" EA4129, University Lyon 1, Lyon, France, **2** Department of Prevention and Public Health, Faculty of Dentistry, University Lyon 1, Lyon, France, **3** Department of Dental Public Health, University of Montpellier, Montpellier, France, **4** Service DIM, CHU de Montpellier, UMR 5149 IMAG, University of Montpellier, Montpellier, France, **5** Department Basic and Clinical Biological Sciences, Faculty of Dentistry, University Lyon 1, Lyon, France

* These authors contributed equally to this work.

* denis.bourgeois@univ-lyon1.fr



Abstract

Background

The majority of caries lesions in adults occur on the proximal tooth surfaces of the posterior teeth. A comprehensive study of the composition of the oral microbiota is fundamental for a better understanding of the etiology of interdental caries.

Methods

Twenty-five caries-free subjects (20–35 years old) were enrolled in the study. The interdental biofilm of four interdental sites were collected. The real-time polymerase chain reaction (PCR) methodology were used to quantify (i) the following bacteria: *Streptococcus spp.*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, and *Enterococcus faecalis*; (ii) the fungus *Candida albicans*; and (iii) total bacteria.

Results

Streptococcus spp. was the most abundant species, followed by *Lactobacillus spp.* and *Enterococcus spp.* *Streptococcus spp.* and *Lactobacillus spp.* were detected at all tested sites and *Enterococcus spp.* at 99% of sites. *S. mutans* was detected at only 28% of the tested sites and *C. albicans* was detected at 11% of sites. *E. faecalis* was never detected. In 54.5% of the biofilm inhabited by *C. albicans*, *S. mutans* was present. Moreover, 28% of the ID sites co-expressed *S. mutans* and *Lactobacillus spp.* The studied pathogens were organized into two correlated groups of species. Strikingly, the fungus *C. albicans* and the bacteria *Enterococcus spp.* cluster together, whereas *Streptococcus spp.*, *S. mutans* and *Lactobacillus spp.* form one distinct cluster.

OPEN ACCESS

Citation: Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F (2017) Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. PLoS ONE 12(10): e0185804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804>

Editor: Daniela Flavia Hozbor, Universidad Nacional de la Plata, ARGENTINA

Received: July 2, 2017

Accepted: September 19, 2017

Published: October 10, 2017

Copyright: © 2017 Bourgeois et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusion

The interdental biofilm of young caries-free adults is comprised of pathogens that are able to induce interproximal caries. That several of these pathogens are implicated in heart disease or other systemic diseases is an argument for the disruption of interdental biofilms using daily oral hygiene.

Introduction

The 2010 Global Burden of Disease Study found that oral conditions affected 3.9 billion people worldwide and that the estimation of untreated caries of permanent teeth was 2.4 billion [1, 2]. Dental caries is a multifactorial, chronic bacterial disease that may result in cavity formation in the enamel, dentine and cementum [3].

The incidence of untreated caries predominates below the age of 35 and decreases with increasing age, although it remains a significant problem in the upper age categories [4]. The majority of caries lesions in adolescents and adults occur on the proximal tooth surfaces of the posterior teeth [5, 6, 7].

Many distinct habitats may be identified on individual teeth, with each habitat containing a unique biofilm community [8]. Tooth habitats favorable for harboring pathogenic biofilm include the smooth enamel surfaces immediately gingival to the proximal contacts and in the gingival third of the facial and lingual surfaces of the clinical crown [9]. These areas are protected physically and are relatively free from the effects of mastication, tongue movement, and salivary flow [9]. Local gingival changes in this area will lead to a protected surface for biofilm accumulation [10]. The relationship between gingivitis and caries on the proximal surface is narrow [11].

More importantly, the microbial structure varies with ageing. In addition, only a few taxa are present across the entire population, indicating that a core oral microbiome should be defined based on age and oral niche [12]. The types and numbers of organisms composing the proximal surface biofilm community vary [13]. The mesial surface of a molar may be carious and have a biofilm dominated by large populations of *Streptococcus mutans* and lactobacilli, whereas the distal surface may lack these organisms and be caries-free [13]. The intra- and inter-individual progression of proximal caries fluctuates, indicating different cariogenic conditions [14].

The literature on interdental (ID) supragingival microbial profiles applied to caries lesions is extremely limited. Currently, no studies have addressed the ID biofilm of caries-free adults. It remains unclear which microorganisms positively or negatively impact patients with regards to clinical considerations [15, 16].

The goal of this study is to describe the interproximal microbiota in caries-free young adults. Thus, a quantitative detection method using real-time polymerase chain reaction (PCR) was employed to quantify 6 major cariogenic pathogens, including (i) the bacteria: *Streptococcus* spp. (Spp), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, Sm), *Lactobacillus* spp. (Lsp), *Enterococcus* spp. (Esp), and *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*, Ef); and (ii) the fungus *Candida albicans* (*C. albicans*, Ca).

The results of this research can be used to considerably improve the dental condition of adolescents and young adults. Standard dental therapy does not yet include any microbiological based approach into its armamentarium. The results can be used to make decisions with respect to molecular analyses for new policies covering the provision of services instituting

new procedures (e.g., micro-invasive treatment of proximal caries lesions), practices and interventions (e.g., non-invasive professional treatment) or to provide advice for prevention (e.g., an interdental brush (IDB)) related to dental health care delivery.

Materials and methods

The workflow of this research is detailed in Fig 1.

Subject population

Twenty-five Caucasian subjects diagnosed as caries-free were recruited between January and April 2015 from a pool of first-time volunteers who were referred to the Department of Public Health of the Faculty of Oral Medicine at the University of Lyon (UCBL), France. Written informed consent was obtained from all enrolled individuals in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was reviewed and approved by the Local Ethics Committee and by the National Commission of Informatics and Liberties, France.

The inclusion criteria were (i) 20–35 years old (male or female), (ii) good general health, not pregnant or breastfeeding and on contraceptive therapy, (iii) good oral hygiene, (iv) good diet (Healthy Eating Index score greater than 80), (v) no health conditions that required antibiotic prophylaxis before interproximal probing, (vi) no oral diseases (such as dental caries, periodontal disease, periapical disease, oral mucosal disease, or severe halitosis), (vii) tooth brushing at least twice per day, (viii) no experience with interdental cleaning—interdental brushing or dental flossing, (ix) no intake of systemic antimicrobials during the previous 6 months, (x) no use of chlorhexidine or over-the-counter mouthwash, (xi) no implants or orthodontic appliances, (xii) no previous periodontal illness or treatment, (xiii) the presence of at least 24 natural teeth, (xiv) the presence of 4 premolar-molar pairs, (xv) non-smokers, and (xvi) a willingness to return 3 weeks after the clinical investigation for microbiological tests.

The clinical inclusion criteria for each premolar-molar interdental site were (i) accessibility of the interdental space for the 4 sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46, according to the FDI's two-digit notation system [17]) by the interdental brush in each subject, (ii) no interproximal caries or dental or prosthetic restorations, (iii) no interdental diastema, (iv) no clinical signs of inflammation, such as redness, swelling, or bleeding on probing (BOP) after 30 s, (v) no pocket depth (PD) or $PD \leq 3$ mm or clinical attachment loss (CAL) > 3 mm, and (vi) the subjects were judged to be free of gingivitis or periodontitis.

The exclusion criteria were (i) teeth missing due to periodontal reasons, (ii) having any other concomitant systemic disorder, (iii) having diseases affecting the immune system, (iv) receiving medication, such as anti-platelet or anti-coagulant agents, (v) having a professional prophylaxis 4 weeks prior to the baseline examination, (vi) having a history of periodontal disease or treatment, and (vii) subjects undergoing a course of dental or orthodontic treatment.

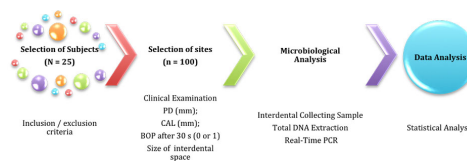


Fig 1. Workflow of the experiment.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g001>

Classification of subjects as caries-free

The dental health status of individuals was determined by measuring the Decayed, Missing, and Filling Teeth (DMFT) index. This index is recognized in epidemiology for assessing dental caries prevalence and indicates the necessary treatments. Moreover, the DMFT index was recorded to measure the severity of each subject's dental caries according to the criteria from the World Health Organization 4th-edition publication of "Oral Health Surveys, Basic Method" [18].

Clinical examination

Standardized clinical monitoring was performed three weeks before microbiological monitoring. The subjects were submitted to a medical/dental anamnesis, and information regarding subject age, gender and smoking status was obtained. A trained and calibrated professional dentist performed the clinical examination. Clinical assessments of the interdental spaces were performed using an IAP Curaprox colorimetric probe (Curaden, Kriens, Switzerland), and the diameters of all the interdental spaces of 4 teeth were registered (premolar-molar). At the end of the examination visit, the participants were instructed to brush their teeth 3 hours before the sampling visit and not to drink, eat or practice oral hygiene during this period.

Interdental sample collection

For all subjects, the same four interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) were assessed (total of 100 sites). The appropriate CPS prime interdental brushes (Curaden, Kriens, Switzerland) were selected based on the clinical assessment of the interdental spaces [19]. Each previously selected tooth was isolated with sterile cotton rolls and the interdental biofilm was removed with a sterile, calibrated interdental brush. For each sample, the IDBs were placed in 1.5 mL sterile microcentrifuge tubes and stored at 4°C until the DNA was extracted one hour later.

Microbiological analysis

Total deoxyribonucleic acid (DNA) extraction. Total DNA was isolated from the interdental brushes using the QIAcube[®] HT Plasticware and Cador[®] Pathogen 96 QIAcube[®] HT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's guidelines. The elution volume used in this study was 150 µL. DNA quality and quantities were measured using an ultraviolet spectrophotometer. The DNA sample was considered pure if the A260/A280 ratio was in the range of 1.8–2 and the A260/A230 ratio was in the range of 2–2.2.

Quantitative real-time PCR assays. To quantify the total bacterial load (TB) and that of 6 pathogens (*Streptococcus* spp., *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *E. faecalis*, and *C. albicans*) present in the biofilm interdental samples, qPCR was undertaken using universal primers for the 16S rRNA genes and species-specific primer sets. Each sample was analyzed in triplicate.

The *Ca* strain (DSM No. 6659), *Espp* strain (*Enterococcus faecalis* DSM No. 24916), *Ef* strain (DSM No. 24916), *Lspp* strain (*Lactobacillus casei* CIP No. 102237), *S. mutans* strain (DSM No. 20523), and *Sspp* strain (*S. mitis* DSM No. 12643) were obtained from DSMZ (Germany), the CIP Collection of the Institut Pasteur or from the BCMMLMG Bacteria Collection and provided by Institut Clinident SAS (Aix en Provence, France).

The pathogenic strains were cultivated on the appropriate selective media. The total number of cells (number of colony forming units) was enumerated three times using a Neubauer chamber. Serial dilutions ranging from 10x10² to 10x10¹² cells were utilized, and each of

these dilutions was enumerated in duplicate. The DNA from each of these dilutions was extracted. A standard curve for each pathogen was generated as a plot between the crossing point (cycle number) and the initial cell count. The TB standard curve was made from *Escherichia coli* as described by Ott and colleagues [20]. The limit of quantification (LOQ) of the method for each pathogen is summarized in Table 1.

Simplex quantitative real-time PCR assays were performed in a 10 µL reaction composed of 1× SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Tli RNaseH Plus (TaKaRa, Shiga, Japan), 2 µL of the extracted DNA and 1 µM of each primer. The bacterial primers used are derived from previously published ribosomal 16S sequences and have been adapted to the real-time PCR conditions (Table 1). *Candida albicans* primers used in this study are derived from ribosomal 18S sequence. These PCR primers were manufactured by Metabion International AG (Planegg, Germany). For each pathogen, a positive and a negative control with sterile distilled water were included throughout the procedures.

The assays were performed on the Rotor-Gene[®] Q thermal cycling system (Qiagen, Hilden, Germany) with the following program: 95°C for 30 s, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at the appropriate annealing temperature (Table 1), and 35 s at 72°C. For the total bacterial load and that of all species, a final melting curve analysis (70°C to 95°C in 1°C steps at 5 s increments) was performed. Fluorescence signals were measured every cycle at the end of the extension step and continuously during the melting curve analysis. The resulting data were analyzed using Rotor-Gene[®] Q Series software (Qiagen, Hilden, Germany).

Statistical analysis

The statistical analysis consisted of three main steps: producing descriptive summaries of the data, modeling the data using a mixed (linear) model and assessing the correlations between bacterial abundances. Prior to these steps, we transformed the original count data to handle missing data points; that is, the measurements that fell under the quantification threshold (limit of quantification, LOQ) of the quantitative real-time PCR device. The missing values for a given species were replaced by half of the corresponding quantification thresholds given in Table 1. We performed simulations to ensure that this simple strategy provided a reasonable estimation of the mean and standard deviation of the original count distribution. To test for potential effects of sex, age, interdental space and the location of each site, we used a mixed

Table 1. Species-specific and ubiquitous real-time PCR primers for 6 pathogens, the annealing temperature, and the limit of quantification.

Target	Primer pairs (5'-3')	References	Annealing temp (°C)	LOQ (E+02)
TB	CCATGAAGTCGGAATCGCTAGT GCTTGACGGGCGTGTG	[21]	66	200
<i>Ca</i>	ACTTCTGTAAGAGTGTGGTTC TGTCGTAATCAAACCTCGGTAGC	[22]	54	4
<i>Espp</i>	TACTGACAACCATTTCATGATG AACTTCGTCACCAACCGGAAC	[23]	55	5
<i>Ef</i>	CCGAGTGCTTGCACTCAATTGG CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC	[24]	54	5
<i>Lspp</i>	TGGAAACAGRTGCTAATACCG GTCCATTGTGGAAGATTCCC	[25]	62	10
<i>S. mutans</i>	GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT GCCATACACCACATCATGAATTGA	[26]	66	8
<i>Streptococcus spp.</i>	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG GTACCGTCACAGTATGAACCTTCC	[23]	66	10

LOQ: Limit of quantification; TB: Total bacterial count.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.t001>

linear model for the count abundance of each species at a measured site. This model includes two categorical variables as fixed effects (sex and mouth location), two numerical variables as fixed effects (age and interdental space) and one categorical variable as a random effect (subject). This random effect was introduced for a subject to model the correlation between the four sites of a given subject. Each coefficient in the regression was tested against the null hypothesis, which indicated that the coefficient is zero using a likelihood ratio test, and we reported that p-values less than 0.05 were evidence against the null hypothesis. To perform the correlation analysis, we used the residuals of the model described above to avoid over-estimating the inter-site correlation (sites from the same patient are positively correlated, and we observed that fixed effects can also induce a correlation among sites). The trees associated to the correlation plot were obtained by hierarchical clustering with complete linkage.

All statistical analyses and associated plots were performed using the R environment (R Core Team, 2015), specifically the lme4 package [27], to estimate the mixed model.

Results

Age, sex, and clinical characteristics of the study group

The sample group was composed of 15 males and 10 females 20 to 35 years of age with a mean body mass index of 22.7 (Table 2). Clinically, less than 10% of sites presented BOP after 30 s and/or overt gingival redness. No PD or $PD \leq 3$ mm or $CAL > 3$ mm were observed. The subjects were characterized by a DMFT index of zero. The mean number of teeth was 28.9 ± 1.2 . Missing teeth were due to absence of the third molars (97%) and orthodontic extractions (3%). A total of 60% of interdental spaces had a diameter less than 0.7 mm.

Individual pathogen count

The count for the total of bacteria by subject is presented in Fig 2A and S1 Table. The proportion of the 6-evaluated species in the samples is described in Fig 2B and the frequency in Table 3. Variations between the subjects and the sites in the carriage of certain bacteria were observed. Subject 21 had high levels of *C. albicans*, whereas certain other subjects carried *S.*

Table 2. Age, sex, and characteristics of the full mouth of the study group. The values are the mean \pm standard deviation, and the numbers of subjects are indicated.

Subjects	
Age (years)	26.8 \pm 4.6
Sex	
Male	15
Female	15
Body mass index	22.7 \pm 1.8
Mouth	
Teeth	28.9 \pm 1.2
Interdental space diameter (%)	
0.6 mm	5
0.7 mm	55
0.8 mm	25
0.9 mm	8
1.1 mm	7
Bleeding on probing (%)	0.16 \pm 0.08
Plaque index	0.24 \pm 0.52

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.t002>

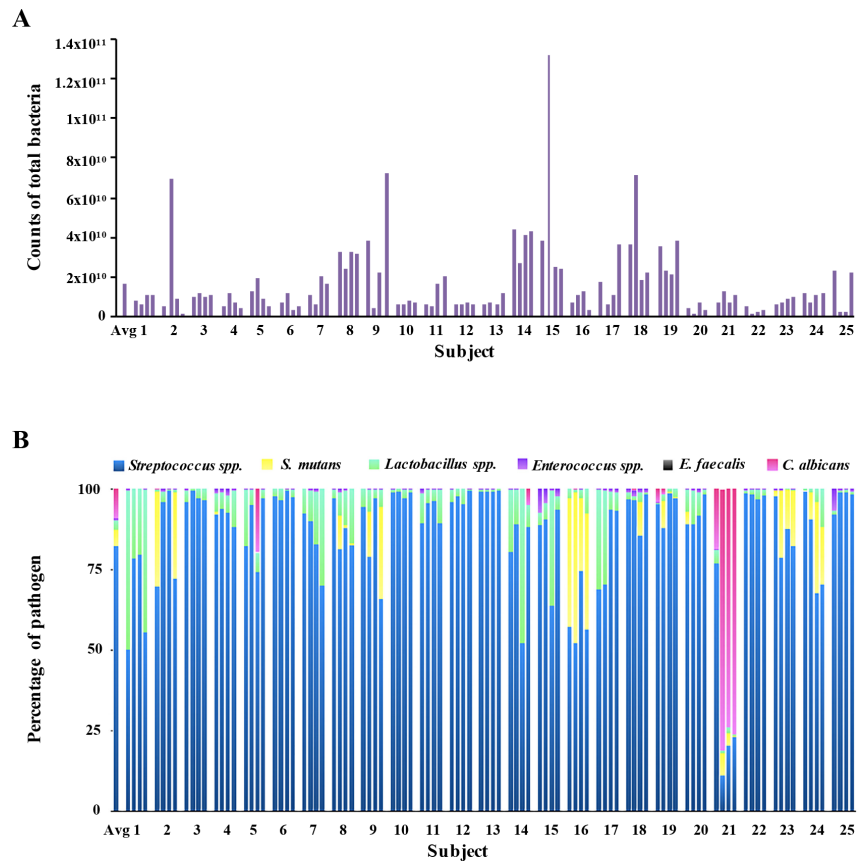


Fig 2. Abundance of pathogens among the subjects. A. Counts of total bacteria among the subjects. The first bar displays the average proportion of total bacteria in the population. The other bars display the average proportion of each pathogen in one site. Each subject corresponds to a group of four stacked bars (one for each measured site). B. Relative abundance of pathogens among the subjects. Percentage of pathogen = Counts of the pathogen / Counts of the 6 pathogens. The first bar displays the average proportion of each pathogen in the population. The other bars display the average proportion of each pathogen in one site. Each subject corresponds to a group of four stacked bars (one for each measured site). Avg: Average.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g002>

mutans, including subjects 2, 8, 9, 16, 23 and 24. *Streptococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. were detected (number of bacteria > LOQ) at all tested sites and *Enterococcus* spp. at 99% of sites while *S. mutans* was detected at only 28% of the tested sites. *E. faecalis* was never detected. In 11% of sites, *C. albicans* was detected. Among them, at 3 sites, *C. albicans* represented more than 80% of the bacteria tested, whereas *Streptococcus* spp. was only between 11% and 22% (Fig 2B). In 54.5% of interdental biofilms (6 from the 11 ID sites expressing *C. albicans*) inhabited by *C. albicans*, *S. mutans* was present. Moreover, 28% of the ID sites co-expressed *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. Among them, 71.5% revealed a higher quantity of *S. mutans* than *Lactobacillus* spp.

Table 3. Distribution of the pathogens according to sites and subjects. "Positive sites" correspond to the number of sites expressing one pathogenic species or the total bacteria (TB). "Positive subjects" indicates the number of subjects expressing one pathogenic species or the total bacteria. n: total number of sites or subjects tested; Sspp: *Streptococcus* spp.; Sm: *Streptococcus mutans*; Lspp: *Lactobacillus* spp.; Espp: *Enterococcus* spp.; Ef: *Enterococcus faecalis*; Ca: *Candida albicans*.

Variable		n	Sspp	Sm	Lspp	Espp	Ef	Ca
All	Positive sites	100	100	28	100	99	0	11
	Positive subjects	25	25	11	25	25	0	7
Age (years)								
20–25	Positive sites	44	44	10	44	43	0	1
	Positive subjects	11	11	3	11	11	0	1
25–30	Positive sites	24	24	7	24	24	0	3
	Positive subjects	6	6	3	6	6	0	3
30–35	Positive sites	32	32	11	32	32	0	7
	Positive subjects	8	8	5	8	8	0	3
Sex								
Male	Positive sites	60	60	11	60	59	0	6
	Positive subjects	15	15	4	15	15	0	3
Female	Positive sites	40	40	17	40	40	0	5
	Positive subjects	10	10	7	10	10	0	4
Arcade								
Upper	Positive sites	50	50	13	50	50	0	7
	Positive subjects	25	25	11	25	25	0	5
Lower	Positive sites	50	50	15	50	49	0	4
	Positive subjects	25	25	13	25	25	0	4
IDB size								
0.6 mm	Positive sites	5	5	1	5	5	0	0
	Positive subjects	3	3	1	3	3	0	0
0.7 mm	Positive sites	55	55	11	55	54	0	7
	Positive subjects	20	20	6	20	20	0	6
0.8 mm	Positive sites	25	25	9	25	25	0	1
	Positive subjects	17	17	7	17	17	0	1
0.9 mm	Positive sites	8	8	3	8	8	0	2
	Positive subjects	5	5	2	5	5	0	1
1.1 mm	Positive sites	7	7	4	7	7	0	1
	Positive subjects	4	4	4	4	4	0	1

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.t003>

Total genome count and pathogen count

Fig 3A illustrates the abundance of the 6 evaluated pathogens in the collected samples. One interdental space (ID space) carried on average approximately 1×10^{10} bacteria. The pathogens tested presented various levels of expression. *Streptococcus* spp. was the most abundant species (3.2×10^6 bacteria in one ID space), followed by *Lactobacillus* spp. (1.1×10^5 bacteria in one ID space) and *Enterococcus* spp. (2.2×10^4 bacteria in one ID space). *S. mutans* represented an average of 2.0×10^5 bacteria in one ID space for all sites regardless of detection (Table 3). However, only in 11 of the 25 subjects tested was *S. mutans* detected (Table 3) with levels ranging from 3.4×10^3 to 3.4×10^6 bacteria in one ID space. *E. faecalis* was not detected. *C. albicans* was detected only in 11 sites (Table 3) with amounts varying from 9×10^3 to 1.8×10^7 bacteria in one ID space (Fig 3B).

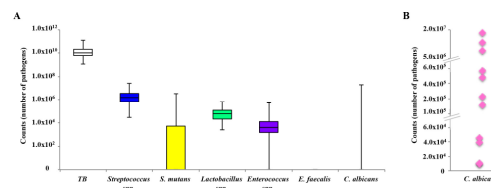


Fig 3. Abundance of bacterial species among the interdental sites. A. Box plots representing, for each pathogen, the first, median, and third quartiles, from bottom to top. The first box on the left corresponds to the total bacteria (TB). TB: total bacterial load. B. Count of *C. albicans* according to sites.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g003>

Impact of age and sex on the genome count

The comparison of the mean value of each pathogen according to sex and age is shown in Fig 4 and in Table 4. There was a strong increase for *C. albicans* (more than 200 times), for *Enterococcus* spp. (5.8 times) and a significant decrease for *S. mutans* (3.5 times) between the subjects aged from 20 to 25 years and those aged 30 to 35 years ($p < 0.05$, T-test). The other pathogens tested did not appear to be affected by age. No significant differences were observed by sex.

Impact of arcade location and interdental space diameter

The comparison of the mean value of each pathogen according to arcade location and the interdental space diameter is shown in Fig 5 and in Table 4. The TB and the quantity of pathogens were not significantly affected according to arcade location. The genome counts of *Streptococcus* spp., *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., and *Enterococcus* spp. increased with the diameter of the interdental space except for the diameter of 0.9 mm, where the quantity was lower than for the diameter of 0.8 mm. In parallel, the number of the fungi *C. albicans* increased significantly for diameters ranging from 0.6 to 0.9 mm and decreased for the diameter of 1.1 mm.

Pathogen correlations

The dendrogram (Fig 6) underscores the correlations between our 5-pathogenic species and the 100 measured ID sites. Even after the removal of the fixed effects related to interdental space and age, and the subtraction of the inter-site correlations, the matrix still reveals a strong correlation structure, which appears as two groups (or clusters) of correlated species. The fungus *C. albicans* and the bacteria *Enterococcus* spp. cluster together, whereas *Streptococcus* spp., *S. mutans* and *Lactobacillus* spp. form one distinct cluster.

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first report regarding the absolute quantification of cariogenic pathogens detected in interdental biofilms from caries-free young adults. An understanding of the process associated with the initiation and progression of interproximal cariogenic diseases could be of great help in establishing effective ways to prevent this disease. In terms of oral health, the interdental space represents a very specific location. Anatomically, it is hardly accessible to brushing. Physiologically, many bacterial species are present, including virulent ones [28]. It is not only the location where periodontal diseases such as gingivitis and periodontitis are initiated but also the location of the initiation of interproximal caries.

Oral streptococci are major constituents of dental plaque [29]. They initiate the colonization process and represent more than 80% of the early biofilm constituents [30]. Their high

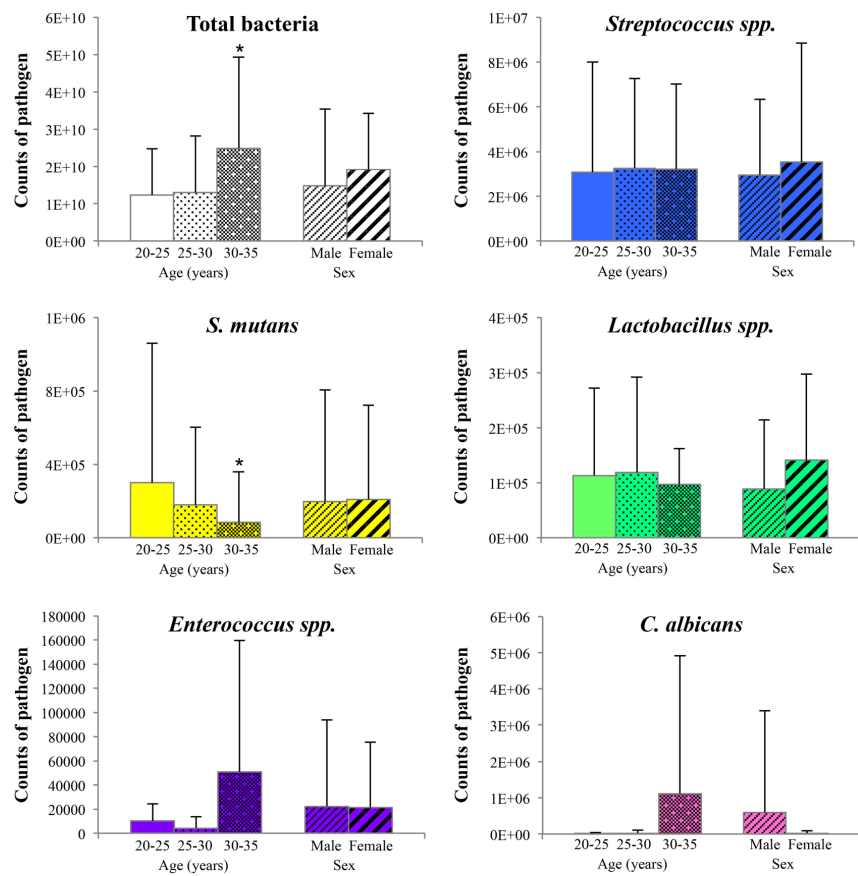


Fig 4. Quantification of the pathogens according to age and sex. Total counts from each pathogen were averaged across sites in each subgroup. Error bars represent standard deviations. Comparisons: * $p < 0.05$, by using SUDAAN 7.0 (procedures DESCRIPT and REGRESS) to account for clustering (multiple sites within the subjects).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g004>

abundance and their high prevalence (100% of ID biofilms tested were positive) suggest that they can act as a factor in the formation of oral biofilm [31].

The gender, the age and the arcade location do not impact the colonization of the ID biofilm by *Streptococcus* spp. The genus *Streptococcus* contains several species, including in particular but not exclusively *Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, and *Streptococcus sobrinus*. During the carious process, these different species may play various roles [32].

Although not considered an early colonizer, the best-studied oral streptococci are the opportunistic pathogen *S. mutans* [33, 34]. Its prevalence in human caries cases ranges from 70 to 100% [33]. *S. mutans* has been linked to crown caries in children and adolescents [35, 36] and to root caries in elderly patients [37]. *S. mutans* was found extensively in caries-active subjects [35, 36, 38]. Its role in caries development is well established [39]. Its metabolic activity but not

Table 4. Average abundance of the 6 pathogens in various subgroups. The column labelled "TB" indicates the mean abundance of the total bacteria, whereas the other columns indicate the mean abundance of each pathogen species. Data are expressed as the mean ± standard deviation. n: number of sites; TB: total bacterial load.

