



HAL
open science

Développement d'un hydrogel injectable à propriétés antimicrobiennes pour la prévention des péri-implantites

Sébastien Baixe

► **To cite this version:**

Sébastien Baixe. Développement d'un hydrogel injectable à propriétés antimicrobiennes pour la prévention des péri-implantites. Autre. Université de Strasbourg, 2019. Français. NNT : 2019STRAE036 . tel-03787909

HAL Id: tel-03787909

<https://theses.hal.science/tel-03787909v1>

Submitted on 26 Sep 2022

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

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

ÉCOLE DOCTORALE DE PHYSIQUE ET CHIMIE-PHYSIQUE (ED 182)

Inserm UMR 1121 Biomatériaux et Bioingénierie

THÈSE

présentée par :

Sébastien BAIXE

soutenue le : **25 septembre 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Physique et Chimie-Physique

**Développement d'un hydrogel injectable
à propriétés antimicrobiennes
pour la prévention des péri-implantites**

THÈSE dirigée par :

M ETIENNE Olivier

Docteur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Mme GROSGOGÉAT Brigitte

Professeur, Université de Lyon

M EGLES Christophe

Professeur, UTC de Compiègne

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M HAIKEL Youssef

Professeur, Université de Strasbourg

Mme MONNET-CORTI Virginie

Professeur, Université de Aix-Marseille

Mme TADDEI-GROSS Corinne

Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

A Monsieur le Docteur Olivier Etienne,

Pour ta patience, ton enthousiasme et ton implication à tous les niveaux jusqu'à tard le soir et loin dans le monde. Merci de me guider dans les aventures scientifiques depuis plus de dix ans.

A Monsieur le Professeur Youssef Haikel,

Je vous remercie pleinement d'avoir accepté de m'accompagner au début de cette thèse en tant que directeur de thèse. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez toujours accordée.

A Madame le Professeur Brigitte Grosogeat et Monsieur le Professeur Christophe Egles,

Je suis sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail particulièrement lié à vos domaines de compétences.

A Madame le Professeur Virginie Monnet-Corti,

Merci de venir jusqu'à Strasbourg pour me donner votre avis d'experte vis-à-vis de ce sujet d'actualité.

A Madame le Professeur Corinne Taddéi-Gross,

Je suis particulièrement touché de votre disponibilité pour faire partie de ce jury, et de votre présence bienveillante tout au long de ces dernières années.

A Madame le Docteur Marie-Hélène Metz-Boutigue,

Merci de m'avoir accueilli au sein du laboratoire et de m'avoir intégré à l'équipe de recherche. Vous avez vraiment pu me guider dans la compréhension des peptides antimicrobiens et pour la gestion de mes expérimentations en biologie.

A Monsieur le Professeur Vincent Ball,

Merci pour ton implication dans ce travail, tant dans les manipulations que dans les corrections, toujours dans la bonne humeur. J'ai pu découvrir l'univers complexe des polymères de façon compréhensible avec toi.

A tous mes collègues de travail,

En particulier le Pr Pierre Schaaf à l'origine de l'introduction de ces gels pour la thèse et qui m'a accueilli au sein de l'unité INSERM 1121, le Pr Loïc Jierry qui nous a synthétisé avec son équipe de l'ICS l'alginate catéchol et l'acide pluronique, Mihaela qui m'a aidé à initier le travail de laboratoire et à lancer le projet, Eric qui m'a beaucoup aidé pour la microscopie ainsi de Najj et Joseph, Sophie, Cosette, Abdurraouf, Anabelle, Leyla, Youri, Lydie, Céline, Angéla, Christiane, Philippe, les prothésistes dentaires Igor, Frédéric, Dominique, Stéphane et Philippe Kress; et tous les autres qui m'ont épaulé d'une façon ou d'une autre pour ce travail.

A Isabelle,

Merci de m'avoir tant soutenu, encouragé et accompagné tous les jours dans ce long projet qui a fait partie pleinement de notre vie. Une nouvelle page peut commencer...

A ma famille, mes parents et mes amis,

Merci de tous vos encouragements durant ce long périple, qui fut une montagne particulière à gravir, avec ses belles perspectives et son sommet infini

Table des matières

RESUME DE THESE.....	13
PARTIE I : INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE THESE.....	17
I. LE PARODONTE : DE L'ETAT SAIN A L'ETAT PATHOLOGIQUE.....	18
1. <i>État physiologique</i>	18
2. <i>État pathologique</i>	18
3. <i>Traitement</i>	19
Prévention.....	19
Traitement mécanique.....	19
Traitements complémentaires.....	19
II. LES IMPLANTS DENTAIRES : DE L'ETAT SAIN A L'ETAT PATHOLOGIQUE.....	21
1. <i>Implants dentaires en situation saine</i>	21
2. <i>Processus pathologique des maladies péri-implantaires (MPIs)</i>	22
Épidémiologie.....	23
Relations entre les Maladies Péri-implantaires (MPIs) et les Maladies Parodontales (MPs).....	23
3. <i>Traitements actuels des péri-implantites</i>	24
III. ALTERNATIVES AUX ANTIBIOTIQUES.....	26
1. <i>Antiseptiques</i>	26
2. <i>Phages (ou bactériophages)</i>	26
3. <i>Peptides antimicrobiens (PAM) : caractères communs</i>	26
Historique.....	27
Structure de base.....	27
Mode d'action antibactérienne.....	27
Diversité d'action en milieu naturel.....	28
Historique et classification.....	29
4. <i>PAM dérivés de la chromogranine A (Cg A)</i>	30
Physiologie.....	31
Structure de base.....	31

Les vasostatines (VS)	32
La chromofungine (CHR).....	32
La catestatine (CAT).....	32
La cateslytine (CTL).....	33
5. Traitements médicaux et autres applications	34
IV. SPECIFICITES DES ASSEMBLAGES IMPLANTAIRES	35
1. Anatomie.....	35
2. Matériaux	36
3. Biomécanique et biologie : introduction au manuscrit 1.....	37
V. GELS EN MEDECINE.....	45
1. Définition.....	45
2. Classification	45
3. Utilisation biomédicale.....	46
3. 1 Matrices de gel.....	46
3. 2 Antimicrobiens ajoutés aux gels.....	48
VI. OBJECTIF DE LA THESE	53
PARTIE II : CARACTERISATION PHYSICOCHIMIQUE DU GEL.....	55
I. PREPARATION DU GEL.....	56
1. Préparation chimique préalable	56
2. Réhydratation	57
3. Fonctionnalisation	58
4. Gélification	58
II. MATERIEL.....	59
Principe	59
Matériels et méthodes généraux.....	60
1. Domaine d'élasticité du gel.....	61
Méthode.....	61
Résultats.....	61
Discussion	62

2. Cinétique de gélification	62
Méthode	62
Résultats	63
Discussion	65
3. Stabilité thermique	65
Méthode	65
Résultats et discussion	66
4. Tests d'adhésion (tacking test)	66
4.1 Tests d'adhésion sur plateau en acier inox	66
Matériels et méthodes	66
Résultats	67
Discussion	72
4.2 Tests d'adhésion au titane et aux tissus mous	73
Matériels et méthodes	73
Résultats et discussion	74