Variable	n	TB	Sspp	Sm	Lspp	Espp	Ef	Ca
All	100	1.7x10 ¹⁰ ± 1.9x10 ¹⁰	3.2x10 ⁰⁶ ± 4.2x10 ⁰⁶	2.0x10 ⁰⁵ ± 5.7x10 ⁰⁵	1.1x10 ⁰⁵ ± 1.4x10 ⁰⁵	2.2x10 ⁰⁴ ± 6.5x10 ⁰⁴	0.0	3.6x10 ⁰⁵ ± 2.2x10 ⁰⁶
Age (years)								
20–25	44	1.1x10 ¹⁰ ± 1.1x10 ¹⁰	3.1x10 ⁰⁶ ± 4.9x10 ⁰⁶	3.0x10 ⁰⁵ ± 7.6x10 ⁰⁵	1.0x10 ⁰⁵ ± 1.5x10 ⁰⁵	1.0x10 ⁰⁴ ± 1.4x10 ⁰⁴	0.0	5.2x10 ⁰³ ± 3.5x10 ⁰⁴
25–30	24	1.5x10 ¹⁰ ± 1.7x10 ¹⁰	3.3x10 ⁰⁶ ± 4.0x10 ⁰⁶	1.8x10 ⁰⁵ ± 4.2x10 ⁰⁵	1.4x10 ⁰⁵ ± 1.9x10 ⁰⁵	4.2x10 ⁰³ ± 9.1x10 ⁰³	0.0	2.2x10 ⁰⁴ ± 9.1x10 ⁰⁴
30–35	32	2.5x10 ¹⁰ ± 2.4x10 ¹⁰	3.2x10 ⁰⁶ ± 3.8x10 ⁰⁶	8.4x10 ⁰⁴ ± 2.8x10 ⁰⁵	9.7x10 ⁰⁴ ± 6.5x10 ⁰⁴	5.8x10 ⁰⁴ ± 1.1x10 ⁰⁵	0.0	1.1x10 ⁰⁶ ± 3.8x10 ⁰⁶
Sex								
Male	60	1.5x10 ¹⁰ ± 2.1x10 ¹⁰	2.9x10 ⁰⁶ ± 3.5x10 ⁰⁶	2.0x10 ⁰⁵ ± 6.1x10 ⁰⁵	8.9x10 ⁰⁴ ± 1.3x10 ⁰⁵	2.2x10 ⁰⁴ ± 7.2x10 ⁰⁴	0.0	5.9x10 ⁰⁵ ± 2.8x10 ⁰⁶
Female	40	1.9x10 ¹⁰ ± 1.5x10 ¹⁰	3.5x10 ⁰⁶ ± 5.3x10 ⁰⁶	2.1x10 ⁰⁵ ± 5.1x10 ⁰⁵	1.4x10 ⁰⁵ ± 1.5x10 ⁰⁵	2.1x10 ⁰⁴ ± 5.4x10 ⁰⁴	0.0	1.7x10 ⁰⁴ ± 7.8x10 ⁰⁴
Arcade								
Upper	50	1.8x10 ¹⁰ ± 2.3x10 ¹⁰	3.5x10 ⁰⁶ ± 5.1x10 ⁰⁶	1.9x10 ⁰⁵ ± 5.0x10 ⁰⁵	1.0x10 ⁰⁵ ± 1.1x10 ⁰⁵	3.3x10 ⁰⁴ ± 8.9x10 ⁰⁴	0.0	3.8x10 ⁰⁵ ± 2.6x10 ⁰⁶
Lower	50	1.5x10 ¹⁰ ± 1.4x10 ¹⁰	2.8x10 ⁰⁶ ± 3.2x10 ⁰⁶	2.2x10 ⁰⁵ ± 6.4x10 ⁰⁵	1.2x10 ⁰⁵ ± 1.6x10 ⁰⁵	1.1x10 ⁰⁴ ± 1.7x10 ⁰⁴	0.0	3.5x10 ⁰⁵ ± 1.8x10 ⁰⁶
IDB size								
0.6 mm	5	9.8x10 ⁰⁹ ± 6.4x10 ⁰⁹	1.2x10 ⁰⁶ ± 1.1x10 ⁰⁶	2.1x10 ⁰⁴ ± 4.6x10 ⁰⁴	8.9x10 ⁰⁴ ± 3.0x10 ⁰⁴	3.0x10 ⁰³ ± 1.7x10 ⁰³	0.0	0.0
0.7 mm	55	1.3x10 ¹⁰ ± 1.1x10 ¹⁰	2.1x10 ⁰⁶ ± 2.6x10 ⁰⁶	1.1x10 ⁰⁵ ± 3.7x10 ⁰⁵	9.4x10 ⁰⁴ ± 1.3x10 ⁰⁵	7.9x10 ⁰³ ± 1.4x10 ⁰⁴	0.0	2.5x10 ⁰⁴ ± 1.0x10 ⁰⁵
0.8 mm	25	1.9x10 ¹⁰ ± 1.9x10 ¹⁰	4.3x10 ⁰⁶ ± 4.2x10 ⁰⁶	3.3x10 ⁰⁵ ± 8.3x10 ⁰⁵	1.1x10 ⁰⁵ ± 1.6x10 ⁰⁵	3.8x10 ⁰⁴ ± 1.1x10 ⁰⁵	0.0	4.6x10 ⁰⁵ ± 2.3x10 ⁰⁶
0.9 mm	8	3.3x10 ¹⁰ ± 4.2x10 ¹⁰	2.3x10 ⁰⁶ ± 1.6x10 ⁰⁶	2.2x10 ⁰⁵ ± 5.3x10 ⁰⁵	1.1x10 ⁰⁵ ± 6.2x10 ⁰⁴	2.8x10 ⁰⁴ ± 5.7x10 ⁰⁴	0.0	2.9x10 ⁰⁶ ± 6.4x10 ⁰⁶
1.1 mm	7	2.6x10 ¹⁰ ± 2.2x10 ¹⁰	1.1x10 ⁰⁷ ± 9.0x10 ⁰⁶	5.5x10 ⁰⁵ ± 8.7x10 ⁰⁵	2.4x10 ⁰⁵ ± 1.7x10 ⁰⁵	7.8x10 ⁰⁴ ± 1.1x10 ⁰⁵	0.0	1.7x10 ⁰⁴ ± 4.4x10 ⁰⁴

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.t004>

its concentration impacts its pathogenicity [40]. However, due to the complex interspecies interactions, there is also evidence to suggest that other species of oral streptococci may have different roles in the caries process [41].

The results demonstrate that only 28% of subjects carried *S. mutans*. A decrease of 3.5 times is observed between the aged subjects from 20 to 25 years and those aged from 30 to 35 years. Therefore, the older the caries-free subjects are, the lower the quantity of *S. mutans* detected in the ID biofilm. However, the frequency of subjects carrying *S. mutans* increased between the 20 to 25-year-old (27.2%) and 30 to 35-year-old (62.5%) subject groups. *S. mutans* could be responsible for the future carious interproximal lesions observed in adults on the distal surface of premolars [42]. Otherwise, Dani and colleagues [43] have demonstrated that the colonization of *S. mutans* was increased in chronic periodontitis subjects both in saliva and sub-gingival plaque samples [43]. Our previous study determined that periodontally healthy young adults carried periodontopathogenic bacteria in their ID biofilm [28]. Thus, interacting with these bacteria, *S. mutans* could also play a crucial role in future periodontal diseases. A change in the subject dental risk—from cariogenic to periodontopathogenic—could occur with age. This hypothesis is supported by previous results. The prevalence of periodontal diseases significantly increases in subjects older than 35 years [44]. Moreover, the microbial shift observed according to age in the supragingival biofilm and in saliva from individuals with healthy oral conditions may contribute to the initiation and prevalence of a specific oral disease according to age [12].

Lactobacillus spp. appear to be associated with dental carious lesions, like cariogenic bacteria, especially in the progression of caries of dentin [36, 45]. As these bacteria are unable to bind to hard, smooth surfaces, they are found in retentive zones such as pits and fissures or deep cavities. *Lactobacillus* spp. shows a high tolerance to low pH media [46].

Our study reveals that *Lactobacillus* spp. was present in all the caries-free subjects. Previous studies established a strong correlation between the *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity and dental caries [46]. The higher the DMFT index was, the higher the number of children

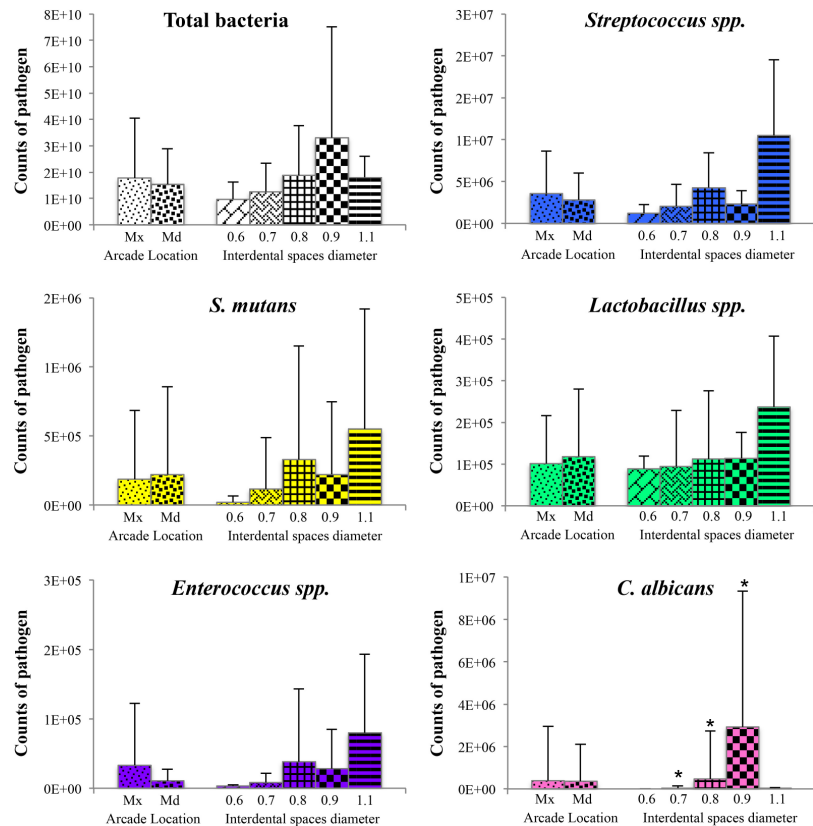


Fig 5. Quantification of the pathogens according to location and interdental spaces diameter. Total counts of each pathogen were averaged across sites in each subgroup. Error bars represent standard deviations. Comparisons: * $p < 0.05$, by using SUDAAN 7.0 (procedures DESCRIPT and REGRESS) to account for clustering (multiple sites within the subjects) Mx: maxillary; Md: mandibulary.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g005>

harboring a high *Lactobacillus* count [47]. In some cases, they detected *Lactobacillus* spp. in the plaque of some caries-free children but at very low levels [48]. So, the fact that *Lactobacillus* spp. was detected in 100% of interdental biofilm of young caries-free subjects can be explained by (i) the higher sensitivity of the quantitative PCR compared to the culture bacteria methods [49, 50] and (ii) the age of the subjects, who are older than in other studies that focused on children.

Lactobacillus spp. represented 1.1×10^5 bacteria in one ID space from young caries-free adults. Previously, some studies suggested a correlation between the *Lactobacillus* spp. count and caries activity, especially in children [50, 51]. Arino and colleagues [52] noticed that subjects with a *Lactobacillus* spp. level in the saliva higher than 1×10^4 CFU/mL were vulnerable to caries. The absence of carious lesions in young adults with a high level of *Lactobacillus* spp. could be due to their potential suppressive effect on cariogenic microorganisms. From a review of the literature, various studies have shown that *Lactobacillus* spp. inhibits the growth of *S. mutans* both *in vitro* and *in vivo* [53–55]. However, contrasting findings have also been

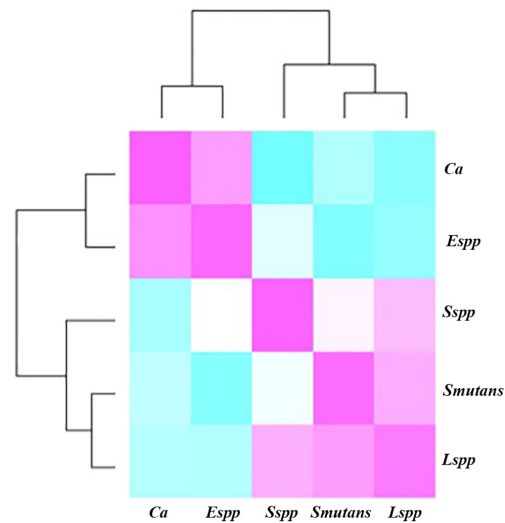


Fig 6. Correlation plot of the abundances of the bacterial species, corrected for age, interdental space and individual-specific effects. The pink, white, and blue squares indicate positive, zero, and negative correlations, respectively.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185804.g006>

reported [56]. These variations in *Lactobacillus* colony count in different studies can be attributed to the fact that not all strains of the *Lactobacillus* family have an inhibitory effect. The *Lactobacillus* spp. exerts its anticariogenic activity in various ways [55, 57]. Moreover, the absence of signs of periodontal disease in the studied subjects could be due to the capacity of *Lactobacillus* spp. to inhibit periodontopathogens, such as *Porphyromonas gingivalis* [58].

Previous studies showed that the mutans group of *Streptococci* and the *Lactobacillus* could have a role in the induction of root surface caries [47, 59]. Interestingly, in young caries-free adults, 28% of the tested sites co-express *S. mutans* and *Lactobacillus* spp., and among them, 71.5% revealed a higher quantity of *S. mutans* than *Lactobacillus* spp. Moreover, these two-bacterial species cluster together. So, these two bacteria could be predictive markers for interproximal caries.

Another cluster of pathogens is composed of *Enterococcus* spp. and *C. albicans*. Enterococci may cause a variety of oral infections. Surprisingly, there is little data concerning their oral incidence and prevalence [60]. In our cohort, 99% of caries-free young adults carried *Enterococcus* spp that is higher than previously described by Sedgley and colleagues (20%) [61]. Komiyama and colleagues [62] detected Enterococci in the saliva of 14% of young adults whose periodontal and cariogenic status were not determined. Two main reasons could explain this difference. First, our study analyzed the interdental biofilm, while all other studies focused on the saliva, the lingual biofilm, or the supragingival biofilm. Second, we quantified bacterial amounts by real-time PCR and not by bacterial culture.

The quantity of *Enterococcus* spp. is lower in 30 to 35-year-old subjects than in 20 to 30-year-old subjects. This age-related difference was previously described in the saliva of subjects whose oral status was not determined [62].

To the best of our knowledge, this is the first report of arcade location variations in the oral carriage of *Enterococcus* spp. Gender does not impact the colonization of the interdental

biofilm by *Enterococcus* spp. Conversely, Komiyama and colleagues [62] described that females are higher carriers than males.

Among the genus *Enterococcus*, *E. faecalis* is the most detected in the oral cavity [62], although it is not a common of the healthy oral flora [60, 63]. *E. faecalis* strains can cause serious nosocomial infections and are implicated in dental diseases as caries, periodontitis, endodontic infections, and periimplantitis [63–67].

In our study, *E. faecalis* was not detected, similar to previous reports that observed that the prevalence of this bacterium was lower in healthy individuals (0–20%) [68, 69] than in patients with dental diseases (up to 68%) [64, 70]. This confirms that *E. faecalis* is not a constituent of the oral microbiota. Further investigations are needed to determine which species of *enterococcus* are present in the interdental biofilm from caries-free adults.

Despite the fact that the key pathogens for dental caries are bacteria, previous studies have described *C. albicans* as greatly contributing to caries pathogenesis, particularly in children, adolescents and young adults [71, 72]. This opportunistic fungus is a common constituent of the oral biofilm [73] and can colonize surfaces of the oral cavity, such as the palate, cheek, tongue, and the hard surfaces of the teeth. As a consequence of this oral surface colonization, this fungus is also present in saliva [74].

Previous studies have demonstrated that the abundance of this yeast is a sign of high caries risk in children [75, 76]. In adults, our results showed that 28% of the subjects were carrying *C. albicans* in their interdental biofilm. This result is consistent with previous studies on saliva or supragingival biofilm [77, 78], in which oral carriage rates of *Candida* ranged from 5 to 75%, respectively.

Fungal colonization by *C. albicans* is more abundant in the ID biofilm of males than of females but is not more frequent. Moalic and colleagues [71] described contradictory results. In their study, the fungal colonization of the supragingival biofilm was more frequent in males than in females but was not more abundant. To explain our results, several hypotheses involving factors not measured in this study are conceivable: (i) the salivary flow could be decreased in females leading to a decrease in colonization [79]; (ii) low levels of pH of the male oral cavity could favor the adhesion and the proliferation of *Candida* yeast [79]; and (iii) the blood group H antigen functions as a receptor for *C. albicans* [80].

No significant differences were noted in the incidence of *C. albicans* according to age. However, the frequency of *C. albicans* by site was higher with age. These results complement those of Zaremba and colleagues [81], who observed that the frequency of *Candida* spp. was higher with age in a population aged 56 to 92 years. Moreover, we demonstrated that the mean number of *C. albicans* increases with age. In 54% of ID biofilms inhabited by *C. albicans*, *S. mutans* is present, which supports the symbiotic role of the two species [82, 83]. Numerous studies are investigating the possible role of *C. albicans* as a carious risk marker. However, this role seems to be called into question. Recent studies *in vitro* have suggested that *C. albicans* prevents caries [84, 85].

Finally, several of the studied oral pathogens are responsible for systemic diseases. *C. albicans* can form potentially lethal fungal masses in the heart, kidney, and brain [86, 87]. *Enterococcus* spp. and *S. mutans* are known to be associated with bacteremia and infective endocarditis [88, 89]. Therefore, as previously demonstrated, 34.8% of young periodontally healthy subjects with ID biofilm bled [90]. The presence of these pathogens in the ID biofilm of young adults represents a danger and must be prevented.

Conclusions

The ID biofilm of young caries-free subjects is composed of pathogens—*Streptococcus* spp., *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp. and *C. albicans*—that are able to induce

interproximal caries but that are also able to act in the periodontal process. Moreover, the potential involvement of these pathogens in systemic diseases is a strong argument in favor of taking into consideration the need to disrupt the ID biofilm in oral prophylaxis.

Supporting information

S1 Table. Bacterial count for the total load of bacteria and for 6 major pathogens in the interdental biofilm. The table represents the results of 16S qPCR DNA of the healthy subjects used in this study. *Ca*: *Candida albicans*; *IDB*: Interdental Brush; *Ef*: *Enterococcus faecalis*; *Espp*: *Enterococcus spp.*; *Lspp*: *Lactobacillus spp.*; *Sspp*: *Streptococcus spp.*; *Sm*: *Streptococcus mutans*; *TB*: Total bacteria.
(PDF)

Acknowledgments

We acknowledge the support of our work by Institut Clinident SAS (Aix en Provence, France).

Author Contributions

Conceptualization: Denis Bourgeois, Florence Carrouel.

Formal analysis: Paul Tramini, Nicolas Molinari.

Investigation: Denis Bourgeois, Alexandra David, Camille Inquimbert, Florence Carrouel.

Writing – original draft: Denis Bourgeois, Alexandra David, Florence Carrouel.

References

1. Marceles W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, Murray CJ. Global burden of oral conditions in 1990–2010: a systematic analysis. *J Dent Res*. 2013; 92: 592–597. <https://doi.org/10.1177/0022034513490168> PMID: 23720570
2. Richards D. Oral diseases affect some 3.9 billion people. *Evid Based Dent*. 2013; 14: 35. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400925> PMID: 23792391
3. Kidd E, Fejerskov O. *Essentials of Dental Caries: The Disease and Its Management*. New York: Oxford University Press. 2016.
4. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Org*. 2005; 83: 661–669. <https://doi.org/S0042-96862005000900011> PMID: 16211157
5. Mejäre I. "Management of the advanced carious lesion in primary teeth", in *Consensus Conference on Caries in the Primary Dentition and Its Clinical Management*, ed. Hugoson A., Falk M., Hohansson S. (Stockholm: Forlagshuset Gothia), 2002: 57–68.
6. Ekstrand KR. Knowledge about caries: Is it possible for the Danish Public Dental Health Service for Children to achieve even better results? *Tandlaegebladet*. 2006; 110: 788–799.
7. Rehman K, Khan H, Shah SA. Frequency of class II type carious lesions in first permanent molars and their association with pulp. *Pak Oral Dent J*. 2009; 29: 119–122.
8. Faran Ali SM, Tanwir F. Oral microbial habitat a dynamic entity. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2012; 2: 181–187. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2012.07.001> PMID: 25737863
9. Marsh PD, Martin MV. "Mouth as a microbial habitat", in *Oral Microbiology Textbook*, ed. Lewis M. A. (Edinburgh, London, New York, Oxford: Churchill Livingstone Elsevier). 2009: 8–23.
10. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E. "Pathology of Dental Caries", in *Dental Caries: The disease and its clinical management*, ed. Fejerskov O. and Kidd E. (Oxford, UK: Blackwell Munksgaard). 2015: 19–48.
11. Ribeiro AA, Purger F, Rodrigues JA, Oliveira PR, Lussi A, Monteiro AH, Alves HD, Assis JT, Vasconcelos AB. Influence of contact points on the performance of caries detection methods in approximal surfaces of primary molars: an in vivo study. *Caries Res*. 2015; 49: 99–108. <https://doi.org/10.1159/000368562> PMID: 25572115

12. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. *Environ Microbiol*. 2015; 17: 699–710. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12502> PMID: 24800728
13. Heymann HO, Swift E, Ritter JrA. "Dental caries: etiology and clinical characteristics", in Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry, ed V. Gopikrishna. (South asian edition), 2012: 25–49.
14. Vanderas AP, Kavvadia K, Papagiannoulis L. Development of caries in permanent first molars adjacent to primary second molars with interproximal caries: four-year prospective radiographic study. *Pediatr Dent*. 2004; 26: 362–368. PMID: 15344633
15. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J*. 2010; 4: 962–974. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.30> PMID: 20336157
16. Dorri M, Dunne SM, Walsh T, Schwendicke F. Micro-invasive interventions for managing proximal dental decay in primary and permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015; 11: CD010431.
17. Keiser-Nielsen S: Federation Dentaire Internationale. Two-Digit System of designating teeth. *Dent Pract (Ewell)*. 1971; 3: 6.
18. World Health Organization: *Oral Health Surveys: Basic Methods*. 4th Ed. World Health Organization. 1997.
19. Bourgeois D, Carrouel F, Llodra JC, Bravo M, Viennot S. A Colorimetric Interdental Probe as a Standard Method to Evaluate Interdental Efficiency of Interdental Brush. *Open Dent J*. 2015; 9: 431–437. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010431> PMID: 26966470
20. Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S. Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 2566–2572. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2566-2572.2004> PMID: 15184435
21. Kozarov E, Sweier D, Shelburne C, Progulsk-Fox A, Lopatin D. Detection of bacterial DNA in atheromatous plaques by quantitative PCR. *Microbes Infect*. 2006; 8: 687–693. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.09.004> PMID: 16513386
22. Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, et al. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome*. 2014; 3: 40.
23. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3223–3231. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3223-3231.2002> PMID: 12202557
24. Ozbek SM, Ozbek A, Erdogan AS. Analysis of *Enterococcus faecalis* in samples from Turkish patients with primary endodontic infections and failed endodontic treatment by real-time PCR SYBR Green method. *J Appl Oral Sci*. 2009; 17: 370–374. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000500004> PMID: 19936510
25. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 3128–3136. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004> PMID: 15243071
26. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 4438–4441. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4438-4441.2003> PMID: 12958287
27. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw*. 2015; 67: 1–48.
28. Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, Veber P, Bourgeois D. Quantitative molecular detection of 19 major pathogens in the interdental biofilm of periodontally healthy young adults. *Front Microbiol*. 2016; 7: 840. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00840> PMID: 27313576
29. Zheng J, Gänzle MG, Lin XB, Ruan L, Sun M. Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ Microbiol*. 2015; 17: 2133–2143. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12662> PMID: 25346017
30. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect*. 2000; 2: 1599–1607. PMID: 11113379
31. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33: 499–515. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7> PMID: 24154653
32. Kreth J, Merritt J, Qi F. Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA Cell Biol*. 2009; 28: 397–403. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0868> PMID: 19435424

33. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986; 50: 353–380. PMID: 3540569
34. Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res.* 2006; 40: 366–374. <https://doi.org/10.1159/000094280> PMID: 16946603
35. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 1407–1417. <https://doi.org/10.1128/JCM.01410-07> PMID: 18216213
36. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5753–5759. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5753-5759.2005> PMID: 16272513
37. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2015–2021. <https://doi.org/10.1128/JCM.02411-07> PMID: 18385433
38. Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, et al. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.3.1001-1009.2002> PMID: 11880430
39. Russell RR. How has genomics altered our view of caries microbiology? *Caries Res.* 2008; 42: 319–327. <https://doi.org/10.1159/000151326> PMID: 18701821
40. Henne K, Gunesch A-P, Walther C, Meyer-Lueckel H, Conrads G, Esteves-Oliveira M. Analysis of bacterial activity in sound and cariogenic biofilm: a pilot in vivo study. *Caries Res.* 2016; 50: 480–488. <https://doi.org/10.1159/000448485> PMID: 27595541
41. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012; 7: e47722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047722> PMID: 23091642
42. Demirci M, Tuncer S, Yuceokurb AA. Prevalence of caries on individual tooth surfaces and its distribution by age and gender in university clinic patients. *Eur J Dent.* 2010; 4: 270–279. PMID: 20613915
43. Dani S, Prabhu A, Chaitra KR, Desai NC, Patil SR, Rajeev R. Assessment of *Streptococcus mutans* in healthy versus gingivitis and chronic periodontitis: A clinico-microbiological study. *Contemp. Clin Dent.* 2016; 7: 529–534. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.194114> PMID: 27994423
44. Meng H. *The Periodontology* Peking: People's Medical Publishing House. 2008.
45. Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014; 6: 25443. <https://doi.org/10.3402/jom.v6.25443> PMID: 25626770
46. Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral lactobacilli and dental caries: a model for niche adaptation in humans. *J Dent Res.* 2015; 94: 110S–118S. <https://doi.org/10.1177/0022034515576052> PMID: 25758458
47. Badet C and Thebaud NB. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J.* 2008; 2: 38–48. <https://doi.org/10.2174/1874285800802010038> PMID: 19088910
48. Walter J, Schwab C, Loach DM, Gänzle MG, Tannock GW: Glucosyltransferase A (GtfA) and inulosucrase (Inu) of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 contribute to cell aggregation, in vitro biofilm formation, and colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Microbiology.* 2008; 154: 72–80. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/010637-0> PMID: 18174127
49. Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Influence of sample type and collection method on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. counts in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 341–345. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.08.007> PMID: 15740713
50. Ramesh K, Kunjappan S, Ramesh M, Shankar S, Reddy S. Comparative evaluation of predictive value of three caries activity tests-snyder, lactobacillus count and cariostat in mixed dentition children with and without caries. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013; 5: S63–68. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113299> PMID: 23946580
51. Gao X, Hsu C-Y, Loh T, Hwang B, Koh D. Role of microbiological factors in predicting early childhood caries. *Pediatr Dent.* 2014; 36: 348–354. PMID: 25198002
52. Arino M, Ito A, Fujiki S, Sugiyama S, Hayashi M. Multicenter study on caries risk assessment in adults using survival classification and regression trees. *Sci. Rep.* 2006; 6: 29190.
53. Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of *mutans streptococci*: an in vitro study. *Acta Odontol Scand* 2011; 69: 263–268.

54. Söderling EM, Marttinen AM, Haukioja AL. Probiotic lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* biofilm formation in vitro. *Curr Microbiol.* 2011; 62: 618–622. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9752-9> PMID: 20835828
55. Sindhu N, Kishore B, Ramakant N, Vijayalakshmi K, Deepa B. Effect of *Lactobacillus* on *Mutans Streptococcus* in caries-free and high caries risk individuals. *J Pharm Biomed.* 2013; 31: 1192–1198.
56. Steckslen-Blicks C, Sjöstrom I, Twetman S. Effect of longterm consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res.* 2009; 43: 374–381. <https://doi.org/10.1159/000235581> PMID: 19690413
57. Lin X, Chen X, Chen Y, Jiang W, Chen H. The effect of five probiotic lactobacilli strains on the growth and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Oral Dis.* 2015; 21: e128–134. <https://doi.org/10.1111/odi.12257> PMID: 24806217
58. Khalaf H, Nakka SS, Sandén C, Svärd A, Hulthenby K, Scherbak N, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8 A β on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbio.* 2016; 16: 188.
59. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM: The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001; 65: 1028–1037. PMID: 11699974
60. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005> PMID: 16272510
61. Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod.* 2006; 32: 104–109. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.022> PMID: 16427455
62. Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, Samaranyake LP, Parahitiyawa NB, Balducci I, Kogalito CY. *Enterococcus* species in the oral cavity: prevalence, virulence factors and antimicrobial susceptibility. *PLoS One.* 2016; 11: e0163001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163001> PMID: 27631785
63. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01534> PMID: 26793174
64. Koudhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A. Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiol.* 2011; 11: 155. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-155> PMID: 21714920
65. Dahlén G, Blomqvist S, Almståhl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol.* 2012; 4: <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.10855> PMID: 22368771
66. Rams TE, Feik D, Mortensen JE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility of periodontal *Enterococcus faecalis*. *J Periodontol.* 2013; 84: 1026–1033. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120050> PMID: 23106507
67. Ran S, Liu B, Jiang W, Sun Z, Liang J. Transcriptome analysis of *Enterococcus faecalis* in response to alkaline stress. *Front Microbiol.* 2015; 6: 795. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00795> PMID: 26300863
68. Salah R, Dar-Odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental diseases. *BMC Oral Health.* 2008; 8: 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-8-17> PMID: 18513445
69. Burley KM, Sedgley CM. CRISPR-Cas, a prokaryotic adaptive immune system, in endodontic, oral, and multidrug-resistant hospital-acquired *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2012; 38: 1511–1515. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.07.004> PMID: 23063226
70. Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol.* 2008; 53: 155–160. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.08.004> PMID: 17897617
71. Moalic E, Gestalin A, Quinio D, Gest PE, Zerilli A, Le Flohic AM. The extent of oral fungal flora in 353 students and possible relationships with dental caries. *Caries Res.* 2001; 35: 149–155. <https://doi.org/10.1177/0022017501035003> PMID: 11275676
72. Klinke T, Guggenheim B, Klimm W, Thurnheer T. Dental caries in rats associated with *Candida albicans*. *Caries Res.* 2011; 45: 100–106. <https://doi.org/10.1159/000324809> PMID: 21412001
73. De-la-Torre J, Marichalar-Mendia X, Varona-Barquin A, Marcos-Arias C, Eraso E, Aguirre-Urizar JM, et al. Caries and *Candida* colonisation in adult patients in Basque Country (Spain). *Mycoses.* 2016; 59: 234–240. <https://doi.org/10.1111/myc.12453> PMID: 26756815

74. Xiao C, Ran S, Huang Z, Liang J. Bacterial diversity and community structure of supragingival plaques in adults with dental health or caries revealed by 16S pyrosequencing. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1145. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01145> PMID: 27499752
75. Thomas A, Mhambrey S, Chokshi K, Chokshi A, Jana S, Thakur S, Jose D, Bajpai G: Association of oral *Candida albicans* with severe early childhood caries—a pilot study. *J Clin Diag Res.* 2016; 10: ZC109–112.
76. Lozano Moraga CP, Rodríguez Martínez GA, Lefimil Puente CA, Morales Bozo IC, Urzúa Orellana BR. Prevalence of *Candida albicans* and carriage of *Candida non-albicans* in the saliva of preschool children, according to their caries status. *Acta Odontol Scand.* 2017; 75: 30–35. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1244560> PMID: 27796162
77. Monteiro-da-Silva F, Araujo R, Sampaio-Maia B. Interindividual variability and intraindividual stability of oral fungal microbiota over time. *Med Mycol.* 2014; 52: 498–505. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu027>. PMID: 24934804
78. Sheth CC, Makda K, Dilmahomed Z, González R, Luzi A, Jovani-Sancho Mdel M, Veses V: Alcohol and tobacco consumption affect the oral carriage of *Candida albicans* and *mutans streptococci*. *Lett Appl Microbiol.* 2016; 63: 254–259. <https://doi.org/10.1111/lam.12620> PMID: 27450704
79. Kanaguchi N, Narisawa N, Ito T, Kinoshita Y, Kusumoto Y, Shinozuka O, Senpuku H. Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of *Candida albicans* in an in vivo model. *BMC Oral Health.* 2012; 12: 36. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-12-36> PMID: 22937882
80. Farah CS, Lynch N, McCullough MJ. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust Dent J.* 2010; 55: 48–54. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01198.x> PMID: 20553244
81. Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G, et al. Incidence rate of *Candida* species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. *Adv Med Sci.* 2006; 51: 233–236. PMID: 17458099
82. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616> PMID: 24146611
83. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai C-H, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014; 82: 1968–1981. <https://doi.org/10.1128/IAI.00087-14> PMID: 24566629
84. Barbosa JO, Rossoni RD, Vilela SF, de Alvarenga JA, Velloso Mdos S, Prata MC, et al. *Streptococcus mutans* can modulate biofilm formation and attenuate the virulence of *Candida albicans*. *PLoS One.* 2016; 11: e0150457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150457> PMID: 26934196
85. Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP: *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. *Pathog Dis.* 2016; 74: ftw039. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw039> PMID: 27129365
86. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002; 3: 918–930. <https://doi.org/10.1038/nrg948> PMID: 12459722
87. Perloth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 2007; 45: 321–346. <https://doi.org/10.1080/13693780701218689> PMID: 17510856
88. Dhotre SV, Davane MS, Nagoba BS. Periodontitis, bacteremia and infective endocarditis: A Review Study. *Arch Pediatr Infect Dis.* 2017: e41067.
89. Nakano K, Nomura R, Ooshima T. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. *Jap Dent Sci Rev.* 2008; 44: 29–37.
90. Bourgeois D, Saliassi I, Llodra JC, Bravo M, Viennot S, Carrouel F. Efficacy of interdental calibrated brushes on bleeding reduction in adults: a 3-month randomized controlled clinical trial. *Eur J Oral Sci.* 2016; 124: 566–571. <https://doi.org/10.1111/eos.12302> PMID: 27681016

Brossage interdentaire calibré pour la prévention de l'infection par des agents pathogènes parodontaux chez les jeunes adultes - un essai clinique contrôlé randomisé (ARTICLE 5)

L'article « Calibrated interdental brushing for the prevention of periodontal pathogens infection in young adults - a randomized controlled clinical trial » a été accepté le 10 octobre 2019 dans la revue Science Reports.

L'objectif de cette étude était de déterminer si l'utilisation quotidienne de brossettes interdentaires calibrées permettait de rétablir la symbiose du microbiote interdentaire et l'inflammation gingivale chez de jeunes adultes, âgés de 20 à 35 ans, indemnes de lésions parodontales.

Lors de l'inclusion des 25 sujets, le diagnostic de bonne santé parodontale a été établie avec les recommandations de l'Académie Américaine de Parodontologie. Les sujets présentaient des poches parodontales inférieures ou égales à 3 mm, des pertes d'attaches inférieures à 3 mm et des saignements au sondage inférieurs ou égales à 10% des sites après 30 s.

Pour chaque sujet, 4 sites interdentaires (15-16, 25-26, 35-36 et 45-46) ont été étudiés. Parmi ces 4 sites, 2 étaient des sites « tests » et 2 étaient des sites « contrôles ». Les sujets devaient se brosser les dents deux fois par jour pendant 2 min. Lors du brossage du soir, ils devaient passer au niveau de 2 sites interdentaires « tests » une brossette interdentaire calibrée. Des prélèvements interdentaires à l'aide de brossettes interdentaires calibrées ont été réalisés à 0, 1, 2, 3, 4 semaines puis à 3 mois pour les sites « tests » et à 0, 4 semaines puis à 3 mois pour les sites « contrôles ».

Après extraction de l'ADN, la PCR en temps réel a été utilisé pour quantifier la totalité des bactéries ainsi que 19 bactéries parodontales dont *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* et *Tannerella forsythia*. Dans les sites « tests », la quantité totale de bactéries a diminué au fil du temps. Les bactéries des complexes Socransky rouge et orange, associées à une MP, ont significativement diminué dans les sites « tests » mais pas dans les sites « contrôles ». Les bactéries des complexes Socransky jaune et violet, associées à la santé parodontale, ont augmenté significativement dans les deux groupes, tandis que les bactéries du complexe bleu Socransky ont augmenté significativement uniquement dans les sites de « tests ». En outre, lors de l'inclusion, 66% des sites « tests » et 68% des sites « contrôles » présentaient des saignements interdentaires. En 3 mois, ces saignements ont diminué de 85% dans les sites « tests » et de 27% dans les sites « contrôle ».

Donc, l'utilisation quotidienne de brossettes interdentaires calibrées permet de réduire la quantité de pathogènes parodontaux, de rétablir la symbiose du microbiote et de diminuer l'inflammation interdentaire des jeunes adultes en bonne santé parodontale.

OPEN

Calibrated interdental brushing for the prevention of periodontal pathogens infection in young adults - a randomized controlled clinical trial

Denis Bourgeois¹, Manuel Bravo², Juan-Carlos Llodra², Camille Inquimbert^{1,3}, Stéphane Viennot¹, Claude Dussart¹ & Florence Carrouel^{1,4*}

Periodontal disease is clearly correlated with systemic disease. The presence of periodontal pathogens in interdental spaces in young, healthy adults is a strong indicator of the need to introduce daily interdental prophylaxis. Twenty-five subjects (aged 18–35 years), diagnosed clinically as periodontally healthy, were enrolled in this study. One hundred interdental sites were included. Among these sites, 50 “test” sites were cleaned daily with calibrated interdental brushes (IDBs), whereas the other 50 sites were not cleaned and considered “controls”. The interdental biofilm at these interdental sites was collected at the beginning of the study (basal) and at 1 week, 2 weeks, 3 weeks, 4 weeks, and 3 months. Real-time polymerase chain reaction (PCR) methodology was used to quantify (i) 19 periodontal bacteria, including *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*, and (ii) total bacteria. In the test sites, the quantity of total bacteria decreased over time with the use of IDBs. The bacteria from the red and orange Socransky complexes, which are associated with periodontal disease, significantly decreased in the test sites but not in the control sites. Bacteria from the yellow, and purple Socransky complexes, which are associated with periodontal health, increased significantly in both groups whereas bacteria from the blue Socransky complex increased significantly only in the test sites. Furthermore, at basal, 66% of test sites and 68% of control sites bled during interdental brushing. These percentages decreased by 85% in 3 months for the test sites and by 27% in the control sites. In conclusion, the daily use of calibrated IDBs can reduce periodontal pathogens, reestablish symbiotic microbiota and, decrease interdental inflammation in interdental sites of healthy young adults.

Periodontal disease (ICD-10 KO5.3), with a prevalence estimated at 750 847 000 cases in 195 countries and territories¹, is an oral infectious disease caused by complex interactions between the microbial biofilm and host immune responses². Periodontal pathogens can enter the host system through daily bacteremia following breakdown of epithelial and endothelial barriers due to the host's inflammatory responses and the ability of some pathogens to attack these barriers³. However, the importance of oral-systemic connection is not only due to the implication of periodontal pathogens in the pathogenesis of periodontitis and systemic diseases. The presence of periodontal pathogens and their metabolic by-products in the mouth may modulate the immune response beyond the oral cavity, thus promoting the development of systemic inflammation and thus systemic disease⁴.

Periodontal disease exhibits an association with multiple systemic diseases, such as cardiovascular disease (including atherosclerosis, stroke, hypertension, myocardial infarction, and congestive heart failure), rheumatoid

¹Systemic Healthcare Laboratory EA4129, Faculty of Medicine Laennec, University Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France. ²Department of Preventive and Community Dentistry, Faculty of Oral Medicine, University of Granada, Granada, Spain. ³Department of Public Health, Faculty of Oral Medicine, University of Montpellier, Montpellier, France. ⁴Department of Fundamental and Clinical Biological Sciences, Faculty of Oral Medicine, University Lyon 1, University of Lyon, Lyon, France. *email: florence.carrouel@univ-lyon1.fr

arthritis, inflammatory bowel disease and colorectal cancer, respiratory tract infection, type 2 diabetes mellitus, and respiratory tract infection^{5–7}. From a clinical point of view, it is evident that the prevention of periodontal disease strategies directed at keystone pathogens could have a major effect on the incidence and progression of systemic disease⁸.

Periodontal pathogens were categorized into color-coded complexes based on their role in periodontal pathogenesis⁹. Red complex bacteria (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*) are the major etiologic agents that contribute to a high risk of chronic periodontitis by modulating the host inflammatory response¹⁰. Orange complex bacteria, including *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, and various *Campylobacter* species, are classified as moderate risk¹¹. Blue (*Actinomyces viscosus*, etc.), yellow (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus spp.*, etc.), green (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Eikenella corrodens*, etc.), and purple (*Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula*, etc.) complexes are compatible with periodontal health⁹.

In 2016, pathogens were identified in interdental spaces in young adults with healthy periodontium. *P. gingivalis* was detected in 19%, *T. denticola* in 49%, and *T. forsythia* in 93% of healthy young adults, whereas pathogens from the orange complex were detected in at least 81% of these subjects. The major explanation is that interdental spaces are a unique and real ecological niche, for which the body has few or no alternative defenses and where traditional daily hygiene methods are not adequate for disrupting biofilm¹².

This effective presence of virulent pathogens in healthy young adults is a strong indicator of the need to initiate new methods for disrupting interdental biofilm in daily oral hygiene. Recently, the study of Duval and colleagues has suggested that the “everyday low-level bacteremia” that occurs after toothbrushing, flossing, interdental brushing or chewing could also potentially pose risk to endocarditis¹³. Therefore, the use of interdental brushes (IDBs) could represent a serious alternative to reduce the level of virulent bacteria and to optimize the disruption of biofilms. To our knowledge, no randomized controlled clinical trial has shown the microbiological impact of calibrated IDBs on the interdental virulent microbiota in healthy adults. The aim of the present study was therefore to determine the bacterial efficacy of the use of calibrated IDBs on red and orange complex bacteria in young adults without chronic periodontal complaints.

Methods

Study design. The workflow of the impact of interdental brushing on the evolution of interdental biofilm (BACTERIB) is described in Fig. 1.

Study population. This study included 25 Caucasian adults aged 20 to 35 years old. Subjects were recruited from a pool of first-time volunteers who were referred to the Department of Public Health of the Faculty of Oral Medicine at the University of Lyon, France. All participants signed an informed consent form in accordance with the Declaration of Helsinki. The study protocol was reviewed and approved by the Local Ethics Committee “University Hospital Center of Lyon” (Rech_FRCH_2015-0181) and by the National Commission of Informatics and Liberties, France (1845681v0). This study was retrospectively registered with ClinicalTrials.gov (identification number: NCT03714295).

Subjects were included if they were aged between 20 and 35 years, in good general health, not pregnant or breastfeeding, and periodontally healthy and if they had no health conditions that required antibiotic prophylaxis before interproximal probing, no experience with interdental cleaning (interdental brushing or dental flossing), and no intake of systemic antimicrobials during the previous 6 months. To be included, the subjects had to brush their teeth at least twice per day, not use chlorhexidine or over-the-counter mouthwash, have no implants or orthodontic appliances, have no previous periodontal illness or treatment history, have at least 24 natural teeth, have 4 premolar-molar pairs, be non-smokers, and have a willingness to return 3 weeks after the clinical investigation for microbiological tests.

The clinical inclusion criteria for each premolar-molar interdental site were as follows: (i) accessibility to the interdental space of the 4 sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) by an interdental brush in each subject; (ii) no interproximal caries or dental or prosthetic restorations; (iii) no interdental diastema; (iv) no clinical signs of inflammation, such as redness, swelling; (v) no pocket depth (PD) > 3 mm or clinical attachment loss (CAL) > 3 mm; and (iv) the subjects were judged to be free of gingivitis or periodontitis.

Subjects were excluded if they had missing teeth due to periodontal issues, any other concomitant systemic disorder, diseases affecting the immune system, and use of medications, such as anti-platelet or anti-coagulant agents. The patients submitted to professional prophylaxis 4 weeks prior to the baseline examination; patients with previous periodontal disease or treatment or who were undergoing a course of dental or orthodontic treatment were also excluded.

Classification of subjects as periodontally healthy. The diagnosis of periodontally healthy was made according to the American Academy of Periodontology¹⁴, with some modifications¹⁵. The patients were scored for PD, CAL, and BOP. The studied group was composed of individuals who presented with clinically healthy periodontal tissues (PD ≤ 3 mm, CAL < 3 mm and ≤ 10% of sites with BOP after 30 s). Clinical assessments of 4 interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) were performed using an IAP CURAPROX colorimetric probe (Curaden, Kriens, Switzerland) (Supplementary Fig. 1). The diameter and bleeding upon interdental brushing (BOIB) were recorded¹⁶.

Clinical examination. Standardized clinical monitoring was performed three weeks before the microbiological monitoring. The subjects were submitted to a medical/dental anamnesis, and information regarding their age, gender and smoking status was obtained. The clinical measurements were performed at 6 sites per tooth

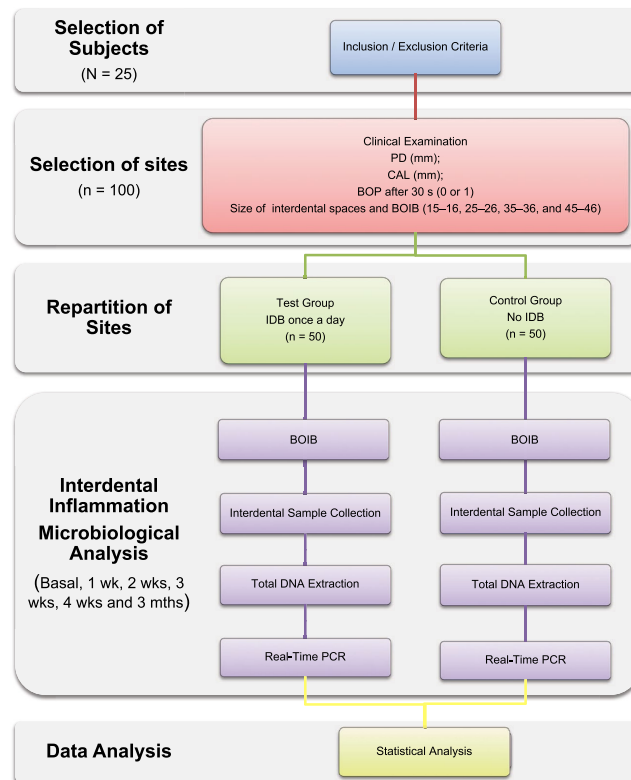


Figure 1. Workflow of the experiment. BOIB: Bleeding on Interdental Brushing; BOP: Bleeding on Probing; CAL: Clinical Attachment Loss; IDB: Interdental Brush; PD: Probing Depth.

(mesio-buccal, buccal, disto-buccal, disto-lingual, lingual, and mesio-lingual) on all teeth, except for the third molars, as previously described¹⁷. The clinical parameters were measured in the following order: PD (mm), CAL (mm), and BOP after 30 s (0 or 1). The full-mouth clinical measurements included BOP, PD and CAL, which were recorded using a North Carolina periodontal probe (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

The clinical assessments of the interdental spaces were performed using an IAP CURAPROX[®] colorimetric probe (Curaden, Kriens, Switzerland). The diameter of all interdental spaces of 4 teeth (premolar-molar) was measured to determine the calibrated IDB (diameter of the IDB corresponding to the interdental space diameter). Subjects received IDBs (Curaprox CPS; Curaden) of sizes corresponding to the diameter of their interdental spaces. The first use of the product was conducted under the supervision of a qualified public health professor. The instruction comprised verbal instructions on interdental brushing supported by practical demonstration. No further oral-hygiene instructions were provided. All other brushings were unsupervised, and the participants were required to maintain a diary card. Subjects were instructed to mark the box corresponding to the current date on the diary card every evening after performing their interdental brushing to ensure that brushing was performed every day. Moreover, the participants were instructed to brush their teeth 3 hours before the sampling visit and not to drink, eat or practice oral hygiene during this period.

Interdental site randomization. For each patient, 4 interdental sites localized between premolar-molar (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) were studied. Among these 4 sites studied, 2 were designed as test sites and 2 were designed as control sites. The test sites (2 per patient, total n = 50) and the control sites (2 per patient, total n = 50) were randomized symmetrical on each upper and lower arch (Table 1). One test site and one control site were in the upper jaw and even at the level of the mandible. Patients were instructed to brush their teeth twice a day for 2 min, rinse with water. In the test sites after brushing their teeth, patients were trained to use calibrated interdental brushes for a single cleaning movement once a day (in the evening) only. No other product or oral hygiene technique was allowed.

Quadrant	Control sites	Test sites	Total of sites
1	12	13	25
2	13	12	25
3	13	12	25
4	12	13	25
Total of sites	50	50	100

Table 1. Repartition of Sites (n = 100^a) According to the Quadrant. ^a25 patients with 1 site by quadrant (4 sites by patients).

Interdental sample collection and microbiological analysis by real-time polymerase chain reaction. At each clinical examination, the same four interdental sites (15–16, 25–26, 35–36, and 45–46) were studied (total of 100 sites) in all subjects. Based on the clinical assessment of the interdental spaces, the examiner selected the appropriate CPS prime interdental brushes (Curaden, Kriens, Switzerland)¹⁸. He isolated each previously selected tooth with sterile cotton rolls, and removed the interdental biofilm with a sterile, calibrated IDB. For each sample, he placed the IDBs in 1.5 mL sterile microcentrifuge tubes and stored at 4 °C for further processing. Then, the examiner recorded the BOIB¹⁶. For the test sites, the collection was performed at the following six time points: at baseline, 1, 2, 3, and 4 weeks and 3 months; for the control sites, the collection was not performed at 2, 3, and 4 weeks to avoid perturbations due to the introduction of the IDB for the sampling.

The total DNA was extracted using QIAcube HT Plasticware and a Cadon Pathogen 96 QIAcube HT Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's guidelines. The DNA was eluted in 150 µL. DNA quantities and quality were determined with an ultraviolet spectrophotometer at 260 nm and 280 nm.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect and quantify the total bacterial load (TB) and 19 periodontal pathogens (red complex: *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*; orange complex: *C. gracilis*, *C. rectus*, *E. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. micra*, *P. nigrescens*; yellow complex: *S. mitis*, *Streptococcus spp.*; green complex: *E. corrodens*, *C. sputigena*, *C. ochracea*, *C. concisus*, *A. actinomycetemcomitans*; purple complex: *V. parvula*, *A. odontolyticus*; and blue complex: *A. viscosus*) in interdental biofilms. Real-time PCR was performed as previously described by Carrouel and colleagues¹². The sequences of universal primers for the 16S rRNA genes and species-specific primer sets used are shown in the Supplementary Table 1.

For each sample, simplex quantitative PCR (qPCR) was performed in a total volume of 10 µL using qPCR kit (1 × SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Tli RNaseH Plus, TaKaRa, Shiga, Japan), which contained 2 µL of the template DNA and 1 µM of each primer. A Rotor-Gene[®] Q thermal cycling system (Qiagen, Hilden, Germany) was used to perform the assays. The cycle for each sample was the following program: 95 °C for 30 s, followed by 40 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at the annealing temperature (Supplementary Table 1), and 35 s at 72 °C. A final melting curve analysis (70 °C to 95 °C in 1 °C steps at 5 s increments) was performed. For every cycle, at the end of the extension step and continuously during the melting curve analysis, the fluorescence signal was measured. The Rotor-Gene[®] Q Series software (Qiagen, Hilden, Germany) was used to analyze the data.

Serial dilutions of a bacterial standard DNA provided by Institut Clinident SAS (Aix en Provence, France) were used in each reaction as external standards for the absolute quantification of the targeted bacterial pathogens. The standard bacterial strains came from BCMM/LMG Bacteria Collection, CIP Collection of Institut Pasteur, or from DSMZ (Germany): *Aa* (DSM No. 8324), *Ao* (DSM No. 43760), *Av* (DSM No. 43327), *Cc* (DSM No. 9716), *Cg* (DSM No. 19528), *Co* (DSM No. 7271), *Cr* (LMG No. 7613), *Cs* (DSM No. 7273), *Ec* (DSM No. 8340), *Fn* (DSM No. 20482), *Pg* (DSM No. 20709), *Pi* (DSM No. 20706), *Pm* (DSM No. 20468), *Pn* (DSM No. 13386), *Smitis* (DSM No. 12643), *Sspp* (*Streptococcus mitis* DSM No. 12643), *Td* (DSM No. 14222), *Tf* (CIP No. 105220), and *Vp* (CIP No. 60.1). The Supplementary Table 1 details the limit of quantification (LOQ).

Statistics. The statistical analysis consisted of three main steps, namely, producing descriptive summaries of the data, modeling the data using a mixed (linear) model and assessing the correlations between the bacterial abundances. Descriptive statistics (percentages, means and standard deviations) were calculated with SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). The statistical tests (p-values) were calculated with SUDAAN 7.0 (Research Triangle Institute, Research Triangle Park, NC) to account for clustering (multiple sites within the mouth) and repeated measures (measurements along the follow-up period). Statistical methods are clearly indicated in table footnotes. All data were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Periodontal parameters in the patients. The study sample was composed of 10 females and 15 males (Table 2). The clinical parameters confirmed that subjects were periodontally healthy. A comparison of the test sites with the control sites revealed similar scores for BOP, PD, CAL and ID diameter ($p > 0.05$).

Evolution of interdental bleeding. The bleeding during interdental brushing decreased by 47% after one week of the daily use of IDBs and 85% after 3 months in the test sites, whereas no significant change was observed in the control sites (Fig. 2 and Table 3).

Quantitative analysis of socransky's complexes. Table 4 shows that bacteria from the green, orange and red Socransky complexes were significantly decreased over time in subjects using IDBs, in contrast to subjects not using IDBs. Bacteria from the blue complex significantly increased in the test sites but not in the control sites, whereas bacteria from the purple, and yellow complexes increased in both type of sites. The main differences between groups up to 3 months are on orange and red complexes.

Subjects		Means comparison (p-value) ^a	
Age (years)	26.8 ± 4.6		
Sex, n (%)			
Male	15 (60.0)		
Female	10 (40.0)		
Teeth	28.9 ± 1.2		
Full mouth			
BOP (%)	0.16 ± 0.08		
PD (mm)	0.95 ± 0.21		
CAL (mm)	0.95 ± 0.21		
Sampled sites		Test Sites	Control Sites
BOP (%)	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.01	≈1
PD (mm)	1.37 ± 0.28	1.32 ± 0.23	≈1
CAL (mm)	1.60 ± 0.41	1.58 ± 0.40	≈1
ID diameter			
0.6 mm, n (%)	1 (2.0)	2 (4.0)	
0.7 mm, n (%)	12 (24.0)	28 (56.0)	
0.8 mm, n (%)	21 (42.0)	12 (24.0)	
0.9 mm, n (%)	12 (24.0)	5 (10.0)	
1.1 mm, n (%)	4 (8.0)	3 (6.0)	
mean ± sd (mm)	0.76 ± 0.12	0.76 ± 0.11	≈1

Table 2. Baseline Clinical Features of the Subjects, Test Sites, and Control Sites. The values are means ± standard deviations. BOP: Bleeding On Probing; CAL: Clinical Attachment Level; ID: Interdental; PD: Pocket Depth. ^aBy SUDAAN 7.0.

	Basal (T0)	4 weeks (T4)	3 months (T5)
Test sites	68%	8%	10%
Control sites	66%	50%	48%

Table 3. Evolution of Interdental Bleeding in the Test and Control Sites. The results are expressed as the percentage of active or control sites that bled compared to the total of active or control sites.

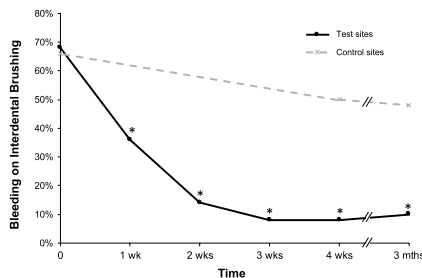


Figure 2. Evolution of interdental bleeding over time. The results are expressed as the percentage of the 50 test (daily use of calibrated interdental brushes) or 50 control (no use of interdental brushes) sites presenting bleeding on interdental brushing. *p-value < 0.05 for pairwise comparison vs T0.

Figure 3 and Table 5 show that the daily use of IDBs makes it possible to significantly reduce the number of orange and red complex bacteria in as little as a week, except for *P. micra* and *P. gingivalis*. The quantity of *P. micra* is significantly reduced after 3 weeks of daily IDB use, while for *P. gingivalis*, it takes 4 weeks.

Table 6 confirms that the daily use of IDBs impacts the number of bacteria from the orange and red complexes at 4 weeks and 3 months, whereas no significant differences were observed at baseline.

The results from the multiple regression models (Table 7) indicate that the use of IDBs, the quantity of bacteria at T0, the age and the IDB diameter at 3 months have a significant statistical effect on the quantity of some bacteria. Sex had no effect.

Bacteria	Test sites N = 50			Control sites N = 50		
	Basal (T0)	4 weeks (T4)	3 months (T5)	Basal (T0)	4 weeks (T4)	3 months (T5)
Total bacteria	10.08 ± 0.38	9.85 ± 0.42*	9.77 ± 0.53*	10.00 ± 0.39	10.05 ± 0.46	10.02 ± 0.51
Socransky's Blue (<i>Actinomyces viscosus</i>)	0.77 ± 1.41	0.82 ± 1.28	1.35 ± 1.85*	0.63 ± 1.29	0.42 ± 0.97	1.24 ± 1.77
Socransky's Purple	5.75 ± 0.69	6.50 ± 0.52*	6.75 ± 0.63*	5.67 ± 0.70	6.32 ± 0.62*	6.68 ± 0.59*
<i>Veillonella parvula</i>	5.66 ± 0.74	6.45 ± 0.55*	6.74 ± 0.63*	5.55 ± 0.77	6.29 ± 0.64*	6.66 ± 0.58*
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4.27 ± 1.23	4.95 ± 0.68*	4.33 ± 1.86*	4.10 ± 1.47	4.52 ± 1.14	4.40 ± 1.49
Socransky's Green	6.80 ± 0.75	6.52 ± 0.99*	6.25 ± 0.83*	6.74 ± 0.80	6.61 ± 0.91	6.82 ± 0.94
<i>Eikenella corrodens</i>	6.44 ± 0.98	6.08 ± 1.39*	5.73 ± 1.22*	6.20 ± 1.38	5.82 ± 1.38*	5.46 ± 1.56*
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	5.03 ± 1.05	5.17 ± 1.90	4.86 ± 1.90	4.89 ± 1.23	4.63 ± 2.02	4.68 ± 1.75
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	5.78 ± 1.30	4.45 ± 2.40*	4.72 ± 2.04*	5.66 ± 1.45	5.34 ± 2.03	5.21 ± 1.82
<i>Campylobacter concisus</i>	3.23 ± 1.54	3.46 ± 1.80	3.51 ± 1.31*	3.16 ± 1.47	3.58 ± 1.62*	3.79 ± 1.34*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0.24 ± 1.21	0.35 ± 1.44	0.28 ± 1.14	0.50 ± 1.70	0.61 ± 1.90	0.53 ± 1.65
Socransky's Yellow	6.29 ± 0.57	6.58 ± 0.47*	6.61 ± 0.75*	6.16 ± 0.58	6.46 ± 0.53*	6.46 ± 0.66*
<i>Streptococcus mitis</i>	5.09 ± 0.75	5.10 ± 0.77	5.22 ± 0.73	4.94 ± 0.73	4.81 ± 0.85	5.02 ± 0.77
<i>Streptococcus spp.</i>	6.25 ± 0.56	6.55 ± 0.47*	6.58 ± 0.76*	6.13 ± 0.57	6.44 ± 0.53*	6.43 ± 0.67*
Socransky's Orange	7.80 ± 0.48	7.16 ± 0.76*	7.05 ± 0.87*	7.71 ± 0.48	7.73 ± 0.54	7.61 ± 0.63
<i>Campylobacter gracilis</i>	4.79 ± 1.08	3.77 ± 1.76*	3.72 ± 1.70*	4.77 ± 0.97	4.88 ± 0.73	4.51 ± 1.33
<i>Campylobacter rectus</i>	6.41 ± 1.89	5.77 ± 1.68*	5.88 ± 1.18*	6.54 ± 1.37	6.91 ± 2.06	6.77 ± 2.18
<i>Prevotella intermedia</i>	5.63 ± 2.76	3.88 ± 2.86*	4.18 ± 2.73*	5.47 ± 2.87	4.78 ± 2.89	5.06 ± 2.72
<i>Prevotella nigrescens</i>	3.94 ± 1.62	1.16 ± 1.80*	1.07 ± 1.81*	3.92 ± 1.78	3.66 ± 1.98	3.02 ± 2.02
<i>Parvimonas micra</i>	5.30 ± 1.98	4.41 ± 2.50*	4.99 ± 2.04	4.94 ± 2.21	4.79 ± 2.21	5.06 ± 2.17
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7.57 ± 0.36	7.01 ± 0.77*	6.85 ± 0.95*	7.45 ± 0.35	7.51 ± 0.50	7.47 ± 0.61
Socransky's Red	6.02 ± 2.11	3.63 ± 2.62*	4.13 ± 2.45*	5.89 ± 1.86	5.54 ± 2.07	5.29 ± 2.42
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.17 ± 2.50	0.89 ± 1.01*	0.76 ± 0.62*	1.11 ± 2.47	1.04 ± 2.14	0.99 ± 2.06
<i>Tannerella forsythia</i>	5.75 ± 1.93	3.43 ± 2.39*	3.58 ± 2.47*	5.66 ± 1.72	5.31 ± 1.88	5.22 ± 2.36
<i>Treponema denticola</i>	3.47 ± 3.47	1.78 ± 2.82*	2.59 ± 3.02*	3.02 ± 3.38	2.79 ± 3.40	2.50 ± 3.33

Table 4. Evolution of Bacteria in the Socransky Complexes in the Test and Control Sites. N: Number of interdental sites; *p-value < 0.05 for pairwise comparison vs T0 by SUDAAN 7.0 (procedure DESCRIPT) to account for clustering (multiple sites within the patient). The results are expressed as the mean ± standard deviation after Log conversion ($\text{Log}_{10}(\text{count} + 1)$) of bacterial counts.

Discussion

There is currently, no clinical research trial evaluating interdental prophylaxis options in clinically healthy young adults in relation to the presence of highly virulent periodontal bacteria. Effectively, only two studies compared toothbrushing plus interdental brushing to toothbrushing alone and reported data at one month. Both were at risk of bias¹⁹. Outcomes measured gingivitis by gingival index and by proportion of bleeding sites^{20,21}. Moreover, Graziani and colleagues measured periodontitis but no data were reported²⁰. So, prophylactic options are empirical and mainly arise from the experiences obtained during mechanical or surgical treatment of clinical periodontitis²². Our study is a Randomised Controlled Trials that compared a home-use interdental cleaning device and toothbrushing versus toothbrushing alone (duration 3 months) with an outcome variable, the quantitative evolution of periodontal bacteria. The results indicate that the daily use of calibrated IDBs, especially compared to simple toothbrushing, modifies the composition of interdental microbiota that becomes symbiotic and reduces interdental inflammation.

Periodontitis are multifactorial oral disease mainly due to bacteria and more particularly to the dysbiosis of the oral microbiota²³. The symbiotic host-microbe relationship gradually changing to a pathogenic one. The periodontal health deteriorates until a state of clinical disease occurs. Simultaneously, a succession of microbial complexes develops. The biofilm associated with healthy mouth, mainly localised to enamel surfaces and oral mucosa, is composed of gram-positives aerobic bacteria such as bacteria from the blue, yellow, green, and purple complexes²⁴. As undisturbed biofilm matures, the biofilm population changes to a predominately gram-negative anaerobic microbiota. Bacteria from the orange complex progressively adhere followed by bacteria from the red complex which are considered as "keystone pathogens"²⁵. These periodontal pathogens are able to exploits complement-TLR crosstalk to subvert host defences and escape elimination. This defective immune monitoring results in a change in the biofilm composition (dysbiosis) that causes inflammatory periodontitis²⁶.

Effective oral hygiene is crucial for maintaining good oral health, which is associated with global health⁵. Inside the oral sphere, the interdental gingiva, which is composed of the facial and lingual papillae and the col, is a unique area anatomically and histologically. The gingival stratified epithelia act as a barrier that serves to protect the internal tissues from environmental stresses, chemical damage, bacterial infection and antimicrobial protection. Moreover, the gingival col in the interdental space is not enhanced by keratinization^{27,28}. In addition to the direct tissue destructive properties, some subgingival bacteria have different abilities to inhibit and interact with cells and components of the immune system to interfere with host reactions. Indeed, periodontopathogenic

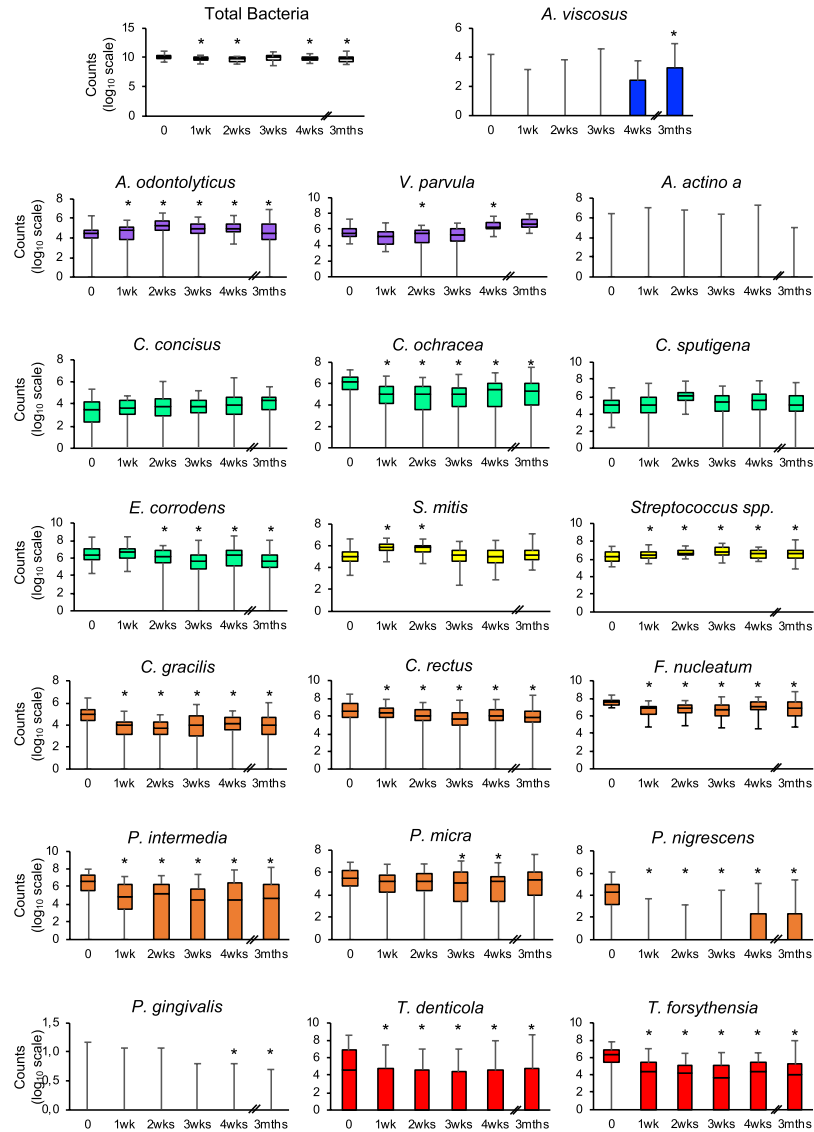


Figure 3. Evolution of the abundance of bacterial species over time in the test sites. The counts are reported on a \log_{10} scale. Each box represents the first quartile, median quartile, and third quartile, from bottom to top. The box colors represent the colors of the Socransky complexes. *p-value < 0.05 for pairwise comparison vs T0 by SUDAAN 7.0 (procedure DESCRIPT) to account for clustering (multiple sites within the patient).

bacteria produce virulent factors that directly (enzymes and toxins) or indirectly (antigens and activators) induce an inflammatory response^{29–31}. The virulence of bacteria depends on adhesion's factor such as adhesins, lectins, fimbriae and vesicles. Moreover, periodontal bacteria produce agents that damage the periodontal tissues such as proteases, alkali and acid phosphatases, fatty and organic acids, IgG- and IgA-proteases, chondroitinsulfatase and toxic products (endotoxins, leukotoxin, mucopolysaccharides of the bacterial wall, end-products of metabolism such

Bacteria ^a	Time						Comparison ^b	
	Basal (T0)	1 week (T1)	2 weeks (T2)	3 weeks (T3)	4 weeks (T4)	3 months (T5)	Global p-value	Pairwise vs T0 p<0.05
Total bacteria	10.08 ± 0.38	9.77 ± 0.33	9.69 ± 0.34	9.94 ± 0.47	9.85 ± 0.42	9.77 ± 0.53	<0.001	T1, T2, T4, T5
Socransky's Blue (<i>Actinomyces viscosus</i>)	0.77 ± 1.41	0.41 ± 0.95	0.43 ± 1.02	0.58 ± 1.20	0.82 ± 1.28	1.35 ± 1.85	<0.001	T5
Socransky's Purple	5.75 ± 0.69	5.36 ± 0.75	5.73 ± 0.56	5.54 ± 1.10	6.50 ± 0.52	6.75 ± 0.63	<0.001	T1, T4, T5
<i>Veillonella parvula</i>	5.66 ± 0.74	5.08 ± 0.95	5.01 ± 1.20	5.10 ± 1.42	6.45 ± 0.55	6.74 ± 0.63	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4.27 ± 1.23	4.27 ± 1.43	5.08 ± 1.25	4.72 ± 1.54	4.95 ± 0.68	4.33 ± 1.86	<0.001	T2, T4
Socransky's Green	6.80 ± 0.75	6.66 ± 0.81	6.60 ± 0.72	6.19 ± 0.85	6.52 ± 0.99	6.25 ± 0.83	<0.001	T3, T4, T5
<i>Eikenella corrodens</i>	6.44 ± 0.98	6.51 ± 0.90	6.06 ± 1.19	5.25 ± 1.82	6.08 ± 1.39	5.73 ± 1.22	<0.001	T2, T3, T4, T5
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	5.03 ± 1.05	5.84 ± 1.67	5.02 ± 0.92	5.12 ± 1.84	5.17 ± 1.90	4.86 ± 1.90	0.068	—
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	5.78 ± 1.30	4.59 ± 1.80	4.30 ± 2.16	4.28 ± 2.27	4.45 ± 2.40	4.72 ± 2.04	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Campylobacter concisus</i>	3.23 ± 1.54	3.28 ± 1.44	3.53 ± 1.54	3.43 ± 1.51	3.46 ± 1.80	3.51 ± 1.31	0.045	—
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0.24 ± 1.21	0.36 ± 1.47	0.39 ± 1.38	0.33 ± 1.34	0.35 ± 1.44	0.28 ± 1.14	0.365	—
Socransky's Yellow	6.29 ± 0.57	6.65 ± 0.49	6.75 ± 0.36	6.90 ± 0.52	6.58 ± 0.47	6.61 ± 0.75	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Streptococcus mitis</i>	5.09 ± 0.75	5.87 ± 0.45	5.71 ± 0.46	5.07 ± 0.88	5.10 ± 0.77	5.22 ± 0.73	<0.001	T1, T2
<i>Streptococcus spp.</i>	6.25 ± 0.56	6.55 ± 0.52	6.69 ± 0.38	6.89 ± 0.52	6.55 ± 0.47	6.58 ± 0.76	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
Socransky's Orange	7.80 ± 0.48	7.05 ± 0.62	7.03 ± 0.65	6.82 ± 0.78	7.16 ± 0.76	7.05 ± 0.87	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Campylobacter gracilis</i>	4.79 ± 1.08	3.67 ± 1.30	3.42 ± 1.44	3.67 ± 1.85	3.77 ± 1.76	3.72 ± 1.70	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Campylobacter rectus</i>	6.41 ± 1.89	6.07 ± 1.72	5.61 ± 2.02	5.24 ± 1.93	5.77 ± 1.68	5.88 ± 1.18	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Prevotella intermedia</i>	5.63 ± 2.76	4.23 ± 2.60	4.20 ± 2.80	3.34 ± 3.00	3.88 ± 2.86	4.18 ± 2.73	0.002	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Prevotella nigrescens</i>	3.94 ± 1.62	0.66 ± 1.28	0.53 ± 1.09	0.80 ± 1.56	1.16 ± 1.80	1.07 ± 1.81	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Parvimonas micra</i>	5.30 ± 1.98	5.10 ± 1.61	4.96 ± 1.60	4.40 ± 2.28	4.41 ± 2.50	4.99 ± 2.04	0.017	T3, T4
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7.57 ± 0.36	6.70 ± 0.62	6.82 ± 0.65	6.66 ± 0.80	7.01 ± 0.77	6.85 ± 0.95	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
Socransky's Red	6.02 ± 2.11	3.91 ± 2.55	3.72 ± 2.53	3.21 ± 2.74	3.63 ± 2.62	4.13 ± 2.45	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	1.17 ± 2.50	1.08 ± 2.28	1.08 ± 2.24	0.83 ± 2.00	0.89 ± 1.01	0.76 ± 0.62	0.242	T4, T5
<i>Tannerella forsythia</i>	5.75 ± 1.93	3.57 ± 2.37	3.40 ± 2.36	3.00 ± 2.50	3.43 ± 2.39	3.58 ± 2.47	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5
<i>Treponema denticola</i>	3.47 ± 3.47	1.89 ± 2.83	2.02 ± 2.78	1.95 ± 2.81	1.78 ± 2.82	2.59 ± 3.02	<0.001	T1, T2, T3, T4, T5

Table 5. Evolution of Bacteria in the Socransky Complexes in the Test Sites. ^aBacteria (mean ± standard deviation) after LOG conversion (Log₁₀ (count + 1)) of bacteria counts. ^bBy SUDAAN 7.0 (procedure REGRESS for global p-value and DESCRIPT for pairwise comparison only if global p-value is < 0.05) to account for clustering (multiple sites within the patient).

as H₂S, NH₃, indole). All anatomical and physiological conditions are gathered for dissemination in the body of virulent bacteria by breaking the microcirculatory bloodstream³².

This study demonstrated that the interdental biofilm in young adults with no signs of gingivitis or periodontitis have all the characteristics favoring the chronic infection low-grade process. Inflammation has classically been viewed as an acute response to tissue injury that produces characteristic symptoms and usually resolves spontaneously. If the development of periodontal disease is a result of the concerted action of the total biofilm community, there is no biologically perfect state of health called "pristine gingiva". Like the concept of para-inflammation developed in cancerology (Aran) i.e., a low-grade process identified with a gene signature, a para-inflammatory mechanism may be associated with periodontitis^{33–35}. These proinflammatory instigators promote a perpetual low-level chronic inflammatory state³⁶. Although it progresses silently, para-inflammation presents a major threat to the health and longevity of all aging humans.

Thus, by targeting the myriad of physiological variables that can elicit an inflammatory response, one can effectively prevent chronic inflammation and reduce the risk of inflammatory diseases. It is advantageous to keep bacterial reservoirs, such as those in the mouth, at the lowest levels possible to reduce the chances of the development of infection and chronic diseases. Regardless of age and medical history, reduction in infectious risks by oral virulent bacteria should be a priority.

In this study, young adults with no signs of gingivitis or periodontitis housed bacteria from the Socransky complexes and more particularly from the red and orange complexes in their interdental spaces. This result is consistent with what we observed in our previous study¹². The presence of these highly virulent periodontopathogens is evidence of interdental dysbiotic microbiota. Although complex interactions between immune response mediators and biofilms are necessary for disease progression from gingivitis to periodontitis³⁷, the host response is modified by dysbiotic microbiota, which provokes an inappropriate and uncontrolled level of inflammation⁵. This local inflammation causes an increased flow of nutrient-rich gingival crevicular fluid and potentially bleeding. Consequently, the inflamed site is deprived of oxygen, favoring the growth of anaerobic bacterial periodontopathogens³⁸.

Moreover, in this study, healthy young adults with no clinical signs of gingivitis bleed when they use calibrated IDBs as we previously described¹². They have inflammation in the interdental spaces, indicating that periodontal pathogens can penetrate the bloodstream³⁹. Generally, oral bacteria are eliminated from the vascular system

Bacteria	Time		
	Basal (T0)	4 weeks (T4)	3 months (T5)
Total bacteria	0.286	0.004	0.273
Socransky's Blue (<i>Actinomyces viscosus</i>)	0.453	0.002	0.662
Socransky's Purple	0.269	0.027	0.339
<i>Veillonella parvula</i>	0.138	0.040	0.282
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	0.360	0.036	0.851
Socransky's Green	0.590	0.956	0.968
<i>Eikenella corrodens</i>	0.170	0.284	0.207
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0.413	0.049	0.435
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0.516	0.022	0.169
<i>Campylobacter concisus</i>	0.652	0.725	0.602
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	0.158	0.095	0.118
Socransky's Yellow	0.083	0.131	0.220
<i>Streptococcus mitis</i>	0.068	0.002	0.100
<i>Streptococcus spp.</i>	0.104	0.172	0.242
Socransky's Orange	0.296	<0.001	<0.001
<i>Campylobacter gracilis</i>	0.901	<0.001	0.054
<i>Campylobacter rectus</i>	0.550	0.683	0.680
<i>Prevotella intermedia</i>	0.741	0.108	0.132
<i>Prevotella nigrescens</i>	0.927	<0.001	0.008
<i>Parvimonas micra</i>	0.051	0.101	0.787
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0.096	<0.001	<0.001
Socransky's Red	0.531	<0.001	<0.001
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0.819	0.043	0.036
<i>Tannerella forsythia</i>	0.592	<0.001	0.002
<i>Treponema denticola</i>	0.240	0.021	0.818

Table 6. Comparison of 50 Control and 50 Test Interproximal Sites after Follow-up in 25 Patients. The results are expressed as p-values obtained by SUDAAN 7.0 (procedure DESCRIPT) to account for clustering (multiple sites within the patient).

within 30 min and do not cause health problems⁴⁰. However, in some cases, these microorganisms impact distant sites provoking disease. Even if periodontal pathogens promote development of non-oral disease directly or indirectly, migration of oral pathogens, related to the accumulation of biofilm, to the blood stream could also occur, causing higher risk to certain conditions⁴. Bacteremia has in fact been observed following some dental or medical procedures, and some bacteria were isolated from the blood after endodontic treatment. No relationship between the state of oral health and the incidence of bacteraemia due to dental extraction, toothbrushing and chewing was found⁴¹. The fact that the gingival tissue of the interdental space papilla neck is not keratinized reinforces the hypothesis of a metastatic spread of infection in the absence of gingivitis or periodontal disease. The particular histology of this area could also promote metastatic inflammation from the effects of circulating oral microbial toxins, and metastatic inflammation caused by immunological injury induced by oral microorganisms³². Thus, effective oral hygiene is a crucial factor in maintaining good oral health, which is associated with global health⁵.

Unfortunately, toothbrushing is ineffective in removing interdental biofilm even when the teeth are in a normal position⁴². Dental floss has been recommended for many years in conjunction with toothbrushing for removing dental plaque between teeth. IDBs have been developed for the same use, and many people find them easier to use than floss, providing there is sufficient space between the teeth⁴³. However, to date, there is insufficient clinical evidence to determine whether interdental brushing reduces or increases the levels of plaque compared to flossing and/or toothbrushing¹⁹. Moreover, all these studies focused on patients who have gingivitis or periodontitis. Consequently, interdental prophylaxis in clinically healthy subjects remains to be improved.

Individual oral clinical prophylaxis is actually based on mechanical disruption and not on elimination of the biofilm⁵. To disrupt interdental biofilms, the entire interdental space must be in contact with the IDB filaments¹². The key factor in efficient interdental prophylaxis is the choice of an IDB whose diameter must correspond to that of the interdental space. In our study, a colorimetric interdental probe was used to choose the calibrated IDBs⁴⁴. The clinical use of a calibrated colorimetric probe for the measurement of interdental space diameters definitely adds value for decision-calibrated IDB support and could permit better action for the disruption of interdental biofilms⁴⁴.

Our study demonstrates that the use of IDBs in addition to toothbrushing decrease significantly the total number of bacteria at 4 weeks and 3 months and, re-establish the symbiotic microbiota by decreasing the quantity of bacteria associated with periodontal health (the purple, yellow and blue complexes) and decreasing the quantity of bacteria associated with periodontal disease (the orange and red complexes). The toothbrushing alone permit to stabilize the quantity of total bacteria and the quantity of bacteria from the yellow and the red complexes at 4 weeks and 3 months. So, the toothbrushing alone allows over a period of 3 months to maintain a microbiota

Bacteria	Test $\beta \pm se$	Basal value $\beta \pm se$	Age (yrs) $\beta \pm se$	Male $\beta \pm se$	IDB diam. (mm.) at 3 months $\beta \pm se$
Total bacteria	$-0.41 \pm 0.07^*$	$0.46 \pm 0.16^*$	$0.05 \pm 0.01^*$	0.11 ± 0.11	0.05 ± 0.36
Socransky's Blue (<i>Actinomyces viscosus</i>)	0.02 ± 0.26	$0.64 \pm 0.14^*$	-0.05 ± 0.04	0.28 ± 0.36	-0.22 ± 1.19
Socransky's Purple	0.04 ± 0.08	$0.35 \pm 0.13^*$	0.02 ± 0.02	-0.10 ± 0.20	0.22 ± 0.59
<i>Veillonella parvula</i>	0.05 ± 0.08	$0.30 \pm 0.12^*$	0.02 ± 0.02	-0.14 ± 0.20	0.32 ± 0.63
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	-0.16 ± 0.36	$0.46 \pm 0.10^*$	0.04 ± 0.04	0.05 ± 0.32	0.93 ± 1.33
Socransky's Green	-0.05 ± 0.12	$0.51 \pm 0.13^*$	$0.06 \pm 0.02^*$	-0.00 ± 0.17	0.85 ± 0.71
<i>Eikenella corrodens</i>	0.11 ± 0.18	$0.59 \pm 0.15^*$	0.05 ± 0.03	0.01 ± 0.26	0.66 ± 1.04
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0.08 ± 0.22	0.40 ± 0.26	0.09 ± 0.05	-0.17 ± 0.46	3.08 ± 2.53
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	-0.57 ± 0.30	$0.76 \pm 0.16^*$	0.01 ± 0.05	-0.38 ± 0.48	-0.91 ± 1.55
<i>Campylobacter concisus</i>	0.10 ± 0.22	$0.29 \pm 0.11^*$	0.05 ± 0.03	-0.17 ± 0.31	-0.68 ± 1.04
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	-0.05 ± 0.17	$0.77 \pm 0.07^*$	0.03 ± 0.03	0.21 ± 0.17	-0.05 ± 0.55
Socransky's Yellow	0.09 ± 0.11	$0.39 \pm 0.14^*$	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.19	0.68 ± 0.69
<i>Streptococcus mitis</i>	0.11 ± 0.10	$0.38 \pm 0.13^*$	0.03 ± 0.02	-0.02 ± 0.20	1.25 ± 0.80
<i>Streptococcus spp.</i>	0.09 ± 0.11	$0.39 \pm 0.14^*$	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.19	0.66 ± 0.72
Socransky's Orange	$-0.60 \pm 0.13^*$	$0.63 \pm 0.10^*$	$0.06 \pm 0.01^*$	-0.09 ± 0.13	$-1.40 \pm 0.40^*$
<i>Campylobacter gracilis</i>	-0.58 ± 0.31	$0.43 \pm 0.19^*$	0.05 ± 0.03	-0.41 ± 0.31	-0.94 ± 1.38
<i>Campylobacter rectus</i>	0.17 ± 0.32	$0.55 \pm 0.13^*$	0.02 ± 0.03	-0.23 ± 0.40	1.01 ± 1.14
<i>Prevotella intermedia</i>	-0.90 ± 0.48	$0.40 \pm 0.10^*$	$0.13 \pm 0.05^*$	0.04 ± 0.47	-2.54 ± 1.57
<i>Prevotella nigrescens</i>	$-0.97 \pm 0.33^*$	$0.46 \pm 0.08^*$	$0.16 \pm 0.04^*$	0.15 ± 0.36	0.48 ± 1.01
<i>Parvimonas micra</i>	-0.29 ± 0.26	$0.63 \pm 0.10^*$	$0.10 \pm 0.03^*$	0.60 ± 0.38	-0.24 ± 1.11
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$-0.65 \pm 0.14^*$	$0.52 \pm 0.20^*$	$0.07 \pm 0.02^*$	-0.12 ± 0.17	$-1.37 \pm 0.52^*$
Socransky's Red	$-1.00 \pm 0.27^*$	$0.77 \pm 0.13^*$	$0.13 \pm 0.05^*$	0.19 ± 0.41	$-3.00 \pm 1.14^*$
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	$-0.92 \pm 0.13^*$	$0.58 \pm 0.08^*$	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.24	-1.78 ± 0.91
<i>Tannerella forsythia</i>	$-1.10 \pm 0.35^*$	$0.70 \pm 0.14^*$	$0.14 \pm 0.05^*$	0.32 ± 0.45	-1.60 ± 1.43
<i>Treponema denticola</i>	$-0.71 \pm 0.24^*$	$0.54 \pm 0.08^*$	$0.14 \pm 0.07^*$	-0.14 ± 0.62	$-9.11 \pm 2.19^*$

Table 7. Analysis of Factors Impacting the Modification of Bacteria. Multiple regression models^a (one model per bacterial count^b at the end of follow-up – 3 months- as the dependent variable, –first column-). Data from 100 interproximal sites from 25 patients. Predictor variables (first line) are forced into the models. ^aBy SUDAAN 7.0 (procedure REGRESS) to account for clustering (multiple sites within the patient). ^bBacteria after LOG conversion (Log10 (count + 1)) of bacteria counts. * $p < 0.05$.

whose composition and compatible with a periodontal health. This confirms that periodontal dysbiosis occurs over a broadened timeframe, which slowly turns the symbiotic association of host and microbe to pathogenic⁴⁴.

Our results indicate that the quantity of total bacteria decreases within one week of use of IDBs. In particular, bacteria from the red and orange complexes i.e., virulent pathogens, are significantly decreased after one week of IDB use; the only exception was *P. gingivalis*, which significantly decreased after 4 weeks. This delay in the response time could be explained by the fact that this major agent in the incidence of periodontal disease can be resistant⁴⁵. First, *P. gingivalis* can escape to the host defense mechanisms, particularly when it is organized into a biofilm⁴⁶. In fact, *P. gingivalis* can deregulate the host immune system by producing a number of virulence factors, such as lipopolysaccharide, fimbriae, and several proteases⁴⁷. Interestingly, *T. denticola* is known to produce succinate, which facilitates the growth of *P. gingivalis*⁴⁸, and could be the first bacterium eradicated. Second, *P. gingivalis* can be difficult to eradicate even with the use of antimicrobials⁴⁹. Ardila and colleagues demonstrated that *P. gingivalis* strains isolated from patients suffering from periodontitis can be resistant to penicillin, clindamycin, amoxicillin, metronidazole, tetracycline, and azithromycin⁵⁰. If antimicrobials are inefficient, periodontitis becomes chronic, and surgical treatment becomes necessary⁴⁶. The daily use of IDBs could be a simple means to help fight against *P. gingivalis* and the other periodontal bacteria from the orange and red complexes.

Many studies have reported a link between bacteria from the red and orange complexes and systemic diseases⁵⁰. For example, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, and *T. denticola* can cause arteriosclerotic vascular diseases⁶. *P. gingivalis* in the respiratory mucosa increases the risk of developing aspiration pneumonia⁵¹. *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *P. intermedia* are associated with poor glycemic control in diabetes mellitus patients⁵². Therefore, the daily use of calibrated IDBs, which leads to a decrease in the quantity of periodontal pathogens and interdental inflammation, could also be efficient in preventing some systemic diseases.

Concerning bacteria from the green complex, no significant effect was observed for *C. sputigena* and *A. actinomycetemcomitans*, whereas *E. corrodens*, *C. ochracea* and *C. concisus* were significantly decreased. *E. corrodens* was classified in a complex associated with microbiota symbiosis. *E. corrodens* might play an important role not only in healthy patients but also in the occurrence or progression of periodontitis in young patients⁵³. *C. ochracea* and *C. concisus* are described in both healthy and diseased patients, underlying the possibility for strains to have different pathogenic potential^{54,55}. Therefore, the pathogenic potential may differ depending on the anatomical site in the same host⁴⁶. Depending on the ecological niche, bacteria adapt, leading to varying phenotypic expression and, consequently, different host responses⁵⁷.

Bacteria from the blue, purple and yellow complexes, which are associated with oral health, increase over time with the daily use of IDBs. Our results demonstrate that, with the daily use of IDBs, the proportion of bacteria associated with good oral health increased, whereas bacteria associated with periodontal disease decreased. Moreover, these results are associated with a decrease in interdental inflammation. Therefore, the use of calibrated-diameter IDBs appears to be a key factor in disturbing the interdental biofilm and restoring the symbiosis of the microbiota.

Our study has several limitations. First, a targeted group of virulent bacteria has been identified mainly because of historical evidence of their ability to differentiate periodontitis from health. A subsequent prospective longitudinal experimental design in conjunction with a broader panel of bacteria could be necessary to demonstrate the prognostic ability of IDBs and link bacteria to non-oral diseases. Therefore, some of these results can only be considered exploratory, and a direct connection between local and systemic immunological factors cannot be assumed. A more detailed study that explicitly accommodates the various factors that can contribute to patient-specific variations may be necessary to assess the individual contributions of these factors. Further studies should follow-up on the immunological and microbiological results to characterize the connection between systemic factors and local factors in the periodontium more precisely.

Despite these limitations, this study is unique. We conducted a cohort study involving clinically healthy patients performed by professional dentists using the same criteria to minimize the errors introduced by clinical diagnosis and bacterial samples. One of the main strengths of this study is that we included well-defined cohorts with a number of sites adapted to the use of the PCR method and the incidence of virulent bacteria in healthy adults. Second, our study investigated a large number of sites to reflect a close-to-real-life-picture of the utilization of IDBs. The potential confirmation that natural gingival inflammatory processes are extravascular stimuli triggering systemic inflammation could have great public health implications.

In this context, our clinical results should introduce new clinical and public health perspectives.

In the short term, the daily use of IDBs could lead to the reestablishment of symbiotic interdental microbiota and the disappearance of interdental inflammation by decreasing periodontal pathogens. This could also contribute to reestablishing symbiosis of the salivary and oral microbiota.

In the medium term, this method could significantly reduce the incidence and/or severity of periodontal diseases. Toothbrushing is the cornerstone of dental health education to prevent periodontal disease, while also emphasizing the need to systematically clean all interdental tooth surfaces³⁸. In fact, 90% of adults in industrialized countries report brushing twice a day³⁹. However, the incidence of severe periodontitis in 2016 was 89 840 000 cases⁴. This prophylactic approach may be important in preventing and controlling chronic periodontitis by preventing growth and colonization by periodontal pathogens and decreasing inflammation.

In the long term, the daily use of calibrated IDBs should contribute to reducing risk, morbidity and mortality mainly related to systemic diseases such as cardiovascular diseases, diabetes, cancers and chronic respiratory diseases. To improve this hypothesis, long-term prospective cohort studies are needed.

Conclusions

In this article, we performed a microbiological evaluation of a prophylactic technique used to reduce the incidence of periodontitis and systemic disease. This field of research is especially relevant considering the increasing morbidity and relatively high mortality previously discussed. Our study contributes to the production of information regarding strategies and research investigating the reduction of inflammation characteristic to specific health conditions.

Therefore, benefits in terms of oral prophylactic behaviors and general health should be observed considering the positive impact of using calibrated IDBs.

Effective collaboration that supports prophylactic activity must include participation by the whole community, including health professionals, dentists, patients and the wider community, and be focused on achieving results. In summary, calibrated interdental brushes are a great alternative to flossing that dental professionals can offer to patients to improve their health.

Ethics approval and consent to participate. The study protocol was reviewed and approved by the Local Ethics Committee “University Hospital Center of Lyon” (Rech_FRCH_2015-0181) and by the National Commission of Informatics and Liberties, France (1845681 v 0). All participants signed a consent form in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was registered with ClinicalTrials.gov (identification number: NCT03714295).

Data availability

The authors thank all study subjects for their participation and the clinicians for their contributions leading to the successful completion of this study.

Received: 31 January 2019; Accepted: 10 October 2019;

Published online: 22 October 2019

References

- Vos, T. *et al.* Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 390, 1211–59 (2017).
- Cao, Y. *et al.* Comparative Analyses of Subgingival Microbiome in Chronic Periodontitis Patients with and Without IgA Nephropathy by High Throughput 16S rRNA Sequencing. *Cell Physiol Biochem*. 47(2), 774–83. (2018).
- Katz, J., Sambandam, V., Wu, J. H., Michalek, S. M. & Balkovetz, D. F. Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun*. 68, 1441–9 (2000).

4. Bui, F. Q. *et al.* Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* **42**(1), 27–35 (2019).
5. Kilian, M. *et al.* The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *B Dent J.* **221**, 657–66 (2016).
6. Bale, B. F., Doneen, A. L. & Vigerust, D. J. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. *Postgrad Med J.* **93**, 215–20 (2017).
7. Nazir, M. A. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci.* **11**(2), 72–80 (2017).
8. Carter, C. J., France, J., Crean, S. & Singhrao, S. The Porphyromonas gingivalis/Host Interactome Shows Enrichment in GWASdb Genes Related to Alzheimer's Disease, Diabetes and Cardiovascular Diseases. *Front Aging Neurosci.* **9**, 408 (2017).
9. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* **25**, 134–44 (1998).
10. Suzuki, N., Yoneda, M. & Hirofujii, T. Mixed Red-Complex Bacterial Infection in Periodontitis. *Int J Dent.* **2013**, 587279 (2013).
11. Kriebel, K., Hieke, C., Müller-Hilke, B., Nakata, M. & Kreikemeyer, B. Oral Biofilms from Symbiotic to Pathogenic Interactions and Associated Disease – Connection of Periodontitis and Rheumatic Arthritis by Peptidylarginine Deiminase. *Front Microbiol.* **9**, 53 (2018).
12. Carrouel, F., Viennot, S., Santamaria, J., Veber, P. & Bourgeois, D. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front Microbiol.* **7**, 840 (2016).
13. Duval, X. *et al.* Oral Streptococcal Endocarditis, Oral Hygiene Habits, and Recent Dental Procedures: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis.* **64**(12), 1678–85 (2017).
14. Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* **4**, 1–6 (1999).
15. da Silva-Boghossian, C. M., do Souto, R. M., Luiz, R. R. & Colombo, A. P. Association of red complex, Actinomyces comitans and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol.* **56**, 899–906 (2011).
16. Bourgeois, D. *et al.* Efficacy of interdental calibrated brushes on bleeding reduction in adults: a 3-month randomized controlled clinical trial. *Eur J Oral Sci.* **124**(6), 566–71 (2016).
17. Haffajee, A. D., Socransky, S. S. & Goodson, J. M. Clinical parameters as predictors of destructive periodontal disease activity. *J Clin Periodontol.* **10**, 257–65 (1983).
18. Bourgeois, D., Carrouel, F., Llodra, J. C., Bravo, M. & Viennot, S. A Colorimetric Interdental Probe as a Standard Method to Evaluate Interdental Efficiency of Interdental Brush. *Open Dent J.* **9**, 431–7 (2015).
19. Worthington, H. V. *et al.* Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. Cochrane Database of Systematic Reviews, Issue4:CD012018 (2019).
20. Graziani, F. *et al.* Interdental plaque reduction after use of different devices in young subjects with intact papilla: a randomized clinical trial. *Int J Dent Hyg.* **16**(3), 389–96 (2018).
21. Jared, H. *et al.* Clinical trial of a novel interdental brush cleaning system. *J Clin Dent.* **16**(2), 47–52 (2005).
22. Heitz-Mayfield, L. J. & Lang, N. P. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000.* **62**(1), 218–31 (2013).
23. Nath, S. G. & Raveendran, R. Microbial dysbiosis in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol.* **17**(4), 543–545 (2013).
24. Alwaeli, A. Z. J. Anaerobic Bacteria Associated with Periodontitis. In: Bhonchal Bhardwaj S IntechOpen. Oral Microbiol Periodontitis. 2018. Available at, <https://www.intechopen.com/books/oral-microbiology-in-periodontitis/anaerobic-bacteria-associated-with-periodontitis>.
25. Hajishengallis, G. Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response. *Trends Immunol.* **35**(1), 3–11 (2014).
26. Hajishengallis, G., Maekawa, T., Abe, T., Hajishengallis, E. & Lambris, J. D. Complement Involvement in Periodontitis: Molecular Mechanisms and Rational Therapeutic Approaches. *Adv Exp Med Biol.* 2015;865:57–74, https://doi.org/10.1007/978-3-319-18603-0_4. PubMed PMID: 26306443; PubMed Central PMCID: PMC4562417.
27. Meyle, J. *et al.* The innate host response in caries and periodontitis. *J Clin Periodontol.* **44**(12), 1215 (2017).
28. Presland, R. B. & Jurevic, R. J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J Dent Educ.* **66**(4), 547–58 (2002).
29. Armitage, G. C. The complete periodontal examination. *Periodontol 2000.* **34**, 22–33 (2004).
30. Brochut, P. F., Marin, I., Baehni, P. & Mombelli, A. Predictive value of clinical and microbiological parameters for the treatment outcome of scaling and root planing. *J. clin. Periodontol.* **32**(7), 695–701 (2005).
31. Popova, C., Dosseva-Panova, V. & Panov, V. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment.* **27**(3), 3754–9 (2013).
32. Li, X., Kolltveit, K. M., Tronstad, L. & Olsen, I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* **13**(4), 547–58 (2000).
33. Aran, D. *et al.* Widespread parainflammation in human cancer. *Genome Biol.* **17**(1), 145 (2016).
34. Barton, M. K. Evidence accumulates indicating periodontal disease as a risk factor for colorectal cancer or lymphoma. *CA Cancer J Clin.* **67**(3), 173–4 (2017).
35. Corbella, S. *et al.* Is periodontitis a risk indicator for cancer? A meta-analysis. *PLoS One.* **13**(4), e0195683 (2018).
36. Medzhitov, R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* **454**(7203), 428–35 (2008).
37. Meyle, J. & Chapple, I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000.* **69**, 7–17 (2015).
38. Marsh, P. D., Head, D. A. & Devine, D. A. Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* **49**(Suppl 1), 46–54 (2015).
39. Tomas, I., Diz, P., Tobias, A., Scully, C. & Donos, N. Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol.* **39**, 213–28 (2012).
40. Olsen, I. & van Winkelhoff, A. J. Acute focal infections of oral origin. *Periodontol 2000.* **65**, 178–89 (2014).
41. Maharaj, B., Coovadia, Y. & Vayej, A. C. An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. *Cardiovasc J Afr.* **23**(6), 340–4 (2012).
42. Warren, P. R. & Chater, B. V. An overview of established interdental cleaning methods. *J Clin Dent.* **7**(3 Spec No), 65–9 (1996).
43. Poklepovic, T. *et al.* Interdental brushing for the prevention and control of periodontal diseases and dental caries in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* **12**, CD009857 (2013).
44. Shaikh, H. F. M., Patil, S. H., Pangam, T. S. & Rathod, K. V. Polymicrobial synergy and dysbiosis: An overview. *J Indian Soc Periodontol.* **22**(2), 101–106 (2018).
45. Rafiei, M. *et al.* Prevalence of Anaerobic Bacteria (Pgingivalis) as Major Microbial Agent in the Incidence Periodontal Diseases by Meta-analysis. *J Dent (Shiraz).* **19**(3), 232–42 (2018).
46. Gerits, E., Verstraeten, N. & Michiels, J. New approaches to combat Porphyromonas gingivalis biofilms. *J Oral Microbiol.* **9**(1), 1300366 (2017).
47. Zenobia, C. & Hajishengallis, G. Porphyromonas gingivalis virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence.* **6**, 236–43 (2015).
48. Yamada, M., Ikegami, A. & Kuramitsu, H. K. Synergistic biofilm formation by *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett.* **250**, 271–7 (2005).
49. Ardila, C. M., Granada, M. I. & Guzmán, I. C. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontol Res.* **45**, 557–63 (2010).
50. Patil, R. *et al.* Role of oral foci in systemic diseases: An update. *Int J Contemp Dent. Med Rev.* **2017**, 040117 (2017).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette recherche a permis principalement d'analyser le microbiote interdentaire selon le risque carieux des adolescents âgés de 15 à 17 ans. L'origine de ce projet trouve sa justification par l'analyse conjointe de facteurs de risque carieux et de critères bactériologiques. Les études disponibles, liées au microbiote carieux des adolescents, concernaient le microbiote sous-gingival sans localisation anatomique spécifique, pendant et/ou après un traitement orthodontique. Et ce pour un domaine d'application bactérien se focalisant sur quelques bactéries (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythia*)(640–644).

Tous les agents pathogènes pris en compte dans nos recherches avaient été identifiés dans des échantillons oraux d'enfants, d'adolescents ou de jeunes adultes (382,580,645,646). Des bactéries parodontopathogènes et cariogènes ont été identifiées et quantifiées par analyse PCR en temps réel, car certaines études ont démontré une association positive entre la MP et les lésions carieuses, tandis que d'autres ont démontré une association négative (647,648).

Les modèles d'évaluation du risque carieux associent une combinaison de facteurs de risque et de facteurs de protection qui interagissent avec une variété de facteurs sociaux, culturels et comportementaux (157). Un déséquilibre en faveur des facteurs de risque par rapport aux facteurs protecteurs induit la progression des lésions existantes ou l'apparition de nouvelles lésions (367). Ainsi, les praticiens analysent les différents facteurs cliniques et sociaux d'un patient et peuvent ainsi attribuer un statut de risque carieux (649). Pour les patients à faible risque, il n'est pas nécessaire de poursuivre le traitement préventif professionnel et il convient de leur proposer un suivi prolongé (345). Pour les patients à haut risque, des actions préventives doivent être entreprises pour réduire l'incidence et la gravité des futures lésions carieuses (345). À l'heure actuelle, les critères nécessaires pour effectuer des évaluations quantitatives du risque carieux sont encore incomplets car privés de l'analyse du microbiote oral. Seule la classification de Featherstone tient compte de la quantification de *S. mutans* et des *Lactobacilles* chez les adolescents (367). En ce sens, notre recherche contribue à valoriser la performance clinique des modèles d'évaluation du risque carieux.

S. mutans a été associé à des caries occlusales chez les enfants et les adolescents (650,651) et à des caries radiculaires chez les patients âgés (652,653). Son rôle dans le développement des caries est bien établi (654–658). Pendant de nombreuses années, *S. mutans* a été considéré comme le principal agent pathogène oral impliqué dans le processus carieux. Cependant, ce rôle a été remis en question (659). En effet, des caries ont été observées en son absence (660–663). Dans notre

étude, *S. mutans* était exprimé en petites quantités et seulement 66% des adolescents l'exprimaient. Nos résultats ont donc confirmé que *S. mutans* seul ne pouvait pas être utilisé pour prédire le risque carieux comme démontré précédemment par Gross et al. (660).

Les lactobacillus spp., quant à eux, sont associés aux lésions carieuses. En particulier ils seraient impliqués dans la progression des caries dentinaires (664–666). Dans notre étude, les *lactobacillus spp.* étaient présents chez tous les sujets, avec des taux légèrement plus élevés dans le groupes à risque carieux élevé, mais de manière non significative.

Parmi les différentes bactéries cariogènes testées (*B. dentium*, *Lactobacillus spp.*, *R. dentocariosa*, *S. cristatus*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus* et *S. wiggsiae*), aucune d'entre elles ne présentait de différences significatives entre les deux groupes à risque carieux, faible ou élevé, des adolescents. Ainsi, ces bactéries ne représentaient pas une bonne prédiction pour le risque carieux.

Parmi les bactéries parodontales, et plus particulièrement, en ce qui concerne le complexe rouge de Socransky, *P. gingivalis* n'a pas été détecté chez les adolescents de risque carieux faible mais a été détecté dans 11% des sites interdentaires du groupe du risque carieux élevé. Ce résultat pourrait s'expliquer parce le fait que dans les deux groupes, la quantité de *S. mutans* et de *S. sanguinis* étaient élevés par rapport à la quantité de *P. gingivalis*. Une étude a démontré que la croissance de *P. gingivalis* était significativement inhibée par des surnageants de *S. mutans* et de *S. sanguinis* (667).

T. forsythia était exprimé chez 96% des adolescents et dans 83% des sites interdentaires. Une augmentation significative de cette bactérie a été observée chez les adolescents avec un risque carieux élevé. De manière générale, *T. forsythia* agit avec *P. gingivalis* pour initier une parodontite chronique (668,669). Cet agent pathogène n'a jamais été décrit dans le processus carieux. Dans notre étude, *T. forsythia* n'était pas corrélé à *P. gingivalis* et donc pourrait agir avec d'autres bactéries telles que *S. cristatus* ou *R. dentocariosa* (670,671).

T. denticola a été détecté en faible quantité chez les adolescents, mais en plus grande quantité dans le groupe du risque carieux élevé. Cette bactérie a été détectée dans des sites interdentaires exprimant des bactéries du complexe rouge ou orange. Ceci est conforme aux études précédentes qui ont démontré que *T. denticola* ne pouvait pas adhérer seul, sur les surfaces dentaires. Il nécessiterait la présence d'autres agents parodontopathogènes (672). Dans les biofilms dentaires sous-gingivaux, *T. denticola* était généralement associé avec *P. gingivalis* (672).

Deux clusters ont été identifiés chez les adolescents. Le premier cluster associé au groupe à risque carieux élevé était composé de *C. gracilis*, *P. micra*, *C. rectus*, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *V. parvula* et *F. nucleatum*, alors que le second cluster était composé de *Lactobacillus spp.*, *Clostridium XIV*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *A. odontolyticus* et *S. salivarius*. Le cluster associé au groupe à risque carieux faible était composé de *S. mitis*, *A. odontolyticus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *F. nucleatum*, *Clostridium XIV*, *P. micra*, *T. denticola* et *C. rectus*.

Finalement, chez les adolescents, seules trois bactéries : *S. sobrinus*, *E. corrodens* et *T. forsythia* pourraient avoir un rôle dans le développement des caries. *E. corrodens* semble être plus intéressant car il a été trouvé dans tous les sites interdentaires du groupe à risque carieux élevé. Il est important de noter que la détection de *S. sobrinus* et de *T. forsythia* pourrait donner de faux négatifs car ils n'étaient ni détectés dans tous les sites interdentaires, ni chez tous les adolescents du groupe du risque carieux élevé.

Ainsi, ces trois bactéries pourraient constituer des marqueurs prédictifs d'apparition de lésions carieuses et leur quantification interdentaire pourrait être intégrée dans les classifications du risque carieux afin de les améliorer.

Une extension logique de notre recherche a porté sur de jeunes adultes sains âgés de 18 à 35 ans. Le point significatif est que l'analyse quantitative de chacun des espaces interdentaires a mis en évidence un microbiote interdentaire dysbiotique. Les bactéries parodontales hautement virulentes du complexe de Socransky étaient surreprésentées (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*). Cependant, notre étude de recherche clinique liée à l'impact de la prophylaxie individuelle sous la forme d'utilisation quotidienne de brossettes interdentaires calibrées a mis en évidence la capacité, sur une période de 3 mois, à rétablir la symbiose du microbiote et à diminuer l'inflammation interdentaire. Principalement, nous avons observé une réduction des saignements interdentaires de 47% après une semaine d'utilisation quotidienne et de 85% après 3 mois. En parallèle, le nombre de bactéries des complexes de Socransky orange et rouge était fortement diminué à 4 semaines et à 3 mois après le début de l'essai. À moyen terme, cette méthode de prophylaxie individuelle pourrait réduire de manière significative l'incidence et la sévérité des lésions parodontales. À long terme, l'utilisation quotidienne de brossettes interdentaires calibrées devrait contribuer à réduire le risque, la morbidité et la mortalité de maladies systémiques.

Il s'agit d'un thème de recherche prospectif passionnant et porteur dont les conséquences bénéfiques en santé publique dépassent largement le cadre de l'odontologie. Il s'agira de répondre

au défi de « comment maintenir une sphère orale en symbiose » afin de lui permettre d'assurer sa fonction originelle, la mastication, tout en contribuant à ne pas perturber les microbiotes du système digestif, du système respiratoire et du système sanguin et à réduire le risque d'apparition ou de sévérité des principales maladies chroniques. C'est toute la dimension scientifique originale de notre recherche dont les domaines d'application placent avant toute chose, dès l'adolescence, l'individu au cœur du système de santé de par sa prise en charge prophylactique individuelle et le chirurgien-dentiste comme pivot et garant de la santé générale de ses patients de par son rôle de conseils, d'éducation, de détection et de surveillance.

BIBLIOGRAPHIE

1. James SL, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet*. 2018;392(10159):1789-858.
2. Valm AM. The Structure of Dental Plaque Microbial Communities in the Transition from Health to Dental Caries and Periodontal Disease. *J Mol Biol*. 2019;431(16):2957-69.
3. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primer*. 2017;3:17030.
4. Abou Neel EA, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young AM, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:4743-63.
5. Chenicheri S, R U, Ramachandran R, Thomas V, Wood A. Insight into Oral Biofilm: Primary, Secondary and Residual Caries and Phyto-Challenged Solutions. *Open Dent J*. 2017;11:312-33.
6. Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, et al. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. *PloS One*. 2017;12(7):e0180621.
7. Zaura E, Keijser BJJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy « core microbiome » of oral microbial communities. *BMC Microbiol*. 2009;9:259.
8. Tanner ACR, Kressler CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):78-85.
9. Mosaddad, Tahmasebi E, Yazdani A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdani M, et al. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(11):2005-19.
10. Carrouel F, Llodra JC, Viennot S, Santamaria J, Bravo M, Bourgeois D. Access to Interdental Brushing in Periodontal Healthy Young Adults: A Cross-Sectional Study. *PloS One*. 2016;11(5):e0155467.
11. Ng E, Lim LP. An Overview of Different Interdental Cleaning Aids and Their Effectiveness. *Dent J*. 2019;7(2).
12. Maheswari SU, Raja J, Kumar A, Seelan RG. Caries management by risk assessment: A review on current strategies for caries prevention and management. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7:320-4.
13. Worthington HV ML, Poklepovic Pericic T SD, Johnson TM IP, Clarkson JE. Home use of devices for cleaning between the teeth (in addition to toothbrushing) to prevent and control gum diseases and tooth decay. *Cochrane*. 2019. Disponible sur: [/CD012018/ORAL_home-use-devices-cleaning-between-teeth-addition-toothbrushing-prevent-and-control-gum-diseases-and](#)
14. Slot DE, Wiggelinkhuizen L, Rosema N a. M, Van der Weijden GA. The efficacy of manual toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2012;10(3):187-97.
15. Dye BA, Thornton-Evans G, Li X, Iafolla TJ. Dental caries and sealant prevalence in children and adolescents in the United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*. 2015;(191):1-8.
16. Schwendicke F, Paris S, Stolpe M. Detection and treatment of proximal caries lesions: Milieu-specific cost-effectiveness analysis. *J Dent*. 2015;43(6):647-55.
17. Alm A, Wendt LK, Koch G, Birkhed D. Prevalence of approximal caries in posterior teeth in 15-year-old Swedish teenagers in relation to their caries experience at 3 years of age. *Caries Res*. 2007;41(5):392-8.
18. Ministère des Solidarités et de la Santé. En 2017, des adolescents plutôt en meilleure santé physique mais plus souvent en surcharge pondérale [Internet]. 2019 [cité 24 sept 2019]. Disponible sur: <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/etudes-et-statistiques/publications/etudes-et-resultats/article/en-2017-des-adolescents-plutot-en-meilleure-sante-physique-mais-plus-souvent-en>
19. Pitts N. « ICDAS »--an international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries

- epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health*. 2004;21(3):193-8.
20. Lussi A, João-Souza SH, Megert B, Carvalho TS, Baumann T. The erosive potential of different drinks, foodstuffs and medicines – a vade mecum. *Swiss Dent J*. 2019;129(6):479-87.
 21. Nihtila A, West N, Lussi A, Bouchard P, Ottolenghi L, Senekola E, et al. Oral Health Behavior and Lifestyle Factors among Overweight and Non-Overweight Young Adults in Europe: A Cross-Sectional Questionnaire Study. *Healthcare*. 2016;4(2).
 22. Featherstone JDB, Chaffee BW. The Evidence for Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA®). *Adv Dent Res*. 2018;29(1):9-14.
 23. Erbe C, Klees V, Ferrari-Peron P, Ccahuana-Vasquez RA, Timm H, Grender J, et al. A comparative assessment of plaque removal and toothbrushing compliance between a manual and an interactive power toothbrush among adolescents: a single-center, single-blind randomized controlled trial. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):130.
 24. de Silva AM, Hegde S, Akudo Nwagbara B, Calache H, Gussy MG, Nasser M, et al. Community-based population-level interventions for promoting child oral health. *Cochrane*. 2016;9:CD009837.
 25. HCAAM. La prévention dans le système de soins. Organisation, territoires et financement. [Internet]. 2018 oct [cité 14 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.strategie.gouv.fr/publications/prevention-systeme-de-soins>
 26. Cummins D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. *J Dent*. 2013;41:1-11.
 27. Dorri M, Dunne SM, Walsh T, Schwendicke F. Micro-invasive interventions for managing proximal dental decay in primary and permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015;(11):CD010431.
 28. Bourgeois D, Saliassi I, Llodra JC, Bravo M, Viennot S, Carrouel F. Efficacy of interdental calibrated brushes on bleeding reduction in adults: a 3-month randomized controlled clinical trial. *Eur J Oral Sci*. 2016;124(6):566-71.
 29. OMS. Conférence mondiale de l’OMS sur les maladies non transmissibles [Internet]. 2017 [cité 19 nov 2019]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/events/2017/ncd-global-conference/fr/>
 30. OMS. Consideration of the evidence on childhood obesity for the Commission on Ending Childhood Obesity. [Internet]. 2016. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/206549/9789241565332_eng.pdf?sequence=1
 31. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*. 2005;115(3):e290-296.
 32. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health Glob Access Sci Source*. 2012;11:42.
 33. Parlee SD, MacDougald OA. Maternal Nutrition and Risk of Obesity in Offspring: The Trojan Horse of Developmental Plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(3):495-506.
 34. Hussein J. Non-communicable diseases during pregnancy in low and middle income countries. *Obstet Med*. 2017;10(1):26-9.
 35. Sundholm JKM, Litwin L, Rönö K, Koivusalo SB, Eriksson JG, Sarkola T. Maternal obesity and gestational diabetes: Impact on arterial wall layer thickness and stiffness in early childhood - RADIEL study six-year follow-up. *Atherosclerosis*. 2019;284:237-44.
 36. OMS. The WHO Framework Convention on Tobacco Control an Accelerator for Sustainable Development. [Internet]. 2017 [cité 27 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.who.int/fctc/implementation/publications/who-fctc-accelerator-for-sustainable-development/en/>
 37. Oberg M, Jaakkola MS, Woodward A, Peruga A, Prüss-Ustün A. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet Lond Engl*. 2011;377(9760):139-46.
 38. Bonnie R, Stratton K, Kwan L, Practice. The Effects of Tobacco Use on Health [Internet]. National Academies

Press; 2015 [cité 19 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310413/>

39. Griffin A. Adolescent Neurological Development and Implications for Health and Well-Being. *Healthcare*. 2017;5(4).
40. Patton GC, Sawyer SM, Santelli JS, Ross DA, Afifi R, Allen NB, et al. Our future: a Lancet commission on adolescent health and wellbeing. *Lancet*. 2016;387(10036):2423-78.
41. OMS. Global Accelerated Action for the Health of Adolescents (AA-HA!). Guidance to Support Country Implementation. [Internet]. 2017 [cité 27 oct 2019]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255415/9789241512343-eng.pdf?sequence=1>
42. OMS. Approches de la prévention de l'obésité de l'enfant dans la population. [Internet]. 2012. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/85399/9789242504781_fre.pdf?sequence=1
43. Abarca-Gómez L, Abdeen ZA, Hamid ZA, Abu-Rmeileh NM, Acosta-Cazares B, Acuin C, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. *The Lancet*. 2017;390(10113):2627-42.
44. OMS. Rapport mondial sur le diabète. [Internet]. 2016. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254648/9789242565256-fre.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
45. NCD Child. Call for Action for NCDs, Child Survival and Child Health. [Internet]. 2014. Disponible sur: http://www.ncdchild.org/media/1128/ncd-childcall-for-action_electronic.pdf
46. OMS. Health for the World's Adolescents. A second chance in the second decade. [Internet]. 2014. Disponible sur: https://apps.who.int/adolescent/second-decade/files/1612_MNCAH_HWA_Executive_Summary.pdf
47. Marmot M, Bell R. Social determinants and non-communicable diseases: time for integrated action. *BMJ*. 2019;364.
48. Petersen PE, Kwan S. Equity, social determinants and public health programmes-the case of oral health. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2011;39(6):481-7.
49. Darnton-Hill I, Nishida C, James W. A life course approach to diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. *Public Health Nutr*. 2004;7:101-21.
50. OMS. Déclaration politique de Rio sur les déterminants sociaux de la santé. Rio de Janeiro (Brésil). [Internet]. 2011 oct [cité 19 oct 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/sdhconference/declaration/Rio_political_declaration_French.pdf
51. FDI. The Challenge of Oral Disease: A Call for Global Action. 2015 [cité 19 nov 2019]; Disponible sur: https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/documents/complete_oh_atlas.pdf
52. Nations Unies. Réunion de haut niveau sur les maladies non transmissibles: l'Assemblée adopte une Déclaration politique qui engage les États Membres à s'aligner sur les directives de l'OMS [Internet]. 2011 [cité 19 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.un.org/press/fr/2011/AG11138.doc.htm>
53. OMS. Déclaration politique de la Réunion de haut niveau de l'Assemblée générale sur la prévention et la maîtrise des maladies non transmissibles [Internet]. 2013 [cité 19 oct 2019]. Disponible sur: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/173043/B134_14-fr.pdf?sequence=1&isAllowed=y
54. Kudlová E. Life cycle approach to child and adolescent health. *Cent Eur J Public Health*. 2004;12(3):166-70.
55. OMS. Multisectoral and intersectoral action for improved health and well-being for all: mapping of the WHO. European Region Governance for a sustainable future: improving health and well-being for all. [Internet]. 2018. Disponible sur: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/371435/multisectoral-report-h1720-eng.pdf?ua=1
56. Baker R, Taylor E, Essafi S, Jarvis JD, Odok C. Engaging young people in the prevention of noncommunicable diseases. *Bull World Health Organ*. 2016;94(7):484.
57. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ*. 2005;83(9):661-9.

58. Baiju R, Peter E, Varghese N, Sivaram R. Oral Health and Quality of Life: Current Concepts. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2017;11(6):21-6.
59. Kailembo A, Preet R, Stewart Williams J. Common risk factors and edentulism in adults, aged 50 years and over, in China, Ghana, India and South Africa: results from the WHO Study on global AGEing and adult health (SAGE). *BMC Oral Health*. 2016;17.
60. FDI. Accelerating action on oral health and NCDs. Achieving an integrated response. [Internet]. 2017. Disponible sur: https://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/resources/ncda_fdi-policy_brief_oral_health_ncds.pdf
61. OMS. The WHO Global Monitoring Framework on noncommunicable diseases. Progress towards achieving the targets for the WHO European Region. [Internet]. 2017 juin [cité 18 oct 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/nmh/ncd-tools/indicators/GMF_Indicator_Definitions_Version_NOV2014.pdf
62. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci*. 2017;11(2):72-80.
63. Rafiei M, Kiani F, Sayehmiri K, Sayehmiri F, Tavirani M, Dousti M, et al. Prevalence of Anaerobic Bacteria (*P.gingivalis*) as Major Microbial Agent in the Incidence Periodontal Diseases by Meta-analysis. *J Dent*. 2018;19(3):232-42.
64. Dumitrescu AL. Depression and Inflammatory Periodontal Disease Considerations—An Interdisciplinary Approach. *Front Psychol*. 2016;7.
65. Hajishengallis G, Lamont RJ. Metabolic nuclear receptors in periodontal host–microbe interactions and inflammation. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(6):443-5.
66. Buset SL, Walter C, Friedmann A, Weiger R, Borgnakke WS, Zitzmann NU. Are periodontal diseases really silent? A systematic review of their effect on quality of life. *J Clin Periodontol*. 2016;43(4):333-44.
67. Xu S, Song M, Xiong Y, Liu X, He Y, Qin Z. The association between periodontal disease and the risk of myocardial infarction: a pooled analysis of observational studies. *BMC Cardiovasc Disord*. 2017;17(1):50.
68. Martin-Cabezas R, Seelam N, Petit C, Agossa K, Gaertner S, Tenenbaum H, et al. Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2016;180:98-112.
69. Yang S, Zhao LS, Cai C, Shi Q, Wen N, Xu J. Association between periodontitis and peripheral artery disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2018;18(1):141.
70. Leira Y, Seoane J, Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Takkouche B, Blanco J, et al. Association between periodontitis and ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. 2017;32(1):43-53.
71. Shi Q, Zhang B, Xing H, Yang S, Xu J, Liu H. Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Suffer from Worse Periodontal Health-Evidence from a Meta-Analysis. *Front Physiol*. 2018;9:33.
72. Al-Jewair TS, Al-Jasser R, Almas K. Periodontitis and obstructive sleep apnea's bidirectional relationship: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Breath Schlaf Atm*. 2015;19(4):1111-20.
73. Corbella S, Veronesi P, Galimberti V, Weinstein R, Del Fabbro M, Francetti L. Is periodontitis a risk indicator for cancer? A meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(4):e0195683.
74. Maisonneuve P, Amar S, Lowenfels AB. Periodontal disease, edentulism, and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2017;28(5):985-95.
75. Shi T, Min M, Sun C, Zhang Y, Liang M, Sun Y. Periodontal disease and susceptibility to breast cancer: A meta-analysis of observational studies. *J Clin Periodontol*. 2018;45(9):1025-33.
76. Zeng X-T, Xia L-Y, Zhang Y-G, Li S, Leng W-D, Kwong JSW. Periodontal Disease and Incident Lung Cancer Risk: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *J Periodontol*. 2016;87(10):1158-64.
77. Xie W-Z, Jin Y-H, Leng W-D, Wang X-H, Zeng X-T. Periodontal Disease and Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis of 298476 Participants. *Front Physiol*. 2018;9.
78. Ye L, Jiang Y, Liu W, Tao H. Correlation between periodontal disease and oral cancer risk: A meta-analysis. *J*

Cancer Res Ther. 2016;12:237-40.

79. Zeng X-T, Deng A-P, Li C, Xia L-Y, Niu Y-M, Leng W-D. Periodontal disease and risk of head and neck cancer: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2013;8(10):e79017.
80. Kapellas K, Singh A, Bertotti M, Nascimento GG, Jamieson LM, Perio-CKD collaboration. Periodontal and chronic kidney disease association: A systematic review and meta-analysis. *Nephrol Carlton Vic*. 2019;24(2):202-12.
81. Zhao D, Khawaja AT, Jin L, Li K-Y, Tonetti M, Pelekos G. The directional and non-directional associations of periodontitis with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *J Periodontol Res*. 2018;53(5):682-704.
82. Zhang J, Jiang H, Sun M, Chen J. Association between periodontal disease and mortality in people with CKD: a meta-analysis of cohort studies. *BMC Nephrol*. 2017;18.
83. Corbella S, Taschieri S, Del Fabbro M, Francetti L, Weinstein R, Ferrazzi E. Adverse pregnancy outcomes and periodontitis: A systematic review and meta-analysis exploring potential association. *Quintessence Int*. 2016;47(3):193-204.
84. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Relationship between Periodontitis and Pre-Eclampsia: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2013;8(8).
85. Fuggle NR, Smith TO, Kaul A, Sofat N. Hand to Mouth: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Association between Rheumatoid Arthritis and Periodontitis. *Front Immunol*. 2016;7:80.
86. Daut LD, Musskopf ML, Mendez M, Remonti LLR, Leitão CB, Gross JL, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Braz Oral Res*. 2018;32:e35.
87. Zeng X-T, Leng W-D, Lam Y-Y, Yan BP, Wei X-M, Weng H, et al. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. *Int J Cardiol*. 2016;203:1044-51.
88. Zhu C, Li F, Wong MayChunM, Feng X-P, Lu H-X, Xu W. Association between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. *PLoS ONE*. 2015;10(12).
89. Araújo MM, Martins CC, Costa LCM, Cota LOM, Faria RLAM, Cunha FA, et al. Association between depression and periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016;43(3):216-28.
90. Leira Y, Domínguez C, Seoane J, Seoane-Romero J, Pías-Peleiteiro JM, Takkouche B, et al. Is Periodontal Disease Associated with Alzheimer's Disease? A Systematic Review with Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2017;48(1-2):21-31.
91. Martens L, De Smet S, Yusof MYPM, Rajasekharan S. Association between overweight/obesity and periodontal disease in children and adolescents: a systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent*. 2017;18(2):69-82.
92. Bourgeois DM, Llodra JC, Nordblad A, Pitts NB. Report of the EGOHID I Project. Selecting a coherent set of indicators for monitoring and evaluating oral health in Europe: criteria, methods and results from the EGOHID I project. *Community Dent Health*. 2008;25(1):4-10.
93. Lynch RJM. The primary and mixed dentition, post-eruptive enamel maturation and dental caries: a review. *Int Dent J*. 2013;63:3-13.
94. Gil GS, Morikava FS, Santin GC, Pintarelli TP, Fraiz FC, Ferreira FM. Reliability of self-reported toothbrushing frequency as an indicator for the assessment of oral hygiene in epidemiological research on caries in adolescents: a cross-sectional study. *BMC Med Res Methodol*. 2015;15:14.
95. Levin KA, Currie C. Adolescent toothbrushing and the home environment: sociodemographic factors, family relationships and mealtime routines and disorganisation. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2010;38(1):10-8.
96. Wainwright J, Sheiham A. An analysis of methods of toothbrushing recommended by dental associations, toothpaste and toothbrush companies and in dental texts. *Br Dent J*. 2014;217(3):5.
97. Tsamtouris A, White GE, Clark ER. The effect of instruction and supervised toothbrushing on the reduction of dental plaque in kindergarten children. *ASDC J Dent Child*. 1979;46(3):204-9.

98. Bass CC. An effective method of personal oral hygiene. *J La State Med Soc Off Organ La State Med Soc.* 1954;106(2):57-73.
99. Ganss C, Schlueter N, Preiss S, Klimek J. Tooth brushing habits in uninstructed adults--frequency, technique, duration and force. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):203-8.
100. Charters WJ. Proper home care of the mouth. *J Periodontol.* oct 1948;19(4):136.
101. Stillman, P. R. A philosophy of the treatment of periodontal disease. *Dent Dig.* 1932;38:315-9.
102. Fones A. Mouth hygiene; a text-book for dental hygienists [Internet]. Columbia University Libraries. Lea & Febiger; 1921. 356 p. Disponible sur: <http://archive.org/details/mouthhygienetext00fone>
103. Muller-Bolla M, Courson F. Toothbrushing methods to use in children: a systematic review. *Oral Health Prev Dent.* 2013;11(4):341-7.
104. Poyato-Ferrera M, Segura-Egea JJ, Bullón-Fernández P. Comparison of modified Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal. *Int J Dent Hyg.* 2003;1(2):110-4.
105. Patil SP, Patil PB, Kashetty MV. Effectiveness of different tooth brushing techniques on the removal of dental plaque in 6–8 year old children of Gulbarga. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2014;4(2):113-6.
106. Smutkeeree A, Rojlakkanawong N, Yimcharoen V. A 6-month comparison of toothbrushing efficacy between the horizontal Scrub and modified Bass methods in visually impaired students. *Int J Paediatr Dent.* 2011;21(4):278-83.
107. Janakiram C, Taha F, Joe J. The efficacy of plaque control by various toothbrushing techniques-a systematic review and meta-analysis. *J Clin Diagn Res.* 2018;12.
108. Giri DK. Effectiveness between two tooth brushing methods on removing dental plaque. *J Nobel Med Coll.* 2018;7(1):26-9.
109. Addy M. Plaque control as a scientific basis for the prevention of dental caries. *J R Soc Med.* 1986;79:6-10.
110. Holmes RD. Tooth brushing frequency and risk of new carious lesions. *Evid Based Dent.* 2016;17(4):98-9.
111. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane.* 2003;(1):CD002278.
112. Wendt LK, Hallonsten AL, Koch G, Birkhed D. Oral hygiene in relation to caries development and immigrant status in infants and toddlers. *Scand J Dent Res.* 1994;102(5):269-73.
113. Winter J, Glaser M, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. Association of caries increment in preschool children with nutritional and preventive variables. *Clin Oral Investig.* 2015;19(8):1913-9.
114. Aoun A, Darwiche F, Al Hayek S, Doumit J. The Fluoride Debate: The Pros and Cons of Fluoridation. *Prev Nutr Food Sci.* 2018;23(3):171-80.
115. Choo A, Delac DM, Messer LB. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust Dent J.* 2001;46(3):166-73.
116. Kumar S, Tadakamadla J, Johnson NW. Effect of Toothbrushing Frequency on Incidence and Increment of Dental Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Dent Res.* 2016;95(11):1230-6.
117. Dos Santos APP, de Oliveira BH, Nadanovsky P. A systematic review of the effects of supervised toothbrushing on caries incidence in children and adolescents. *Int J Paediatr Dent.* 2018;28(1):3-11.
118. Santamaria RM, Splieth C. Beneficial effects of supervised toothbrushing on caries incidence in children and adolescents are questioned. *Evid Based Dent.* 2018;19(1):6-7.
119. Manhold J. The Inventor of the BROXO® Oral Health line of products has been Acknowledged by the Dental Profession [Internet]. 2015 [cité 16 oct 2019]. Disponible sur: <https://eu.broxox.com/about-us/inventor>
120. Verma S, Bhat KM. Acceptability of powered toothbrushes for elderly individuals. *J Public Health Dent.* 2004;64(2):115-7.

121. Van der Weijden FA, Slot DE. Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. *J Clin Periodontol*. 2015;42:77-91.
122. Yaacob M, Worthington HV, Deacon SA, Deery C, Walmsley AD, Robinson PG, et al. Powered versus manual toothbrushing for oral health. *Cochrane*. 2014;(6):CD002281.
123. Bain C, Sayed AA, Kaklamanos EG, Kazi HA. Toothbrushing-Should We Advise Mechanical or Power Brushes? Results of an International Delphi Conference. *J Contemp Dent Pract*. 2018;19(10):1169-73.
124. Erbe C, Klees V, Braunbeck F, Ferrari-Peron P, Ccahuana-Vasquez RA, Timm H, et al. Comparative assessment of plaque removal and motivation between a manual toothbrush and an interactive power toothbrush in adolescents with fixed orthodontic appliances: A single-center, examiner-blind randomized controlled trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2019;155(4):462-72.
125. Davidovich E, Ccahuana-Vasquez RA, Timm H, Grender J, Cunningham P, Zini A. Randomised clinical study of plaque removal efficacy of a power toothbrush in a paediatric population. *Int J Paediatr Dent*. 2017;27(6):558-67.
126. Glavind L, Zeuner E. The effectiveness of a rotary electric toothbrush on oral cleanliness in adults. *J Clin Periodontol*. 1986;13(2):135-8.
127. Silverstone LM, Tilliss TS, Cross-Poline GN, Van der Linden E, Stach DJ, Featherstone MJ. A six-week study comparing the efficacy of a rotary electric toothbrush with a conventional toothbrush. *Clin Prev Dent*. 1992;14(2):29-34.
128. Kulkarni P, Singh DK, Jalaluddin M. Comparison of Efficacy of Manual and Powered Toothbrushes in Plaque Control and Gingival Inflammation: A Clinical Study among the Population of East Indian Region. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017;7(4):168-74.
129. Tilliss T, Carey CM. Insufficient Evidence within a Systematic Review and Meta-Analysis of Powered Toothbrushes over Manual Toothbrushes for Soft Tissue Health During Orthodontic Treatment. *J Evid-Based Dent Pract*. 2018;18(2):176-7.
130. Duijster D, de Jong-Lenters M, Verrips E, Van Loveren C. Establishing oral health promoting behaviours in children - parents' views on barriers, facilitators and professional support: a qualitative study. *BMC Oral Health*. 2015;15:157.
131. Maes L, Vereecken C, Vanobbergen J, Honkala S. Tooth brushing and social characteristics of families in 32 countries. *Int Dent J*. 2006;56(3):159-67.
132. Fernandez de Grado G, Ehlinger V, Godeau E, Sentenac M, Arnaud C, Nabet C, et al. Socioeconomic and behavioral determinants of tooth brushing frequency: results from the representative French 2010 HBSC cross-sectional study. *J Public Health Dent*. 2018;78(3):221-30.
133. Scheerman JFM, Van Loveren C, Van Meijel B, Dusseldorp E, Wartewig E, Verrips GHW, et al. Psychosocial correlates of oral hygiene behaviour in people aged 9 to 19 - a systematic review with meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2016;44(4):331-41.
134. Levin KA, Currie C. Inequalities in toothbrushing among adolescents in Scotland 1998-2006. *Health Educ Res*. 2009;24(1):87-97.
135. Jordão LMR, Malta DC, Freire M do CM, Jordão LMR, Malta DC, Freire M do CM. Simultaneous oral health risk behaviors among adolescents: evidence from the National School-based Student Health Survey. *Rev Bras Epidemiol*. 2018;21.
136. Levin K, Nicholls N, Macdonald S, Dundas R, Douglas G. Geographic and socioeconomic variations in adolescent toothbrushing: A multilevel cross-sectional study of 15 year olds in Scotland. *J Public Health Oxf Engl*. 2015;37(1):107-15.
137. Virtanen JI, Muikku T, Similä T, Cinar AB, Pohjola V. Physical activity, BMI and oral health behaviour among adolescents: Finnish School Health Promotion Study. *Eur J Public Health*. 2019;29(2):296-302.
138. Iannotti RJ, Janssen I, Haug E, Kololo H, Annaheim B, Borraccino A, et al. Interrelationships of adolescent physical activity, screen-based sedentary behaviour, and social and psychological health. *Int J Public Health*. 2009;54:191-8.

139. Janssen I, Leblanc AG. Systematic review of the health benefits of physical activity and fitness in school-aged children and youth. *Int J Behav Nutr Phys Act.* 2010;7:40.
140. Elgar FJ, Pfortner T-K, Moor I, De Clercq B, Stevens GWJM, Currie C. Socioeconomic inequalities in adolescent health 2002-2010: a time-series analysis of 34 countries participating in the Health Behaviour in School-aged Children study. *Lancet Lond Engl.* 2015;385(9982):2088-95.
141. Trubey RJ, Moore SC, Chestnutt IG. Children's toothbrushing frequency: the influence of parents' rationale for brushing, habits and family routines. *Caries Res.* 2015;49(2):157-64.
142. Honkala S, Honkala E, Newton T, Rimpelä A. Toothbrushing and smoking among adolescents--aggregation of health damaging behaviours. *J Clin Periodontol.* 2011;38(5):442-8.
143. Hankonen N, Heino MTJ, Kujala E, Hynynen S-T, Absetz P, Araújo-Soares V, et al. What explains the socioeconomic status gap in activity? Educational differences in determinants of physical activity and screentime. *BMC Public Health.* 2017;17(1):144.
144. Cinar B., Murtomaa H. Clustering of obesity and dental health with lifestyle factors among Turkish and Finnish pre-adolescents. *Obes Facts.* 2008;1(4):196-202.
145. Tsevenjav B, Pesonen P, Virtanen JI. Use of snus, its association with smoking and alcohol consumption, and related attitudes among adolescents: the Finnish National School Health Promotion Study. *Tob Induc Dis.* 2015;13.
146. Curtis AM, VanBuren J, Cavanaugh JE, Warren JJ, Marshall TA, Levy SM. Longitudinal Associations between Dental Caries Increment and Risk Factors in Late Childhood and Adolescence. *J Public Health Dent.* 2018;78(4):321-8.
147. Polk DE, Weyant RJ, Manz MC. Socioeconomic factors in adolescents' oral health: are they mediated by oral hygiene behaviors or preventive interventions? *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(1):1-9.
148. Dusseldorp E, Kamphuis M, Schuller A. Impact of lifestyle factors on caries experience in three different age groups: 9, 15, and 21-year-olds. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2015;43(1):9-16.
149. Skinner J, Johnson G, Blinkhorn A, Byun R. Factors associated with dental caries experience and oral health status among New South Wales adolescents. *Aust N Z J Public Health.* 2014;38(5):485-9.
150. Broadbent JM, Zeng J, Foster Page LA, Baker SR, Ramrakha S, Thomson WM. Oral Health-related Beliefs, Behaviors, and Outcomes through the Life Course. *J Dent Res.* 2016;95(7):808-13.
151. Canadian Dental Association. Use of Fluorides in Caries Prevention. 2008;5.
152. HAS. Stratégies de prévention de la carie dentaire [Internet]. 2010. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2010-10/corriges_synthese_carie_dentaire_version_postcollege-10sept2010.pdf
153. ADA. Mouth Healthy: Brushing Your Teeth. [Internet]. Disponible sur: <https://www.mouthhealthy.org/en/az-topics/b/brushing-your-teeth>
154. European Archives of Paediatric Dentistry. Guidelines on the use of fluoride in children: an EAPD policy document. *Eur Arch Paediatr Dent.* 2009;10(3):129-35.
155. Australian Dental Association. Policy Statement 2.2.1 – Community Oral Health Promotion: Fluoride Use. 2019;6.
156. Thornton-Evans G. Use of Toothpaste and Toothbrushing Patterns Among Children and Adolescents — United States, 2013–2016. *MMWR.* 2019;68.
157. AAPD. Caries-risk Assessment and Management for Infants, Children, and Adolescents [Internet]. 2019 [cité 3 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.aapd.org/research/oral-health-policies--recommendations/caries-risk-assessment-and-management-for-infants-children-and-adolescents/>
158. Horowitz HS. The 2001 CDC recommendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. *J Public Health Dent.* 2003;63(1):3-8.
159. O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, et al. Fluoride and Oral Health. *Community Dent Health.* 2016;33(2):69-99.

160. Honkala S, Vereecken C, Niclasen B, Honkala E. Trends in toothbrushing in 20 countries/regions from 1994 to 2010. *Eur J Public Health*. 2015;25:20-3.
161. Obregón-Rodríguez N, Fernández-Riveiro P, Piñeiro-Lamas M, Smyth-Chamosa E, Montes-Martínez A, Suárez-Cunqueiro MM. Prevalence and caries-related risk factors in schoolchildren of 12- and 15-year-old: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2019;19.
162. American Academy of Pediatric Dentistry and American Dental Association. Use of Pit-and-Fissure Sealants [Internet]. 2016. Disponible sur: https://www.aapd.org/media/Policies_Guidelines/G_Sealants.pdf
163. Sreedevi A, Mohamed S. Sealants, Pit and Fissure. StatPearls Publishing. 2019. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK448116/>
164. Carvalho JC, Dige I, Machiulskiene V, Qvist V, Bakhshandeh A, Fatturi-Parolo C, et al. Occlusal Caries: Biological Approach for Its Diagnosis and Management. *Caries Res*. 2016;50(6):527-42.
165. Simonsen RJ. Clinical applications of the acid etch technique. *Quintessence*. 1978:144.
166. British Society of Paediatric Dentistry: a policy document on fissure sealants in paediatric dentistry. *Int J Paediatr Dent*. 2000;10(2):174-7.
167. Rethman J. Trends in preventive care: caries risk assessment and indications for sealants. *J Am Dent Assoc*. 2000;131:8-12.
168. ADA. Use of Pit-and-Fissure Sealants. *Pediatr Dent*. 2017;39(6):156-72.
169. Mejäre I, Lingström P, Petersson LG, Holm A-K, Twetman S, Källestål C, et al. Caries-preventive effect of fissure sealants: a systematic review. *Acta Odontol Scand*. 2003;61(6):321-30.
170. Papageorgiou SN, Dimitraki D, Kotsanos N, Bekes K, van Waes H. Performance of pit and fissure sealants according to tooth characteristics: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017;66:8-17.
171. Wright JT, Crall JJ, Fontana M, Gillette EJ, Nový BB, Dhar V, et al. Evidence-based clinical practice guideline for the use of pit-and-fissure sealants: A report of the American Dental Association and the American Academy of Pediatric Dentistry. *J Am Dent Assoc*. 2016;147(8):672-682.
172. HAS. Appréciation du risque carieux et indications du scellement prophylactique des sillons des premières et deuxième molaires permanentes chez les sujets de moins de 18 ans [Internet]. 2005. Disponible sur: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/Puits_Sillons_rap.pdf
173. Ahovuo-Saloranta A, Forss H, Walsh T, Nordblad A, Mäkelä M, Worthington HV. Pit and fissure sealants for preventing dental decay in permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;7:CD001830.
174. Dye BA, Tan S, Smith V, Lewis BG, Barker LK, Thornton-Evans G, et al. Trends in oral health status: United States, 1988-1994 and 1999-2004. *Vital Health Stat 11*. 2007;(248):1-92.
175. Beltrán-Aguilar ED, Barker LK, Canto MT, Dye BA, Gooch BF, Griffin SO, et al. Surveillance for dental caries, dental sealants, tooth retention, edentulism, and enamel fluorosis--United States, 1988-1994 and 1999-2002. *MMWR*. 2005;54(3):1-43.
176. Oulis CJ, Berdouses ED, Mamai-Homata E, Polychronopoulou A. Prevalence of sealants in relation to dental caries on the permanent molars of 12 and 15-year-old Greek adolescents. A national pathfinder survey. *BMC Public Health*. 2011;11:100.
177. Veiga NJ, Pereira CM, Ferreira PC, Correia IJ. Prevalence of dental caries and fissure sealants in a Portuguese sample of adolescents. *PloS One*. 2015;10(3):e0121299.
178. Freitas CV de, Souza JGS, Mendes DC, Pordeus IA, Jones KM, Martins AME de BL, et al. Need for orthodontic treatment among Brazilian adolescents: evaluation based on public health. *Rev Paul Pediatr*. 2015;33(2):204-10.
179. Silveira MF, Freire RS, Nepomuceno MO, Martins AME de BL, Marcopito LF, Silveira MF, et al. Severity of malocclusion in adolescents: populational-based study in the north of Minas Gerais, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2016;50.

180. Kaur H, Pavithra US, Abraham R. Prevalence of malocclusion among adolescents in South Indian population. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2013;3(2):97-102.
181. Borzabadi-Farahani A, Borzabadi-Farahani A, Eslamipour F. Malocclusion and occlusal traits in an urban Iranian population. An epidemiological study of 11- to 14-year-old children. *Eur J Orthod.* 2009;31(5):477-84.
182. Thilander B, Pena L, Infante C, Parada SS, de Mayorga C. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in children and adolescents in Bogota, Colombia. An epidemiological study related to different stages of dental development. *Eur J Orthod.* 2001;23(2):153-67.
183. Thilander B. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in children and adolescents in Bogota, Colombia. An epidemiological study related to different stages of dental development. *Eur J Orthod.* 2001;23(2):153-68.
184. Sidlauskas A, Lopatiene K. The prevalence of malocclusion among 7-15-year-old Lithuanian schoolchildren. *Med Kaunas Lith.* 2009;45(2):147-52.
185. Germa A, Kaminski M, Nabet C. Impact of social and economic characteristics on orthodontic treatment among children and teenagers in France. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(2):171-9.
186. Onyeaso CO, Isiekwe MC. Occlusal changes from primary to mixed dentitions in Nigerian children. *Angle Orthod.* 2008;78(1):64-9.
187. Kirzioglu Z, Simsek S, Yilmaz Y. Longitudinal occlusal changes during the primary dentition and during the passage from primary dentition to mixed dentition among a group of Turkish children. *Eur Arch Paediatr Dent Off J Eur Acad Paediatr Dent.* 2013;14(2):97-103.
188. Peres KG, Peres MA, Thomson WM, Broadbent J, Hallal PC, Menezes AB. Deciduous-dentition malocclusion predicts orthodontic treatment needs later: findings from a population-based birth cohort study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;147(4):492-8.
189. Chevitaresh ABA, Della Valle D, Moreira TC. Prevalence of malocclusion in 4-6 year old Brazilian children. *J Clin Pediatr Dent.* 2002;27(1):81-5.
190. Klocke A, Nanda RS, Kahl-Nieke B. Anterior open bite in the deciduous dentition: longitudinal follow-up and craniofacial growth considerations. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122(4):353-8.
191. Stahl F, Baccetti T, Franchi L, McNamara JA. Longitudinal growth changes in untreated subjects with Class II Division 1 malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;134(1):125-37.
192. Normando TS, Barroso RFF, Normando D. Influence of the socioeconomic status on the prevalence of malocclusion in the primary dentition. *Dent Press J Orthod.* 2015;20(1):74-8.
193. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31:3-23.
194. Heimer MV, Tornisiello Katz CR, Rosenblatt A. Non-nutritive sucking habits, dental malocclusions, and facial morphology in Brazilian children: a longitudinal study. *Eur J Orthod.* 2008;30(6):580-5.
195. Katz CRT, Rosenblatt A, Gondim PPC. Nonnutritive sucking habits in Brazilian children: effects on deciduous dentition and relationship with facial morphology. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;126(1):53-7.
196. Huang N, Shi Z-D, Wang Z-H, Qin J-C, Chen E, Guo C-L, et al. [The malocclusion of primary dentition in the suburb of Chengdu: a cross-section survey]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi Huaxi Kouqiang Yixue Zazhi West China J Stomatol.* 2005;23(2):173-4.
197. Zhou Z, Liu F, Shen S, Shang L, Shang L, Wang X. Prevalence of and factors affecting malocclusion in primary dentition among children in Xi'an, China. *BMC Oral Health.* 2016;16(1).
198. Seehra J, Fleming PS, Newton T, DiBiase AT. Bullying in orthodontic patients and its relationship to malocclusion, self-esteem and oral health-related quality of life. *J Orthod.* 2011;38(4):247-56.

199. Perillo L, Esposito M, Caprioglio A, Attanasio S, Santini AC, Carotenuto M. Orthodontic treatment need for adolescents in the Campania region: the malocclusion impact on self-concept. *Patient Prefer Adherence*. 2014;8:353-9.
200. Taibah SM, Al-Hummayani FM. Effect of malocclusion on the self-esteem of adolescents. *J Orthod Sci*. 2017;6(4):123-8.
201. Singh A, Purohit B, Sequeira P, Acharya S, Bhat M. Malocclusion and orthodontic treatment need measured by the dental aesthetic index and its association with dental caries in Indian schoolchildren. *Community Dent Health*. 2011;28(4):313-6.
202. Baskaradoss JK, Geevarghese A, Roger C, Thaliath A. Prevalence of malocclusion and its relationship with caries among school children aged 11 - 15 years in southern India. *Korean J Orthod*. 2013;43(1):35-41.
203. Gaikwad SS, Gheware A, Kamatagi L, Pasumarthy S, Pawar V, Fatangare M. Dental Caries and its Relationship to Malocclusion in Permanent Dentition Among 12-15 Year Old School Going Children. *J Int Oral Health*. 2014;6(5):27-30.
204. McKernan SC, Kuthy RA, Momany ET, McQuistan MR, Hanley PF, Jones MP, et al. Geographic accessibility and utilization of orthodontic services among Medicaid children and adolescents. *J Public Health Dent*. 2013;73(1):56-64.
205. Merritt JM, Greenlee G, Bollen AM, Scott JM, Chi DL. Racial Disparities in Orthodontic Service Utilization for Medicaid-Enrolled Children: An Evaluation of the Washington Medicaid Program. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016;149(4):516-22.
206. Minick G, Tilliss T, Shellhart WC, Newman SM, Carey CM, Horne A, et al. Comparison of Orthodontic Medicaid Funding in the United States 2006 to 2015. *Front Public Health*. 2017;5.
207. Zakirulla M. Prevalence of first permanent molar caries among 7-10 years old school going boys in Abha City, Saudi Arabia. *Bangladesh J Med Sci*. 2012;11(2).
208. Shyam R, Manjunath BC, Kumar A, Narang R, Goyal A, Piplani A. Assessment of Dental Caries Spectrum among 11 to 14-Year-Old School Going Children in India. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(6):78-81.
209. Wyne AH. The bilateral occurrence of dental caries among 12-13 and 15-19 year old school children. *J Contemp Dent Pract*. 2004;5(1):42-52.
210. Batawi HE, Fakhruddin KS. Patterns of dental caries among school children assessed using Caries Assessment Spectrum and Treatment tool. *Eur J Dent*. 2017;11(2):168-73.
211. McDonald SP, Sheiham A. The distribution of caries on different tooth surfaces at varying levels of caries--a compilation of data from 18 previous studies. *Community Dent Health*. 1992;9(1):39-48.
212. Broffitt B, Levy SM, Warren J, Cavanaugh JE. Factors associated with surface-level caries incidence in children aged 9 to 13: the Iowa Fluoride Study. *J Public Health Dent*. 2013;73(4):304-10.
213. Momeni A, Mardi M, Pieper K. Caries prevalence and treatment needs of 12-year-old children in the Islamic Republic of Iran. *Med Princ Pract Int J Kuwait Univ Health Sci Cent*. 2006;15(1):24-8.
214. Al-Samadani KHM, Ahmad MS. Prevalence of first permanent molar caries in and its relationship to the dental knowledge of 9-12-year olds from jeddah, kingdom of saudi arabia. *ISRN Dent*. 2012;2012:391068.
215. Ekstrand KR, Ricketts DN, Kidd EA. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. *Dent Update*. 2001;28(8):380-7.
216. Carlos JP, Gittelsohn AM. Longitudinal studies of the natural history of caries. II. A life-table study of caries incidence in the permanent teeth. *Arch Oral Biol*. 1965;10(5):739-51.
217. Hannigan A, O'Mullane DM, Barry D, Schäfer F, Roberts AJ. A caries susceptibility classification of tooth surfaces by survival time. *Caries Res*. 2000;34(2):103-8.
218. Batchelor PA, Sheiham A. Grouping of tooth surfaces by susceptibility to caries: a study in 5-16 year-old children. *BMC Oral Health*. 2004;4(1):2.

219. Warnakulasuriya S. Caries susceptibility of first permanent molars and treatment needs in Sri Lankan children, aged 13-16 years, in 1986. *Community Dent Health*. 1991;8(2):167-72.
220. Macek MD, Beltrán-Aguilar ED, Lockwood SA, Malvitz DM. Updated comparison of the caries susceptibility of various morphological types of permanent teeth. *J Public Health Dent*. 2003;63(3):174-82.
221. Bhardwaj VK. Dental caries prevalence in individual tooth in primary and permanent dentition among 6-12-year-old school children in Shimla, Himachal Pradesh. *Int J Health Allied Sci*. 2014;3(2):125.
222. Nazir M, Al-Ansari A, Al-Khalifa K, Bakhrji E. First permanent molar caries and its association with carious lesions in other permanent teeth. 2018;13(1):36-9.
223. Noronha JC, Massara M de L, Souki BQ, Nogueira AP. First permanent molar: first indicator of dental caries activity in initial mixed dentition. *Braz Dent J*. 1999;10(2):99-104.
224. Warren RL, Freeman DJ, Pleasance S, Watson P, Moore RA, Cochrane K, et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas. *Microbiome*. 2013;1(1):16.
225. King NM, Shaw L, Murray JJ. Caries susceptibility of permanent first and second molars in children aged 5-15 years. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1980;8(3):151-8.
226. Dean HT. Fluoride and Dental Health [Internet]. 1942 [cité 16 oct 2019]. Disponible sur: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Fluoride+and+Dental+Health&author=HT+Dean&publication_year=1942&
227. Chirani RA, Foray H. Fluorose dentaire : diagnostic étiologique. *Arch Pediatr*. 2005;12(3):284-7.
228. Wiener RC, Shen C, Findley P, Tan X, Sambamoorthi U. Dental Fluorosis over Time: A comparison of National Health and Nutrition Examination Survey data from 2001–2002 and 2011–2012. *J Dent Hyg*. 2018;92(1):23-9.
229. CDC. Community Water Fluoridation [Internet]. 2014 [cité 21 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.cdc.gov/fluoridation/index.html>
230. Tavener JA, Davies GM, Davies RM, Ellwood RP. The prevalence and severity of fluorosis in children who received toothpaste containing either 440 or 1,450 ppm F from the age of 12 months in deprived and less deprived communities. *Caries Res*. 2006;40(1):66-72.
231. Tabari ED, Ellwood R, Rugg-Gunn AJ, Evans DJ, Davies RM. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. *Br Dent J*. 2000;189(4):216-20.
232. Conway DI, MacPherson LMD, Stephen KW, Gilmour WH, Petersson LG. Prevalence of dental fluorosis in children from non-water-fluoridated Halmstad, Sweden: fluoride toothpaste use in infancy. *Acta Odontol Scand*. 2005;63(1):56-63.
233. Angulo M, Cuitiño E, Molina-Frechero N, Emilson C-G. The association between the prevalence of dental fluorosis and the socio-economic status and area of residence of 12-year-old students in Uruguay. *Acta Odontol Scand*. 2019;1-5.
234. Vallejos-Sánchez AA, Medina-Solís CE, Maupomé G, Casanova-Rosado JF, Minaya-Sánchez M, Villalobos-Rodelo JJ, et al. Sociobehavioral factors influencing toothbrushing frequency among schoolchildren. *J Am Dent Assoc*. 2008;139(6):743-9.
235. Szabo K, Piko BF, Fitzpatrick KM. Adolescents' attitudes towards healthy eating: The role of self-control, motives and self-risk perception. *Appetite*. 2019;143:104416.
236. Austregésilo SC, de Goes PSA, de Sena Júnior MR, Pazos CTC. Clustering of oral and general health risk behaviors among adolescents. *Prev Med Rep*. 2019;15.
237. Lipsky LM, Nansel TR, Haynie DL, Liu D, Li K, Pratt CA, et al. Diet quality of US adolescents during the transition to adulthood: changes and predictors. *Am J Clin Nutr*. 2017;105(6):1424-32.
238. Keats E, Rappaport A, Jain R, Oh C, Shah S, Bhutta Z. Diet and Eating Practices among Adolescent Girls in Low-

- and Middle-Income Countries: A Systemic Review [Internet]. 2008 [cité 10 oct 2019]. Disponible sur: https://www.spring-nutrition.org/sites/default/files/publications/reports/spring_diet_eating_adol_girls_lmhc.pdf
239. Nurul-Fadhilah A, Teo PS, Huybrechts I, Foo LH. Infrequent breakfast consumption is associated with higher body adiposity and abdominal obesity in Malaysian school-aged adolescents. *PloS One*. 2013;8(3):e59297.
 240. Naja F, Hwalla N, Itani L, Karam S, Sibai AM, Nasreddine L. A Western dietary pattern is associated with overweight and obesity in a national sample of Lebanese adolescents (13-19 years): a cross-sectional study. *Br J Nutr*. 2015;114(11):1909-19.
 241. Gonzalez-Suarez CB, Lee-Pineda K, Caralipio ND, Grimmer-Somers K, Sibug EO, Velasco ZF. Is what Filipino children eat between meals associated with body mass index? *Asia Pac J Public Health*. 2015;27(2):650-61.
 242. Azadbakht L, Hajishafiee M, Golshahi J, Esmailzadeh A. Snacking Behavior and Obesity among Female Adolescents in Isfahan, Iran. *J Am Coll Nutr*. 2016;35(5):405-12.
 243. Dong H, Yan Y, Liu J, Zhao X, Cheng H, Hou D, et al. Alarming trends in ideal cardiovascular health among children and adolescents in Beijing, China, 2004 to 2014. *Int J Cardiol*. 2017;231:264-70.
 244. French SA, Lin B-H, Guthrie JF. National trends in soft drink consumption among children and adolescents age 6 to 17 years: prevalence, amounts, and sources, 1977/1978 to 1994/1998. *J Am Diet Assoc*. 2003;103(10):1326-31.
 245. Ronquest-Ross L-C, Vink N, Sigge G. Food consumption changes in South Africa since 1994. *South Afr J Sci*. 2015;111.
 246. Verzeletti C, Maes L, Santinello M, Vereecken CA. Soft drink consumption in adolescence: associations with food-related lifestyles and family rules in Belgium Flanders and the Veneto Region of Italy. *Eur J Public Health*. 2010;20(3):312-7.
 247. Vereecken CA, Inchley J, Subramanian SV, Hublet A, Maes L. The relative influence of individual and contextual socio-economic status on consumption of fruit and soft drinks among adolescents in Europe. *Eur J Public Health*. 2005;15(3):224-32.
 248. Bere E, Glomnes ES, te Velde SJ, Klepp K-I. Determinants of adolescents' soft drink consumption. *Public Health Nutr*. 2008;11(1):49-56.
 249. Noll PR e S, Noll M, Abreu LC de, Baracat EC, Silveira EA, Sorpreso ICE. Ultra-processed food consumption by Brazilian adolescents in cafeterias and school meals. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-8.
 250. Adebimpe WO. Prevalence and knowledge of risk factors of childhood obesity among school-going children in Osogbo, south-western Nigeria. *Malawi Med J*. 2019;31(1):19-24.
 251. Park S, Pan L, Sherry B, Blanck HM. Consumption of Sugar-Sweetened Beverages Among US Adults in 6 States: Behavioral Risk Factor Surveillance System, 2011. *Prev Chronic Dis*. 2014;11.
 252. Barrett P, Imamura F, Brage S, Griffin SJ, Wareham NJ, Forouhi NG. Socio-demographic, lifestyle and behavioural factors associated with consumption of sweetened beverages among adults in Cambridgeshire, UK –the Fenland Study. *Public Health Nutr*. 2017;20(15):2766-77.
 253. French S, Rosenberg M, Wood L, Maitland C, Shilton T, Pratt IS, et al. Soft drink consumption patterns among Western Australians. *J Nutr Educ Behav*. 2013;45(6):525-32.
 254. Pearson N, Atkin AJ, Biddle SJ, Gorely T, Edwardson C. Patterns of adolescent physical activity and dietary behaviours. *Int J Behav Nutr Phys Act*. 2009;6:45.
 255. Austregésilo SC, de Goes PSA, de Sena Júnior MR, Pazos CTC. Clustering of oral and general health risk behaviors among adolescents. *Prev Med Rep*. sept 2019;15:100936.
 256. Ottevaere C, Huybrechts I, Benser J, De Bourdeaudhuij I, Cuenca-Garcia M, Dallongeville J, et al. Clustering patterns of physical activity, sedentary and dietary behavior among European adolescents: The HELENA study. *BMC Public Health*. 2011;11:328.
 257. INSERM. Obésité : Dépistage et prévention chez l'enfant. Synthèse et recommandations. [Internet]. Les éditions

- Inserm; 2000 [cité 6 nov 2019]. Disponible sur: <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/188>
258. Gupta S, Mishra P, Nagarajappa S, Kumar S, Lalani A. Prevalence of Tobacco and associated risk factors among university law students in Indore City. *Indian J Dent Res.* 2019;30(1):10-4.
259. Chaffee BW, Jacob P, Couch ET, Benowitz NL. Exposure to a Tobacco-Specific Carcinogen Among Adolescent Smokeless Tobacco Users in Rural California, United States. *Nicotine Tob Res.* 2019.
260. Akinkugbe AA. Cigarettes, E-cigarettes, and Adolescents' Oral Health: Findings from the Population Assessment of Tobacco and Health (PATH) Study. *JDR Clin Trans Res.* 2019;4(3):276-83.
261. Harvey J, Chadi N. Preventing smoking in children and adolescents: Recommendations for practice and policy. *Paediatr Child Health.* 2016;21(4):209-14.
262. Janeswar A, Kumar G, Kanungo S, Singh A, Subramanya GB, Jha K. Prevalence patterns and profile of adolescent tobacco users findings from a youth survey: A cross-sectional study. *J Fam Med Prim Care.* 2019;8(6):2017-22.
263. HBSC. Growing up unequal: gender and socioeconomic differences in young people's health and well-being. [Internet]. 2013. Disponible sur: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/303438/HSBC-No.7-Growing-up-unequal-Full-Report.pdf?ua=1
264. Cohen B, Evers S, Manske S, Bercovitz K, Edward HG. Smoking, physical activity and breakfast consumption among secondary school students in a southwestern Ontario community. *Can J Public Health.* 2003;94(1):41-4.
265. Santé publique France. Bulletin de santé publique tabac dans les Hauts-de-France. Janvier 2019. [Internet]. 2019 [cité 24 sept 2019]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/hauts-de-france/documents/bulletin-regional/2019/bulletin-de-sante-publique-tabac-dans-les-hauts-de-france.-janvier-2019>
266. OFDT. Tabagisme et paquet de cigarettes : opinions des adolescents de 17 ans. [Internet]. 2018 [cité 6 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.ofdt.fr/publications/collections/periodiques/lettre-tendances/tabagisme-et-paquet-de-cigarettes-opinions-des-adolescents-de-17-ans-tendances-125-mai-2018/>
267. OFDT. Usages d'alcool, de tabac et de cannabis chez les adolescents du secondaire en 2018. [Internet]. 2019 [cité 6 nov 2019]. Disponible sur: <https://www.ofdt.fr/publications/collections/periodiques/lettre-tendances/usages-dalcool-de-tabac-et-de-cannabis-chez-les-adolescents-du-secondaire-en-2018-tendances-132-juin-2019/>
268. Walker JF, Loprinzi PD. Longitudinal examination of predictors of smoking cessation in a national sample of U.S. adolescent and young adult smokers. *Off J Soc Res Nicotine Tob.* 2014;16(6):820-7.
269. Observatoire régional de la santé. Recours au cabinet dentaire des enfants et des adolescents. [Internet]. 2018 [cité 6 nov 2019]. Disponible sur: http://www.crespaca.org/arkotheque/client/crespaca/thematiques/detail_document.php?ref=29495&titre=recours-au-cabinet-dentaire-des-enfants-et-des-adolescents
270. Harford JE, Luzzi L, Australian Institute of Health and Welfare, Dental Statistics and Research Unit. Child and teenager oral health and dental visiting: results from the National Dental Telephone Interview Survey 2010 [Internet]. 2013 [cité 2 oct 2019]. Disponible sur: <http://www.aihw.gov.au/publication-detail/?id=60129543621>
271. Mika A, Mitus-Kenig M, Zeglen A, Drapella-Gasior D, Rutkowska K, Josko-Ochojska J. The child's first dental visit. Age, reasons, oral health status and dental treatment needs among children in Southern Poland. *Eur J Paediatr Dent.* 2018;19(4):265-70.
272. Olatosi OO, Onyejaka NK, Oyapero A, Ashaolu JF, Abe A. Age and reasons for first dental visit among children in Lagos, Nigeria. *Niger Postgrad Med J.* 2019;26(3):158-63.
273. Nazir MA. Patterns of dental visits and their predictors among male adolescents. *Dent Med Probl.* 2018;55(2):185-90.
274. Romaine MA, Bell JF, Huebner CE. Variations in children's dental service use based on four national health surveys. *Pediatrics.* 2012;130(5):1182-9.

275. Fägerstad A, Windahl J, Arnrup K. Understanding avoidance and non-attendance among adolescents in dental care - an integrative review. *Community Dent Health*. 2016;33(3):195-207.
276. Lopez R, Baelum V. Factors associated with dental attendance among adolescents in Santiago, Chile. *BMC Oral Health*. 2007;7(1):4.
277. Peres KG, Peres MA, Boing AF, Bertoldi AD, Bastos JL, Barros AJD. Reduction of social inequalities in utilization of dental care in Brazil from 1998 to 2008. *Rev Saude Publica*. 2012;46(2):250-8.
278. da Fonseca EP, Frias AC, Mialhe FL, Pereira AC, Meneghim M de C. Factors associated with last dental visit or not to visit the dentist by Brazilian adolescents: A population-based study. *PLoS ONE*. 2017;12(8).
279. GBD 2016. Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390:1211-59.
280. Rozier RG, White BA, Slade GD. Trends in Oral Diseases in the U.S. Population. *J Dent Educ*. 2017;81(8):97-109.
281. Capurro DA, Iafolla T, Kingman A, Chattopadhyay A, Garcia I. Trends in income-related inequality in untreated caries among children in the United States: findings from NHANES I, NHANES III, and NHANES 1999-2004. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2015;43(6):500-10.
282. National Health and Nutrition Examination Survey. Prevalence* of Untreated Dental Caries†in Permanent Teeth Among Children and Adolescents Aged 6–19 Years, by Age Group — United States, 2011–2014. *MMWR*. 2017;66(1):36.
283. DREES. L'état de santé de la population en France. [Internet]. 2011 [cité 1 oct 2019]. Disponible sur: <https://drees.solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/esp2017.pdf>
284. Bratthall D. Estimation of global DMFT for 12-year-olds in 2004. *Int Dent J*. 2005;55(6):370-2.
285. Murray Thomson W. Epidemiology of oral health conditions in older people. *Gerodontology*. 2014;31:9-16.
286. Vano M, Gennai S, Karapetsa D, Miceli M, Giuca MR, Gabriele M, et al. The influence of educational level and oral hygiene behaviours on DMFT index and CPITN index in an adult Italian population: an epidemiological study. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):151-7.
287. Kamate WI, Vibhute NA, Baad RK. Estimation of DMFT, Salivary Streptococcus Mutans Count, Flow Rate, Ph, and Salivary Total Calcium Content in Pregnant and Non-Pregnant Women: A Prospective Study. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2017;11(4):147-51.
288. Prasai Dixit L, Shakya A, Shrestha M, Shrestha A. Dental caries prevalence, oral health knowledge and practice among indigenous Chepang school children of Nepal. *BMC Oral Health*. 2013;13(1):20.
289. Bánóczy J, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, éditeurs. Milk fluoridation for the prevention of dental caries. Geneva: World Health Organization; 2009. 186 p. [Internet]. Disponible sur: https://www.who.int/oral_health/publications/milk_fluoridation_2009_en.pdf
290. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31:3-23.
291. Gushi LL, Soares M da C, Forni TTB, Vieira V, Wada RS, de Sousa M da LR. [Dental caries in 15-to-19-year-old adolescents in São Paulo State, Brazil, 2002]. *Cad Saude Publica*. 2005;21(5):1383-91.
292. Rebelo MAB, Lopes MC, Vieira JMR, Parente RCP. Dental caries and gingivitis among 15 to 19 year-old students in Manaus, AM, Brazil. *Braz Oral Res*. 2009;23(3):248-54.
293. Birkeland JM, Haugejorden O, von der Fehr FR. Analyses of the caries decline and incidence among Norwegian adolescents 1985-2000. *Acta Odontol Scand*. 2002;60(5):281-9.
294. Žemaitienė M, Grigaluskienė R, Vasiliauskienė I, Saldūnaitė K, Razmienė J, Slabšinskienė E. Prevalence and severity of dental caries among 18-year-old Lithuanian adolescents. *Medicina (Mex)*. 2016;52(1):54-60.
295. Teixeira C, Castellanos F. Dental caries prevalence of schoolchildren of 12 and 15 years old in Salvador, Bahia,

2001. *Rev Bras Saúde Materno Infant.* 2004;4:287-97.
296. Gomes PR, Costa SC, Cypriano S, Sousa M da LR de. Dental caries in Paulínia, São Paulo State, Brazil, and WHO goals for 2000 and 2010. *Cad Saúde Pública.* 2004;20(3):866-70.
297. Skinner J, Johnson G, Phelan C, Blinkhorn A. Dental caries in 14- and 15-year-olds in New South Wales, Australia. *BMC Public Health.* 2013;13(1):1060.
298. de Amorim RG, Figueiredo MJ, Leal SC, Mulder J, Frencken JE. Caries experience in a child population in a deprived area of Brazil, using ICDAS II. *Clin Oral Investig.* 2012;16(2):513-20.
299. Cadavid AS, Lince CMA, Jaramillo MC. Dental caries in the primary dentition of a Colombian population according to the ICDAS criteria. *Braz Oral Res.* 2010;24(2):211-6.
300. Agustsdottir H, Gudmundsdottir H, Eggertsson H, Jonsson SH, Gudlaugsson JO, Saemundsson SR, et al. Caries prevalence of permanent teeth: a national survey of children in Iceland using ICDAS. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(4):299-309.
301. Reisine S, Tellez M, Willem J, Sohn W, Ismail A. Relationship between caregiver's and child's caries prevalence among disadvantaged African Americans. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36(3):191-200.
302. Bonner BC, Bourgeois DM, Douglas GV, Chan K, Pitts NB. The feasibility of data collection in dental practices, using codes for the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS), to allow European general dental practitioners to monitor dental caries at local, national, and international levels. *Prim Dent Care.* 2011;18(2):83-90.
303. Solis-Riggioni A, Gallardo-Barquero C, Chavarria-Bolaños D. Prevalence and Severity of Dental Caries in Foster-Care Children and Adolescents. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42(4):269-72.
304. Pitts NB, Ekstrand KR, ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):41-52.
305. Almerich-Silla JM, Boronat-Ferrer T, Montiel-Company JM, Iranzo-Cortés JE. Caries prevalence in children from Valencia (Spain) using ICDAS II criteria, 2010. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2014;19(6):574-80.
306. Kühnisch J, Berger S, Goddon I, Senkel H, Pitts N, Heinrich-Weltzien R. Occlusal caries detection in permanent molars according to WHO basic methods, ICDAS II and laser fluorescence measurements. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2008;36(6):475-84.
307. Jordão LMR, Vasconcelos DN, Moreira R da S, Freire M do CM. Individual and Contextual Determinants of Periodontal Health in 12-Year-Old Schoolchildren in a Brazilian Capital City. *Int J Dent.* 2012;2012:325475.
308. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Clin Periodontol.* 2018;45:44-67.
309. Califano JV, American Academy of Periodontology--Research, Science and Therapy Committee, American Academy of Pediatric Dentistry. Periodontal diseases of children and adolescents. *Pediatr Dent.* 2006-2005;27:189-96.
310. Das UM, Vadakkekuttikal RJ, Kanakkath H, Shankunni SP. Dental health awareness, attitude, and dental health-care seeking practices as risk indicators for the prevalence of periodontal disease among 15-17-year-old school children in Kozhikode district, Kerala, India. *J Indian Soc Periodontol.* 2017;21(2):144-51.
311. Koga R, Herkrath APC de Q, Vettore MV, Herkrath FJ, Vieira JMR, Pereira JV, et al. The role of socioeconomic status and psychosocial factors on gingivitis in socially disadvantaged adolescents. *J Periodontol.* 2019.
312. Albandar JM, Muranga MB, Rams TE. Prevalence of aggressive periodontitis in school attendees in Uganda. *J Clin Periodontol.* 2002;29(9):823-31.
313. Albandar JM, Brown LJ, Brunelle JA, Loe H. Gingival state and dental calculus in early-onset periodontitis. *J Periodontol.* 1996;67(10):953-9.

314. Elias-Boneta AR, Ramirez K, Rivas-Tumanyan S, Murillo M, Toro MJ. Prevalence of gingivitis and calculus in 12-year-old Puerto Ricans: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2018;18.
315. Zhang S, Xu B, Liu J, Lo EC, Chu C-H. Dental and periodontal status of 12-year-old Dai school children in Yunnan Province, China: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):117.
316. Ericsson JS, Abrahamsson KH, Ostberg A-L, Hellström M-K, Jönsson K, Wennström JL. Periodontal health status in Swedish adolescents: an epidemiological, cross-sectional study. *Swed Dent J*. 2009;33(3):131-9.
317. Chrysanthakopoulos NA. Prevalence of gingivitis and associated factors in 13-16-year-old adolescents in Greece. *Eur J Gen Dent*. 2016;5(2):58.
318. Broadbent JM, Thomson WM, Boyens JV, Poulton R. Dental plaque and oral health during the first 32 years of life. *J Am Dent Assoc* 1939. 2011;142(4):415-26.
319. Pari A, Ilango P, Subbareddy V, Katamreddy V, Parthasarthy H. Gingival Diseases in Childhood – A Review. *J Clin Diagn Res JCDR*. 2014;8(10):1-4.
320. Gjermo P, Rösing CK, Susin C, Oppermann R. Periodontal diseases in Central and South America. *Periodontol* 2000. 2002;29:70-8.
321. Albandar JM, Rams TE. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol* 2000. 2002;29:7-10.
322. Margaritis V, Mamai-Homata E, Koletsi-Kounari H, Polychronopoulou A. Evaluation of three different scoring systems for dental erosion: a comparative study in adolescents. *J Dent*. 2011;39(1):88-93.
323. Alvarez Loureiro L, Fabruccini Fager A, Alves LS, Alvarez Vaz R, Maltz M. Erosive tooth wear among 12-year-old schoolchildren: a population-based cross-sectional study in Montevideo, Uruguay. *Caries Res*. 2015;49(3):216-25.
324. Mohd Nor H, Harun NA. Conservative Management of Dental Erosion in Adolescents with Medical Conditions. *Case Rep Dent*. 2018.
325. Kanzow P, Wegehaupt FJ, Attin T, Wiegand A. Etiology and pathogenesis of dental erosion. *Quintessence Int Berl Ger* 1985. 2016;47(4):275-8.
326. Hermont AP, Oliveira PAD, Martins CC, Paiva SM, Pordeus IA, Auad SM. Tooth Erosion and Eating Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 2014;9(11).
327. Scaramucci T, Hara AT, Zero DT, Ferreira SS, Aoki IV, Sobral MAP. In vitro evaluation of the erosive potential of orange juice modified by food additives in enamel and dentine. *J Dent*. 2011;39(12):841-8.
328. Huysmans MCDNJM, Chew HP, Ellwood RP. Clinical studies of dental erosion and erosive wear. *Caries Res*. 2011;45:60-8.
329. Mulic A, Tveit AB, Songe D, Sivertsen H, Skaare AB. Dental erosive wear and salivary flow rate in physically active young adults. *BMC Oral Health*. 2012;12:8.
330. Salas MMS, Nascimento GG, Huysmans MC, Demarco FF. Estimated prevalence of erosive tooth wear in permanent teeth of children and adolescents: an epidemiological systematic review and meta-regression analysis. *J Dent*. 2015;43(1):42-50.
331. Muller-Bolla M, Courson F, Smail-Faugeron V, Bernardin T, Lupi-Pégurier L. Dental erosion in French adolescents. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):147.
332. Hasselkvist A, Johansson A, Johansson A-K. Association between soft drink consumption, oral health and some lifestyle factors in Swedish adolescents. *Acta Odontol Scand*. 2014;72(8):1039-46.
333. Al-Dlaigan YH, Al-Meedania LA, Anil S. The influence of frequently consumed beverages and snacks on dental erosion among preschool children in Saudi Arabia. *Nutr J*. 2017;16.
334. Suneja E, Suneja B, Tandon B, Philip N. An overview of caries risk assessment: Rationale, risk indicators, risk assessment methods, and risk-based caries management protocols. *Indian J Dent Sci*. 2017;9:210.

335. Australian Research Centre for Population Oral Health. Caries Risk Assessment for Children: Information for Oral Health Practitioners [Internet]. 2015. Disponible sur: https://www.adelaide.edu.au/arcpoh/dperu/special/cra/CRA_Professional_Brochure.pdf
336. American Dental Association. Guidance on caries risk assessment in children. [Internet]. 2018. Disponible sur: https://www.ada.org/~media/ADA/DQA/CRA_Report.pdf?la=en
337. Tagliaferro EP da S, Pereira AC, Meneghim M de C, Ambrosano GMB. Assessment of dental caries predictors in a seven-year longitudinal study. *J Public Health Dent.* 2006;66(3):169-73.
338. Tagliaferro EP da S, Ambrosano GMB, Meneghim M de C, Pereira AC. Risk indicators and risk predictors of dental caries in schoolchildren. *J Appl Oral Sci Rev FOB.* 2008;16(6):408-13.
339. Warren JJ, Weber-Gasparoni K, Marshall TA, Drake DR, Dehkordi-Vakil F, Dawson DV, et al. A longitudinal study of dental caries risk among very young low SES children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2009;37(2):116-22.
340. Ditmyer M, Dounis G, Mobley C, Schwarz E. A case-control study of determinants for high and low dental caries prevalence in Nevada youth. *BMC Oral Health.* 2010;10:24.
341. Burt BA, Eklund SA, Ismail AI. *Dentistry, Dental Practice, and the Community.* 6th éd. Saunders; 2005. 440 p. (Elsevier-Masson).
342. Källestål C, Wall S. Socio-economic effect on caries. Incidence data among Swedish 12-14-year-olds. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002;30(2):108-14.
343. Al Agili DE, Griffin SO. Effect of Family Income on the Relationship Between Parental Education and Sealant Prevalence, National Health and Nutrition Examination Survey, 2005-2010. *Prev Chronic Dis.* 2015;12:E138.
344. Polk DE, Weyant RJ, Manz MC. Socioeconomic factors in adolescents' oral health: are they mediated by oral hygiene behaviors or preventive interventions? *Community Dent Oral Epidemiol.* 2010;38(1):1-9.
345. Rindal DB, Rush WA, Perrin NA, Maupomé G, Bader JD. Outcomes associated with dentists' risk assessment. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006;34(5):381-6.
346. Schwendicke F, Paris S, Stolpe M. Detection and treatment of proximal caries lesions: Milieu-specific cost-effectiveness analysis. *J Dent.* juin 2015;43(6):647-55.
347. Van Loveren C. Sugar Restriction for Caries Prevention: Amount and Frequency. Which Is More Important? *Caries Res.* 2019;53(2):168-75.
348. WHO. Guideline: sugars intake for adults and children [Internet]. World Health Organization; 2015 [cité 8 nov 2019]. Disponible sur: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/149782>
349. Hu J, Jiang W, Lin X, Zhu H, Zhou N, Chen Y, et al. Dental Caries Status and Caries Risk Factors in Students Ages 12-14 Years in Zhejiang, China. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2018;24:3670-8.
350. Puri S, Vasthare R, Munoli R. The Impact of Sibling Behavior on Oral Health: A Narrative Review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2019;9(2):106-11.
351. Toi C.S. C-JPE Mogodiri R. Mutans streptococci and lactobacilli on healthy and carious teeth in the same mouth of children with and without dental caries. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;12(1):35-41.
352. Wen ZT, Liao S, Bitoun JP, De A, Jorgensen A, Feng S, et al. Streptococcus mutans Displays Altered Stress Responses While Enhancing Biofilm Formation by Lactobacillus casei in Mixed-Species Consortium. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7.
353. Xu H, Tian J, Hao W, Zhang Q, Zhou Q, Shi W, et al. Oral Microbiome Shifts From Caries-Free to Caries-Affected Status in 3-Year-Old Chinese Children: A Longitudinal Study. *Front Microbiol.* 2018;9:2009.
354. Thaweboon S, Thaweboon B, Nakornchai S, Jitmaitree S. Salivary secretory IgA, pH, flow rates, mutans streptococci and Candida in children with rampant caries. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* sept 2008;39(5):893-9.
355. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries

risk assessment. *Int J Oral Sci.* nov 2017;9(11).

356. Niklander S, Veas L, Barrera C, Fuentes F, Chiappini G, Marshall M, et al. Risk factors, hyposalivation and impact of xerostomia on oral health-related quality of life. *Braz Oral Res.* 2017;31.
357. Yeung CA. A systematic review of the efficacy and safety of fluoridation. *Evid Based Dent.* 2008;9(2):39-43.
358. Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(7):CD002279.
359. American Dental Association. Caries Risk Assessment and Management [Internet]. 2018 [cité 29 oct 2019]. Disponible sur: <https://www.ada.org/en/member-center/oral-health-topics/caries-risk-assessment-and-management>
360. Young DA, Featherstone JDB, Roth JR. Curing the silent epidemic: caries management in the 21st century and beyond. *J Calif Dent Assoc.* 2007;35(10):681-5.
361. Bratthall D, Hänsel Petersson G. Cariogram--a multifactorial risk assessment model for a multifactorial disease. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):256-64.
362. American Dental Association Councils on Scientific Affairs and Dental Practice. Caries Risk Assessment Form (Ages 0-6). Chicago, Ill: American Dental Association [Internet]. 2008; Disponible sur: http://www.ada.org/sections/professionalResources/docs/topics_caries_under6.doc
363. American Dental Association Councils on Scientific Affairs and Dental Practice. Caries Risk Assessment Form (Age >6). Chicago, Ill: American Dental Association [Internet]. 2008; Disponible sur: http://www.ada.org/sections/professionalResources/docs/topics_caries_over6.doc
364. American Academy of Pediatric Dentistry. The use of a caries-risk assessment tool (CAT) for infants, children and adolescents. *Pediatr Dent.* 2002;24:15-7.
365. American Academy of Pediatric Dentistry. Caries-risk Assessment and Management for Infants, Children, and Adolescents. *Recomm Best Pract.* 2014;40:205-12.
366. Ramos-Gomez FJ, Crall J, Gansky SA, Slayton RL, Featherstone JDB. Caries risk assessment appropriate for the age 1 visit (infants and toddlers). *J Calif Dent Assoc.* 2007;35(10):687-702.
367. Featherstone JDB, Domejean-Orliaguet S, Jenson L, Wolff M, Young DA. Caries risk assessment in practice for age 6 through adult. *J Calif Dent Assoc.* 2007;35(10):703-13.
368. Featherstone JDB. The caries balance: the basis for caries management by risk assessment. *Oral Health Prev Dent.* 2004;2:259-64.
369. Young DA, Featherstone JDB. Implementing caries risk assessment and clinical interventions. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):495-505.
370. Griffen AL, Beall CJ, Campbell JH, Firestone ND, Kumar PS, Yang ZK, et al. Distinct and complex bacterial profiles in human periodontitis and health revealed by 16S pyrosequencing. *ISME J.* 2012;6(6):1176-85.
371. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, et al. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J.* 2013;7(5):1016-25.
372. Rosan B, Lamont RJ. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2000;2(13):1599-607.
373. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13(6):42.
374. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(6):791-800.
375. Baker JL, Bor B, Agnello M, Shi W, He X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017;25(5):362-74.
376. Wang X, Du L, You J, King JB, Cichewicz RH. Fungal biofilm inhibitors from a human oral microbiome-derived bacterium. *Org Biomol Chem.* 2012;10(10):2044-50.

377. Wang J, Gao Y, Zhao F. Phage-bacteria interaction network in human oral microbiome. *Environ Microbiol.* 2016;18(7):2143-58.
378. Dudek NK, Sun CL, Burstein D, Kantor RS, Aliaga Goltsman DS, Bik EM, et al. Novel Microbial Diversity and Functional Potential in the Marine Mammal Oral Microbiome. *Curr Biol.* 2017;27(24):3752-62.
379. Sällberg M. Oral viral infections of children. *Periodontol 2000.* 2009;49:87-95.
380. Presti RM, Handley SA, Droit L, Ghannoum M, Jacobson M, Shiboski CH, et al. Alterations in the oral microbiome in HIV-infected participants after antiretroviral therapy administration are influenced by immune status. *AIDS.* 2018;32(10):1279-87.
381. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
382. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
383. Mark Welch JL, Rossetti BJ, Rieken CW, Dewhirst FE, Borisy GG. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113(6):791-800.
384. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral Biofilms: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends Microbiol.* 2018;26(3):229-42.
385. Kamada N, Chen GY, Inohara N, Núñez G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol.* 2013;14(7):685-90.
386. Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):321-35.
387. Lamont RJ, Hajishengallis G. Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):172-83.
388. Hajishengallis G, Lamont RJ. Breaking bad: manipulation of the host response by *Porphyromonas gingivalis*. *Eur J Immunol.* 2014;44(2):328-38.
389. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):745-59.
390. Dabdoub SM, Ganesan SM, Kumar PS. Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Sci Rep.* 2016;6:38993.
391. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, et al. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(10):4152-7.
392. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* 2017;44:12-22.
393. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-303.
394. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, et al. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002623.
395. Guo L, McLean JS, Lux R, He X, Shi W. The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Sci Rep.* 2015;5:18015.
396. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-303.
397. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(1):24-34.

398. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol.* mars 2017;44:23-38.
399. Eriksson L, Lif Holgerson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 2018;97(3):275-82.
400. Marsh PD, Zaura E. Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J Clin Periodontol.* mars 2017;44:12-22.
401. Liu Y-L, Nascimento M, Burne RA. Progress toward understanding the contribution of alkali generation in dental biofilms to inhibition of dental caries. *Int J Oral Sci.* 2012;4(3):135-40.
402. Merritt J, Qi F. The mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol Oral Microbiol.* 2012;27(2):57-69.
403. Qi F, Kreth J. Methods to Study Antagonistic Activities Among Oral Bacteria. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1537:203-18.
404. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One.* 2012;7(10):e47722.
405. Johansson I, Witkowska E, Kaveh B, Lif Holgerson P, Tanner ACR. The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *J Dent Res.* 2016;95(1):80-6.
406. Teng F, Yang F, Huang S, Bo C, Xu ZZ, Amir A, et al. Prediction of Early Childhood Caries via Spatial-Temporal Variations of Oral Microbiota. *Cell Host Microbe.* 2015;18(3):296-306.
407. Takahashi N, Nyvad B. Ecological Hypothesis of Dentin and Root Caries. *Caries Res.* 2016;50(4):422-31.
408. Diaz PI. Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. *Front Oral Biol.* 2012;15:17-40.
409. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA, et al. Microbiomes of Site-Specific Dental Plaques from Children with Different Caries Status. *Infect Immun.* 2017;85(8).
410. Knapp S, Brodal C, Peterson J, Qi F, Kreth J, Merritt J. Natural Competence Is Common among Clinical Isolates of *Veillonella parvula* and Is Useful for Genetic Manipulation of This Key Member of the Oral Microbiome. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:139.
411. Mashima I, Nakazawa F. The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by *Streptococcus* species. *Anaerobe.* 2014;28:54-61.
412. Simón-Soro A, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial geography of the oral cavity. *J Dent Res.* 2013;92(7):616-21.
413. Xiao J, Huang X, Alkhers N, Alzamil H, Alzoubi S, Wu TT, et al. *Candida albicans* and Early Childhood Caries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Caries Res.* 2018;52(1-2):102-12.
414. Hwang G, Liu Y, Kim D, Li Y, Krysan DJ, Koo H. *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtfB binding to modulate cross-kingdom biofilm development in vivo. *PLoS Pathog.* 2017;13(6):e1006407.
415. Falsetta ML, Klein MI, Colonne PM, Scott-Anne K, Gregoire S, Pai C-H, et al. Symbiotic relationship between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* synergizes virulence of plaque biofilms in vivo. *Infect Immun.* 2014;82(5):1968-81.
416. Sztajer H, Szafranski SP, Tomasch J, Reck M, Nimtz M, Rohde M, et al. Cross-feeding and interkingdom communication in dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *ISME J.* 2014;8(11):2256-71.
417. Flemming H-C, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* 2016;14(9):563-75.
418. Hwang G, Liu Y, Kim D, Sun V, Aviles-Reyes A, Kajfasz JK, et al. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Sci Rep.* 2016;6:32841.

419. Jiang W, Ling Z, Lin X, Chen Y, Zhang J, Yu J, et al. Pyrosequencing analysis of oral microbiota shifting in various caries states in childhood. *Microb Ecol.* 2014;67(4):962-9.
420. 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.
421. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000.* 2005;38:135-87.
422. 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.
423. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.
424. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
425. Dewhirst FE. The Oral Microbiome: Critical for Understanding Oral Health and Disease. *J Calif Dent Assoc.* 2016;44(7):409-10.
426. Diaz PI, Hoare A, Hong B-Y. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc.* 2016;44(7):421-35.
427. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol.* 1991;18(10):729-39.
428. Nowicki EM, Shroff R, Singleton JA, Renaud DE, Wallace D, Drury J, et al. Microbiota and Metatranscriptome Changes Accompanying the Onset of Gingivitis. *mBio.* 2018;9(2).
429. Rosier BT, De Jager M, Zaura E, Krom BP. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:92.
430. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(10):717-25.
431. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(7):481-90.
432. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol Read Engl.* 2003;149(Pt 2):279-94.
433. Hasturk H, Kantarci A, Goguet-Surmenian E, Blackwood A, Andry C, Serhan CN, et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2007;179(10):7021-9.
434. Abe T, Hosur KB, Hajishengallis E, Reis ES, Ricklin D, Lambris JD, et al. Local complement-targeted intervention in periodontitis: proof-of-concept using a C5a receptor (CD88) antagonist. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2012;189(11):5442-8.
435. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe.* 2011;10(5):497-506.
436. Eskan MA, Jotwani R, Abe T, Chmelar J, Lim J-H, Liang S, et al. The leukocyte integrin antagonist Del-1 inhibits IL-17-mediated inflammatory bone loss. *Nat Immunol.* 2012;13(5):465-73.
437. Moutsopoulos NM, Konkel J, Sarmadi M, Eskan MA, Wild T, Dutzan N, et al. Defective neutrophil recruitment in leukocyte adhesion deficiency type I disease causes local IL-17-driven inflammatory bone loss. *Sci Transl Med.* 2014;6(229):229ra40.
438. Lee C-T, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2016;197(7):2796-806.
439. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29(6):248-57.

440. Duran-Pinedo AE, Chen T, Teles R, Starr JR, Wang X, Krishnan K, et al. Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J.* 2014;8(8):1659-72.
441. Herrero ER, Fernandes S, Verspecht T, Ugarte-Berzal E, Boon N, Proost P, et al. Dysbiotic Biofilms Deregulate the Periodontal Inflammatory Response. *J Dent Res.* 2018;97(5):547-55.
442. Yost S, Duran-Pinedo AE, Teles R, Krishnan K, Frias-Lopez J. Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med.* 2015;7(1):27.
443. Bang J, Cimasoni G, Rosenbusch C, Duckert A. Sodium, potassium and calcium contents of crevicular exudate: their relations to gingivitis and periodontitis. *J Periodontol.* 1973;44(12):770-4.
444. Winter SE, Bäumlér AJ. Dysbiosis in the inflamed intestine: chance favors the prepared microbe. *Gut Microbes.* 2014;5(1):71-3.
445. Nassar M, Tabib Y, Capucha T, Mizraji G, Nir T, Pevsner-Fischer M, et al. GAS6 is a key homeostatic immunological regulator of host-commensal interactions in the oral mucosa. *Proc Natl Acad Sci.* 2017;114(3):337-46.
446. Dalal SR, Chang EB. The microbial basis of inflammatory bowel diseases. *J Clin Invest.* 2014;124(10):4190-6.
447. Ahmed U, Tanwir F. Association of periodontal pathogenesis and cardiovascular diseases: a literature review. *Oral Health Prev Dent.* 2015;13(1):21-7.
448. Bansal M, Khatri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases - a review. *J Med Life.* 2013;6(3):244-8.
449. Noshō K, Sukawa Y, Adachi Y, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, et al. Association of *Fusobacterium nucleatum* with immunity and molecular alterations in colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(2):557-66.
450. Flynn KJ, Baxter NT, Schloss PD. Metabolic and Community Synergy of Oral Bacteria in Colorectal Cancer. *mSphere.* 2016;1(3).
451. Yao Q-W, Zhou D-S, Peng H-J, Ji P, Liu D-S. Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014;35(7):7073-7.
452. Michaud DS, Fu Z, Shi J, Chung M. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiol Rev.* 2017;39(1):49-58.
453. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis.* 2012;33(5):1055-8.
454. Berthelot J-M, Le Goff B. Rheumatoid arthritis and periodontal disease. *Jt Bone Spine Rev Rhum.* 2010;77(6):537-41.
455. du Teil Espina M, Gabarrini G, Harmsen HJM, Westra J, van Winkelhoff AJ, van Dijk JM. Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(1):1-18.
456. Morante AP, Sanjuanbenito A, Mendía E, Giordano PG, Angarita FG. Liver abscess by *Eikenella corrodens*. *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig.* 2015;107(9):574-5.
457. Singhal S, Dian D, Keshavarzian A, Fogg L, Fields JZ, Farhadi A. The Role of Oral Hygiene in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.* 2011;56(1):170-5.
458. Funaki S, Tokutomi F, Wada-Takahashi S, Yoshino F, Yoshida A, Machata Y, et al. *Porphyromonas gingivalis* infection modifies oral microcirculation and aortic vascular function in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHRSP). *Microb Pathog.* 2016;92:36-42.
459. Poplawska-Kita A, Siewko K, Szpak P, Król B, Telejko B, Klimiuk PA, et al. Association between type 1 diabetes and periodontal health. *Adv Med Sci.* 2014;59(1):126-31.
460. Stanko P, Izakovícova Holla L. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal

disease. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov.* 2014;158(1):35-8.

461. Bagavant H, Dunkleberger ML, Wolska N, Sroka M, Rasmussen A, Adrianto I, et al. Antibodies to periodontogenic bacteria are associated with higher disease activity in lupus patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2019;37(1):106-11.
462. Corrêa JD, Calderaro DC, Ferreira GA, Mendonça SMS, Fernandes GR, Xiao E, et al. Subgingival microbiota dysbiosis in systemic lupus erythematosus: association with periodontal status. *Microbiome.* 2017;5.
463. Kinney JW, Bemiller SM, Murtishaw AS, Leisgang AM, Salazar AM, Lamb BT. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement N Y N.* 2018;4:575-90.
464. Cestari JAF, Fabri GMC, Kalil J, Nitrini R, Jacob-Filho W, de Siqueira JTT, et al. Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls. *J Alzheimers Dis.* 2016;52(4):1479-85.
465. Andonova I, Iliev V, Živković N, Sušić E, Bego I, Kotevska V. Can oral anaerobic bacteria cause adverse pregnancy outcomes? *Pril Makedon Akad Na Nauk Umet Oddelenie Za Med Nauki.* 2015;36(1):137-43.
466. Pussinen PJ, Alfthan G, Jousilahti P, Paju S, Tuomilehto J. Systemic exposure to *Porphyromonas gingivalis* predicts incident stroke. *Atherosclerosis.* 2007;193(1):222-8.
467. Cantekin K, Arslan D, Delikan E. Presence and distribution of dental enamel defects, recurrent aphthous lesions and dental caries in children with celiac disease. *Pak J Med Sci.* 2015;31(3):606-9.
468. Bui FQ, Almeida-da-Silva CLC, Huynh B, Trinh A, Liu J, Woodward J, et al. Association between periodontal pathogens and systemic disease. *Biomed J.* 2019;42(1):27-35.
469. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators of Inflammation.* 2019.
470. Li X, Kolltveit KM, Tronstad L, Olsen I. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 2000;13(4):547-58.
471. Loesche WJ. Association of the oral flora with important medical diseases. *Curr Opin Periodontol.* 1997;4:21-8.
472. Mang-de la Rosa M-R, Castellanos-Cosano L, Romero-Perez M-J, Cutando A. The bacteremia of dental origin and its implications in the appearance of bacterial endocarditis. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal.* 2014;19(1):e67-74.
473. Allen U. Infective endocarditis: Updated guidelines. *Can J Infect Dis Med Microbiol J Can Mal Infect Microbiol Medecale.* 2010;21(2):74-7.
474. Heimdahl A, Hall G, Hedberg M, Sandberg H, Söder PO, Tunér K, et al. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J Clin Microbiol.* 1990;28(10):2205-9.
475. Roberts GJ, Holzel HS, Sury MR, Simmons NA, Gardner P, Longhurst P. Dental bacteremia in children. *Pediatr Cardiol.* 1997;18(1):24-7.
476. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Anaerobic bacteremia and fungemia in patients undergoing endodontic therapy: an overview. *Ann Periodontol.* 1998;3(1):281-7.
477. Hernichel-Gorbach E, Kornman KS, Holt SC, Nichols F, Meador H, Kung JT, et al. Host responses in patients with generalized refractory periodontitis. *J Periodontol.* 1994;65(1):8-16.
478. Yang J, Zhang Q, Chen M, Wu W, Wang R, Liu C, et al. Association Between *Helicobacter pylori* Infection and Risk of Periodontal Diseases in Han Chinese: A Case-Control Study. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2016;22:121-6.
479. Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, et al. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biol.* 2012;13(6):R42.
480. Hatton GB, Madla CM, Rabbie SC, Basit AW. All disease begins in the gut: Influence of gastrointestinal disorders and surgery on oral drug performance. *Int J Pharm.* 2018;548(1):408-22.
481. Atarashi K, Suda W, Luo C, Kawaguchi T, Motoo I, Narushima S, et al. Ectopic colonization of oral bacteria in

- the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*. 2017;358(6361):359-65.
482. Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, et al. Oral Administration of *P. gingivalis* Induces Dysbiosis of Gut Microbiota and Impaired Barrier Function Leading to Dissemination of Enterobacteria to the Liver. *PloS One*. 2015;10(7):e0134234.
483. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, et al. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014;4:4828.
484. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, et al. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature*. 2014;513(7516):59-64.
485. Abed J, Enggård JEM, Zamir G, Faroja M, Almogy G, Grenov A, et al. Fap2 Mediates *Fusobacterium nucleatum* Colorectal Adenocarcinoma Enrichment by Binding to Tumor-Expressed Gal-GalNAc. *Cell Host Microbe*. 2016;20(2):215-25.
486. Kamada N, Seo S-U, Chen GY, Núñez G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(5):321-35.
487. Clemente JC, Manasson J, Scher JU. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *BMJ*. 2018;360:j5145.
488. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev*. 2017;279(1):70-89.
489. Maekawa T, Krauss JL, Abe T, Jotwani R, Triantafilou M, Triantafilou K, et al. *Porphyromonas gingivalis* manipulates complement and TLR signaling to uncouple bacterial clearance from inflammation and promote dysbiosis. *Cell Host Microbe*. 2014;15(6):768-78.
490. Wang M, Krauss JL, Domon H, Hosur KB, Liang S, Magotti P, et al. Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci Signal*. 2010;3(109):ra11.
491. Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, Morisaki I, Amano A, Lamont RJ. The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF- κ B RelA/p65. *PLoS Pathog*. 2013;9(4):e1003326.
492. Scannapieco FA, Mylotte JM. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. *J Periodontol*. 1996;67:1114-22.
493. Terpenning M, Bretz W, Lopatin D, Langmore S, Dominguez B, Loesche W. Bacterial colonization of saliva and plaque in the elderly. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 1993;16:S314-316.
494. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Bass JA. Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J Infect Dis*. 1981;143(6):784-90.
495. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontol Res*. 1996;31(6):393-407.
496. Michaud DS, Izard J. Microbiota, oral microbiome, and pancreatic cancer. *Cancer J Sudbury Mass*. 2014;20(3):203-6.
497. Kelsen J, Bittinger K, Pauly-Hubbard H, Posivak L, Grunberg S, Baldassano R, et al. Alterations of the Subgingival Microbiota in Pediatric Crohn's Disease Studied Longitudinally in Discovery and Validation Cohorts. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(12):2797-805.
498. Nakatsu G, Li X, Zhou H, Sheng J, Wong SH, Wu WKK, et al. Gut mucosal microbiome across stages of colorectal carcinogenesis. *Nat Commun*. 2015;6:8727.
499. Aguayo S, Schuh CMAP, Vicente B, Aguayo LG. Association between Alzheimer's Disease and Oral and Gut Microbiota: Are Pore Forming Proteins the Missing Link? *J Alzheimers Dis*. 2018;65(1):29-46.
500. Balan P, Chong YS, Umashankar S, Swarup S, Loke WM, Lopez V, et al. Keystone Species in Pregnancy Gingivitis:

- A Snapshot of Oral Microbiome During Pregnancy and Postpartum Period. *Front Microbiol.* 2018;9.
501. Graves DT, Corrêa JD, Silva TA. The Oral Microbiota Is Modified by Systemic Diseases. *J Dent Res.* 2019;98(2):148-56.
 502. Wolff D, Joerss D, Dörfer CE. In vitro-cleaning efficacy of interdental brushes with different stiffness and different diameter. *Oral Health Prev Dent.* 2006;4(4):279-85.
 503. Takei HH. The interdental space. *Dent Clin North Am.* 1980;24(2):169-76.
 504. Oliveira JD de, Storrer CM, Sousa AM, Lopes TR, Vieira J de S, Deliberador TM. Papillary regeneration: anatomical aspects and treatment approaches. *RSBO.* 2012;9(4):448-56.
 505. Jagdhane V, Mahale S. Anatomic variables affecting interdental papilla. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2014;5:14.
 506. Sharma AA, Park JH. Esthetic considerations in interdental papilla: remediation and regeneration. *J Esthet Restor Dent.* 2010;22(1):18-28.
 507. Baab DA, Oberg PA, Holloway GA. Gingival blood flow measured with a laser Doppler flowmeter. *J Periodontal Res.* 1986;21(1):73-85.
 508. Schroeder HE, Listgarten MA. The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol* 2000. 1997;13:91-120.
 509. Blatz MB, Hürzeler MB, Strub JR. Reconstruction of the lost interproximal papilla--presentation of surgical and nonsurgical approaches. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999;19(4):395-406.
 510. Wu Y, Tu Y, Huang S, Chan C. The influence of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence of the interproximal dental papilla. *Chang Gung Med J.* 2003;26(11):822-8.
 511. Chow YC, Eber RM, Tsao Y-P, Shotwell JL, Wang H-L. Factors associated with the appearance of gingival papillae. *J Clin Periodontol.* 2010;37(8):719-27.
 512. Singh VP, Uppoor AS, Nayak DG, Shah D. Black triangle dilemma and its management in esthetic dentistry. *Dent Res J.* 2013;10(3):296-301.
 513. Joshi K, Baiju CS, Khashu H, Bansal S, Maheswari IB. Clinical assessment of interdental papilla competency parameters in the esthetic zone. *J Esthet Restor Dent Off Publ Am Acad Esthet Dent Al.* 2017;29(4):270-5.
 514. Cohen B. Morphological factors in the pathogenesis of periodontal disease. *Br Dent J.* 1959;107:31-9.
 515. Cohen B. Pathology of the interdental tissues. *Dent Pract.* 1959;9:167-73.
 516. Kohl JT, Zander HA. Morphology of interdental gingival tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14:287-95.
 517. Andrade L. Periodontia p/ TRT 18ª. Livre eletrônica. [Internet]. 2018. Disponível sur: <https://docplayer.com.br/87598652-Livro-eletronico-aula-00-periodontia-p-trt-18a-2018-odontologia-professor-leticia-andrade-demo.html>
 518. Fiorellini JP, Kim DM, Ishikawa SO. The gingiva. *Carranza's Clinical Periodontology.* 10th éd. Missouri; 2006. 46-67 p.
 519. Wolf H-F, Rateitschak K-H, Rateitschak E-M, Loup P-J. *Parodontologie.* 3e éd. Paris: Elsevier Masson; 2005. 532 p.
 520. Jan Lindhe NPL, Thorkild Karring. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* [Internet]. 5th éd. Wiley-Blackwell; 2008. Disponível sur: <https://www.wiley.com/en-us/Clinical+Periodontology+and+Implant+Dentistry%2C+2+Volume+Set%2C+6th+Edition-p-9780470672488>
 521. Berkovitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. *Oral anatomy, histology and embryology* [Internet]. 4th ed. Mosby/Elsevier; 2009. Disponível sur: <https://trove.nla.gov.au/work/29000936>
 522. Sana Abdullah S, Pavithra S, Ahmed N. Interdental Aids-A Literature Review. *Open Access J Dent Sci.* 2018;3.
 523. Nordland WP, Tarnow DP. A classification system for loss of papillary height. *J Periodontol.* 1998;69(10):1124-6.

524. Philippe Bouchard. Parodontologie & dentisterie implantaire - Volume 2: Thérapeutiques chirurgicales (Coll. Dentaire). Lavoisier; 2015. 491 p.
525. Cardaropoli D, Re S, Corrente G. The Papilla Presence Index (PPI): a new system to assess interproximal papillary levels. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2004;24(5):488-92.
526. Apoorva M., Raghava VJ, Narayan SJ, Yadalam U. Inter dental papilla management: a review. *International Journal of Current Research.* 2018;10:64650-3.
527. Fradeani M. Esthetic analysis: a systematic approach to prosthetic treatment. Quintessence; 2004.
528. Cho H-S, Jang H-S, Kim D-K, Park J-C, Kim H-J, Choi S-H, et al. The effects of interproximal distance between roots on the existence of interdental papillae according to the distance from the contact point to the alveolar crest. *J Periodontol.* 2006;77(10):1651-7.
529. Chang L. The association between embrasure morphology and central papilla recession: a noninvasive assessment method. *Chang Gung Med J.* 2007;30(5):445-52.
530. Chen M-C, Liao Y-F, Chan C-P, Ku Y-C, Pan W-L, Tu Y-K. Factors influencing the presence of interproximal dental papillae between maxillary anterior teeth. *J Periodontol.* 2010;81(2):318-24.
531. de Santana RB, de Miranda JLC, de Santana CMM. The relationship between open versus normal contact point and inter-proximal papilla dimensions in periodontally healthy young adults: A controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2017;44(11):1164-71.
532. Tarnow DP, Magner AW, Fletcher P. The effect of the distance from the contact point to the crest of bone on the presence or absence of the interproximal dental papilla. *J Periodontol.* 1992;63(12):995-6.
533. Seibert J., Lindhe J. Esthetics and periodontal therapy: textbook of clinical periodontology. 2nd ed. Copenhagen; 1989.
534. Kao RT, Fagan MC, Conte GJ. Thick vs. thin gingival biotypes: a key determinant in treatment planning for dental implants. *J Calif Dent Assoc.* 2008;36(3):193-8.
535. Abraham S, Deepak KT, Ambili R, Preeja C, Archana V. Gingival biotype and its clinical significance – A review. *Saudi J Dent Res.* 2014;5(1):3-7.
536. Kois JC. Predictable single tooth peri-implant esthetics: five diagnostic keys. *Compend Contin Educ Dent.* 2001;22(3):199-206.
537. Pontoriero R, Carnevale G. Surgical crown lengthening: a 12-month clinical wound healing study. *J Periodontol.* 2001;72(7):841-8.
538. Evans CDJ, Chen ST. Esthetic outcomes of immediate implant placements. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(1):73-80.
539. Romeo E, Lops D, Rossi A, Storelli S, Rozza R, Chiapasco M. Surgical and prosthetic management of interproximal region with single-implant restorations: 1-year prospective study. *J Periodontol.* 2008;79(6):1048-55.
540. Rafiee RM, Melamed S, Chao J. Predicting black triangles. Part II: interdental width. *J West Soc Periodontol Periodontol Abstr.* 2012;60(1):3-5.
541. Ahmad I. Anterior dental aesthetics: gingival perspective. *Br Dent J.* 2005;199(4):195-202.
542. Van der Velden U. Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol.* 1984;11(5):281-94.
543. Montevicchi M, Checchi V, Piana L, Checchi L. Variables Affecting the Gingival Embrasure Space in Aesthetically Important Regions: Differences between Central and Lateral Papillae. *Open Dent J.* 2011;5:126-35.
544. Chang L-C. Assessment of parameters affecting the presence of the central papilla using a non-invasive radiographic method. *J Periodontol.* 2008;79(4):603-9.
545. Ko-Kimura N, Kimura-Hayashi M, Yamaguchi M, Ikeda T, Meguro D, Kanekawa M, et al. Some factors associated

- with open gingival embrasures following orthodontic treatment. *Aust Orthod J.* 2003;19(1):19-24.
546. Shklar G. The effects of aging upon oral mucosa. *J Invest Dermatol.* 1966;47(2):115-20.
547. Papic M, Glickman I. Keratinization of the human gingiva in the menstrual cycle and menopause. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1950;3(4):504-16.
548. Vandana KL, Savitha B. Thickness of gingiva in association with age, gender and dental arch location. *J Clin Periodontol.* 2005;32(7):828-30.
549. Ikeda T, Yamaguchi M, Meguro D, Kasai K. Prediction and causes of open gingival embrasure spaces between the mandibular central incisors following orthodontic treatment. *Aust Orthod J.* 2004;20(2):87-92.
550. Sicilia A, Arregui I, Gallego M, Cabezas B, Cuesta S. A systematic review of powered vs. manual toothbrushes in periodontal cause-related therapy. *J Clin Periodontol.* 2002;29:39-54.
551. Axelsson P, Nyström B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. *J Clin Periodontol.* 2004;31(9):749-57.
552. Novak MJ, Albather HM, Close JM. Redefining the biologic width in severe, generalized, chronic periodontitis: implications for therapy. *J Periodontol.* 2008;79(10):1864-9.
553. Zetu L, Wang H-L. Management of inter-dental/inter-implant papilla. *J Clin Periodontol.* 2005;32(7):831-9.
554. Ingber JS. Forced eruption: alteration of soft tissue cosmetic deformities. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1989;9(6):416-25.
555. Kim Y, Kwon E, Cho Y, Lee J, Kim S, Choi J. Changes in the vertical position of interdental papillae and interseptal bone following the approximation of anterior teeth. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2014;34(2):219-24.
556. Kurol J, Rönnerman A, Heyden G. Long-term gingival conditions after orthodontic closure of extraction sites. Histological and histochemical studies. *Eur J Orthod.* 1982;4(2):87-92.
557. Burke S, Burch JG, Tetz JA. Incidence and size of pretreatment overlap and posttreatment gingival embrasure space between maxillary central incisors. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1994;105(5):506-11.
558. Ghezzi C, Masiero S, Silvestri M, Zanotti G, Rasperini G. Orthodontic treatment of periodontally involved teeth after tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2008;28(6):559-67.
559. Shivakumar AT, Kalgeri SH, Dhir S. Clinical considerations in restorative dentistry - A narrative review. *J Int Clin Dent Res Organ.* 2015;7(2):122.
560. Kokich VG. Esthetics: the orthodontic-periodontic restorative connection. *Semin Orthod.* 1996;2(1):21-30.
561. Choquet V, Hermans M, Adriaenssens P, Daelemans P, Tarnow DP, Malevez C. Clinical and radiographic evaluation of the papilla level adjacent to single-tooth dental implants. A retrospective study in the maxillary anterior region. *J Periodontol.* 2001;72(10):1364-71.
562. Tarnow DP, Cho SC, Wallace SS. The effect of inter-implant distance on the height of inter-implant bone crest. *J Periodontol.* 2000;71(4):546-9.
563. Ryser MR, Block MS, Mercante DE. Correlation of papilla to crestal bone levels around single tooth implants in immediate or delayed crown protocols. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(8):1184-95.
564. Clinical Affairs Committee, American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Adolescent Oral Health Care. *Pediatr Dent.* oct 2015;37(5):49-56.
565. Muntean A, Mesaros AS, Festila D, Mesaros M. Modern management of dental decay in children and adolescents - a review. *Clujul Med* 1957. 2015;88(2):137-9.
566. Stenlund H, Mejäre I, Källestål C. Caries incidence rates in Swedish adolescents and young adults with particular reference to adjacent approximal tooth surfaces: a methodological study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(5):361-7.

567. Wojtyczka RD, Orlewska K, Kępa M, Idzik D, Dziedzic A, Mularz T, et al. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(5):4619-33.
568. Hausen H. How to improve the effectiveness of caries-preventive programs based on fluoride. *Caries Res*. 2004;38(3):263-7.
569. Mejäre I, Stenlund H, Julihn A, Larsson I, Permert L. Influence of approximal caries in primary molars on caries rate for the mesial surface of the first permanent molar in swedish children from 6 to 12 years of age. *Caries Res*. 2001;35(3):178-85.
570. Albandar JM, Brown LJ, Løe H. Clinical features of early-onset periodontitis. *J Am Dent Assoc* 1939. 1997;128(10):1393-9.
571. Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000. 1997;13:41-75.
572. Scannapieco FA. Periodontal inflammation: from gingivitis to systemic disease? *Compend Contin Educ Dent Jamesburg NJ* 1995. 2004;25(7 Suppl 1):16-25.
573. Damek-Poprawa M, Korostoff J, Gill R, DiRienzo JM. Cell junction remodeling in gingival tissue exposed to a microbial toxin. *J Dent Res*. 2013;92(6):518-23.
574. Blumenthal A, Ehlers S, Lauber J, Buer J, Lange C, Goldmann T, et al. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood*. 2006;108(3):965-73.
575. Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. *Clin Exp Immunol*. 2006;144(1):35-40.
576. Al-Ghutaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common periodontal diseases of children and adolescents. *Int J Dent*. 2014;2014:850674.
577. Oh T-J, Eber R, Wang H-L. Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol*. 2002;29(5):400-10.
578. Clerehugh V, Seymour GJ, Bird PS, Cullinan M, Drucker DB, Worthington HV. The detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* using an ELISA in an adolescent population with early periodontitis. *J Clin Periodontol*. 1997;24(1):57-64.
579. Hamlet S, Ellwood R, Cullinan M, Worthington H, Palmer J, Bird P, et al. Persistent colonization with *Tannerella forsythensis* and loss of attachment in adolescents. *J Dent Res*. 2004;83(3):232-5.
580. Carrouel F, Viennot S, Santamaria J, Veber P, Bourgeois D. Quantitative Molecular Detection of 19 Major Pathogens in the Interdental Biofilm of Periodontally Healthy Young Adults. *Front Microbiol*. 2016;7:840.
581. Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185804.
582. Palmer RJ. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol* 2000. 2014;64(1).
583. Zijngé V, van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One*. 2010;5(2):e9321.
584. Deacon SA, Glennly A-M, Deery C, Robinson PG, Heanue M, Walmsley AD, et al. Different powered toothbrushes for plaque control and gingival health. *Cochrane*. 2010;(12):CD004971.
585. Rosema NAM, Timmerman MF, Versteeg PA, van Palenstein Helderman WH, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Comparison of the use of different modes of mechanical oral hygiene in prevention of plaque and gingivitis. *J Periodontol*. 2008;79(8):1386-94.
586. Bourgeois DM, Phantumvanit P, Llodra JC, Horn V, Carlile M, Eiselé J-L. Rationale for the prevention of oral diseases in primary health care: an international collaborative study in oral health education. *Int Dent J*. 2014;64:1-11.

587. Biesbrock AR, Walters PA, Bartizek RD. The relative effectiveness of six powered toothbrushes for dental plaque removal. *J Clin Dent*. 2002;13(5):198-202.
588. Rosema N, Slot DE, van Palenstein Helderma WH, Wiggelinkhuizen L, Van der Weijden GA. The efficacy of powered toothbrushes following a brushing exercise: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2016;14:29-41.
589. Halappa M, Chandu G. Evaluation of usage of interdental aids among dentists as a preventive measure. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(1):4.
590. Sälzer S, Slot DE, Van der Weijden FA, Dörfer CE. Efficacy of inter-dental mechanical plaque control in managing gingivitis--a meta-review. *J Clin Periodontol*. 2015;42:92-105.
591. Ng E, Lim LP. An Overview of Different Interdental Cleaning Aids and Their Effectiveness. *Dent J*. 2019;7(2).
592. Marchesan JT, Morelli T, Moss K, Preisser JS, Zandona AF, Offenbacher S, et al. Interdental Cleaning Is Associated with Decreased Oral Disease Prevalence. *J Dent Res*. 2018;97(7):773-8.
593. Crocombe LA, Brennan DS, Slade GD, Loc DO. Is self interdental cleaning associated with dental plaque levels, dental calculus, gingivitis and periodontal disease? *J Periodontol Res*. 2012;47(2):188-97.
594. Sambunjak D, Nickerson JW, Poklepovic T, Johnson TM, Imai P, Tugwell P, et al. Flossing for the management of periodontal diseases and dental caries in adults. *Cochrane*. 2011;(12).
595. Slot DE, Dörfer CE, Van der Weijden GA. The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2008;6(4):253-64.
596. American Dental Association. Accepted dental therapeutics. Chicago: Council on Dental Therapeutics of the American Dental Association; 1984.
597. Kotsakis GA, Lian Q, Ioannou AL, Michalowicz BS, John MT, Chu H. A network meta-analysis of interproximal oral hygiene methods in the reduction of clinical indices of inflammation. *J Periodontol*. 2018;89(5):558-70.
598. Hujoel PP, Cunha-Cruz J, Banting DW, Loesche WJ. Dental flossing and interproximal caries: a systematic review. *J Dent Res*. 2006;85(4):298-305.
599. Graziani F, Palazzolo A, Gennai S, Karapetsa D, Giuca MR, Cei S, et al. Interdental plaque reduction after use of different devices in young subjects with intact papilla: A randomized clinical trial. *Int J Dent Hyg*. 2018;16(3):389-96.
600. Berchier CE, Slot DE, Haps S, Van der Weijden GA. The efficacy of dental floss in addition to a toothbrush on plaque and parameters of gingival inflammation: a systematic review. *Int J Dent Hyg*. 2008;6(4):265-79.
601. Ciancio SG. The dental water jet: a product ahead of its time. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;30:7-13.
602. Cutler CW, Stanford TW, Abraham C, Cederberg RA, Boardman TJ, Ross C. Clinical benefits of oral irrigation for periodontitis are related to reduction of pro-inflammatory cytokine levels and plaque. *J Clin Periodontol*. 2000;27(2):134-43.
603. 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.
604. Gorur A, Lyle DM, Schaudinn C, Costerton JW. Biofilm removal with a dental water jet. *Compend Contin Educ Dent*. 2009;1-6.
605. Al-Mubarak S, Ciancio S, Aljada A, Mohanty P, Ross C, Dandona P. Comparative evaluation of adjunctive oral irrigation in diabetics. *J Clin Periodontol*. 2002;29(4):295-300.
606. Barnes CM, Russell CM, Reinhardt RA, Payne JB, Lyle DM. Comparison of irrigation to floss as an adjunct to tooth brushing: effect on bleeding, gingivitis, and supragingival plaque. *J Clin Dent*. 2005;16(3):71-7.
607. Goyal CR, Lyle DM, Qaqish JG, Schuller R. Evaluation of the plaque removal efficacy of a water flosser compared to string floss in adults after a single use. *J Clin Dent*. 2013;24(2):37-42.
608. Goyal CR, Lyle DM, Qaqish JG, Schuller R. Efficacy of Two Interdental Cleaning Devices on Clinical Signs of Inflammation: A Four-Week Randomized Controlled Trial. *J Clin Dent*. 2015;26(2):55-60.

609. Goyal CR, Lyle DM, Qaqish JG, Schuller R. Comparison of Water Flosser and Interdental Brush on Reduction of Gingival Bleeding and Plaque: A Randomized Controlled Pilot Study. *J Clin Dent*. 2016;27(2):61-5.
610. Lyle DM, Goyal CR, Qaqish JG, Schuller R. Comparison of Water Flosser and Interdental Brush on Plaque Removal: A Single-Use Pilot Study. *J Clin Dent*. 2016;27(1):23-6.
611. Stauff I, Derman S, Barbe AG, Hoefler KC, Bizhang M, Zimmer S, et al. Efficacy and acceptance of a high-velocity microdroplet device for interdental cleaning in gingivitis patients-A monitored, randomized controlled trial. *Int J Dent Hyg*. 2018;16(2):e31-7.
612. Magnuson B, Harsono M, Stark PC, Lyle D, Kugel G, Perry R. Comparison of the effect of two interdental cleaning devices around implants on the reduction of bleeding: a 30-day randomized clinical trial. *Compend Contin Educ Dent*. 2013;2-7.
613. Worthington HV, MacDonald L, Poklepovic Pericic T, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P, et al. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;4:CD012018.
614. Frascella JA, Fernández P, Gilbert RD, Cugini M. A randomized, clinical evaluation of the safety and efficacy of a novel oral irrigator. *Am J Dent*. 2000;13(2):55-8.
615. Van der Weijden F, Slot DE, Echeverría JJ, Lindhe J. Mechanical supragingival plaque control [Internet]. 6th éd. Wiley Blackwell; 2015. Disponible sur: <https://dare.uva.nl/search?identifier=68b981d5-d63f-4301-b00d-71c6f5b2e531>
616. Waerhaug J. The interdental brush and its place in operative and crown and bridge dentistry. *J Oral Rehabil*. 1976;3(2):107-13.
617. Christou V, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden FA. Comparison of different approaches of interdental oral hygiene: interdental brushes versus dental floss. *J Periodontol*. 1998;69(7):759-64.
618. Tu Y-K, Jackson M, Kellett M, Clerehugh V. Direct and indirect effects of interdental hygiene in a clinical trial. *J Dent Res*. 2008;87(11):1037-42.
619. Imai PH, Hatzimanolakis P. Interdental brush in Type I embrasures : Examiner blinded randomized clinical trial of bleeding and plaque efficacy. 2010.
620. Noorlin I, Watts TLP. A comparison of the efficacy and ease of use of dental floss and interproximal brushes in a randomised split mouth trial incorporating an assessment of subgingival plaque. *Oral Health Prev Dent*. 2007;5(1):13-8.
621. Poklepovic T, Worthington HV, Johnson TM, Sambunjak D, Imai P, Clarkson JE, et al. Interdental brushing for the prevention and control of periodontal diseases and dental caries in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;(12):CD009857.
622. Jordan RA, Hong HM, Lucaciu A, Zimmer S. Efficacy of straight versus angled interdental brushes on interproximal tooth cleaning: a randomized controlled trial. *Int J Dent Hyg*. 2014;12(2):152-7.
623. Jared H, Zhong Y, Rowe M, Ebisutani K, Tanaka T, Takase N. Clinical trial of a novel interdental brush cleaning system. *J Clin Dent*. 2005;16(2):47-52.
624. Jackson MA, Kellett M, Worthington HV, Clerehugh V. Comparison of interdental cleaning methods: a randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2006;77(8):1421-9.
625. Imai PH, Hatzimanolakis PC. Encouraging client compliance for interdental care with the interdental brush: The client's perspective. 2010;5.
626. Richards D. The effectiveness of interproximal oral hygiene aids. *Evid Based Dent*. 2018;19(4):107-8.
627. Worthington HV, MacDonald L, Poklepovic Pericic T, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P, et al. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. 2019;CD012018.
628. Chapple ILC, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of

- periodontitis: managing gingivitis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(S16):S71-6.
629. Schmage P, Platzer U, Nergiz I. Comparison between manual and mechanical methods of interproximal hygiene. *Quintessence Int*. 1999;30(8):535-9.
630. Gluch JI. As an adjunct to tooth brushing, interdental brushes (IDBs) are more effective in removing plaque as compared with brushing alone or the combination use of tooth brushing and dental floss. *J Evid-Based Dent Pract*. 2012;12(2):81-3.
631. Vogel M, Sener B, Roos M, Attin T, Schmidlin PR. Interdental cleaning and gingival injury potential of interdental toothbrushes. *Swiss Dent J*. 2014;124(12):1290-301.
632. Sicilia A, Arregui I, Gallego M, Cabezas B, Cuesta S. Home oral hygiene revisited. Options and evidence. *Oral Health Prev Dent*. 2003;407-22.
633. Cutress TW, Ainamo J, Sardo-Infirri J. The community periodontal index of treatment needs (CPITN) procedure for population groups and individuals. *Int Dent J*. 1987;37(4):222-33.
634. Rapp GE, Barbosa Júnior A de A, Mendes AJD, Motta ACF, Bião MA de A, Garcia RV. Technical assessment of WHO-621 periodontal probe made in Brazil. *Braz Dent J*. 2002;13(1):61-5.
635. Bourgeois D, Carrouel F, Llodra JC, Bravo M, Viennot S. A Colorimetric Interdental Probe as a Standard Method to Evaluate Interdental Efficiency of Interdental Brush. *Open Dent J*. 2015;9:431-7.
636. Bourgeois D, Saliassi I, Dussart C, Llodra JC, Tardivo D, Laforest L, et al. Educational outcomes of a new curriculum on interproximal oral prophylaxis for dental students. *PLoS ONE*. 2018;13(10).
637. Bourgeois D, David A, Inquimbert C, Tramini P, Molinari N, Carrouel F. Quantification of carious pathogens in the interdental microbiota of young caries-free adults. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185804.
638. Bourgeois D, Saliassi I, Llodra JC, Bravo M, Viennot S, Carrouel F. Efficacy of interdental calibrated brushes on bleeding reduction in adults: a 3-month randomized controlled clinical trial. *Eur J Oral Sci*. 2016.
639. Zimmermann H, Zimmermann N, Hagenfeld D, Veile A, Kim T-S, Becher H. Is frequency of tooth brushing a risk factor for periodontitis? A systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2015;43(2):116-27.
640. Topaloglu-ak A, Ertugrul F, Eden E, Ates M, Bulut H. Effect of Orthodontic Appliances on Oral Microbiota—6 Month Follow-up. *J Clin Pediatr Dent*. 2011;35:433-6.
641. Freitas AOA de, Marquezan M, Nojima M da CG, Alviano DS, Maia LC, Freitas AOA de, et al. The influence of orthodontic fixed appliances on the oral microbiota: A systematic review. *Dent Press J Orthod*. 2014;19(2):46-55.
642. Lucchese A, Bondemark L, Marcolina M, Manuelli M. Changes in oral microbiota due to orthodontic appliances: a systematic review. *J Oral Microbiol*. 2018;10(1).
643. Paolantonio M, Festa F, di Placido G, D'Attilio M, Catamo G, Piccolomini R. Site-specific subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in orthodontic patients. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1999;115(4):423-8.
644. Ristic M, Vlahovic Svabic M, Sasic M, Zelic O. Clinical and microbiological effects of fixed orthodontic appliances on periodontal tissues in adolescents. *Orthod Craniofac Res*. 2007;10(4):187-95.
645. Gomez A, Nelson KE. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microb Ecol*. 2017;73(2):492-503.
646. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013;69(1):137-43.
647. Merchant AT. Periodontitis and dental caries occur together. *J Evid-Based Dent Pract*. 2012;12:18-9.
648. Durand R, Roufegarinejad A, Chandad F, Rompré PH, Voyer R, Michalowicz BS, et al. Dental caries are positively associated with periodontal disease severity. *Clin Oral Investig*. 2019.
649. Chaffee BW, Featherstone JDB, Gansky SA, Cheng J, Zhan L. Caries Risk Assessment Item Importance. *JDR Clin Transl Res*. 2016;1(2):131-42.

650. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, et al. Bacteria of Dental Caries in Primary and Permanent Teeth in Children and Young Adults. *J Clin Microbiol.* 2008;46(4):1407-17.
651. Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T, et al. Microbial risk indicators of early childhood caries. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5753-9.
652. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46(6):2015-21.
653. Gati D, Vieira AR. Elderly at Greater Risk for Root Caries: A Look at the Multifactorial Risks with Emphasis on Genetics Susceptibility. *International Journal of Dentistry.* 2011.
654. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-80.
655. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients.* 2010;2(3):290-8.
656. Li Y, Caufield PW, Dasanayake AP, Wiener HW, Vermund SH. Mode of delivery and other maternal factors influence the acquisition of *Streptococcus mutans* in infants. *J Dent Res.* 2005;84(9):806-11.
657. Van Loveren C, Buijs JF, ten Cate JM. Similarity of bacteriocin activity profiles of *mutans streptococci* within the family when the children acquire the strains after the age of 5. *Caries Res.* 2000;34(6):481-5.
658. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans | *Journal of Dental Education.* *J Dent Educ.* 2001;65:1028-37.
659. Thenisch NL, Bachmann LM, Imfeld T, Leisebach Minder T, Steurer J. Are *mutans streptococci* detected in preschool children a reliable predictive factor for dental caries risk? A systematic review. *Caries Res.* 2006;40(5):366-74.
660. Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. Beyond *Streptococcus mutans*: Dental Caries Onset Linked to Multiple Species by 16S rRNA Community Analysis. *PLoS ONE.* 2012;7(10).
661. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):248-55.
662. Johansson I, Witkowska E, Kaveh B, Holgerson PL, Tanner ACR. The Microbiome in Populations with a Low and High Prevalence of Caries. *J Dent Res.* 2016;95(1):80-6.
663. Eriksson L, Lif Holgerson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 2018;97(3):275-82.
664. Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of *mutans streptococci* and *lactobacilli* in relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. *Int Dent J.* 2007;57(6):445-51.
665. Piwat S, Teanpaisan R, Thitasomakul S, Thearmontree A, Dahlén G. *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25(2):157-64.
666. Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral *Lactobacilli* and Dental Caries. *J Dent Res.* 2015;94:110-118.
667. Tu Y, Ling X, Chen Y, Wang Y, Zhou N, Chen H. Effect of *S. Mutans* and *S. Sanguinis* on Growth and Adhesion of *P. Gingivalis* and Their Ability to Adhere to Different Dental Materials. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res.* 2017;23:4539-5445.
668. Consensus report. Consensus Report Periodontal Diseases: Pathogenesis and Microbial Factors. *Ann Periodontol.* 1996;1(1):926-32.
669. Rajakaruna GA, Negi M, Uchida K, Sekine M, Furukawa A, Ito T, et al. Localization and density of *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* in gingival and subgingival granulation tissues affected by chronic or aggressive periodontitis. *Sci Rep.* 2018;8.

670. Jiang S, Gao X, Jin L, Lo ECM. Salivary Microbiome Diversity in Caries-Free and Caries-Affected Children. *Int J Mol Sci.* 2016;17(12).
671. Peterson SN, Snesrud E, Liu J, Ong AC, Kilian M, Schork NJ, et al. The Dental Plaque Microbiome in Health and Disease. *PLoS ONE.* 2013;8(3).
672. Zhu Y, Dashper SG, Chen Y-Y, Crawford S, Slakeski N, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* synergistic polymicrobial biofilm development. *PloS One.* 2013;8(8):e71727.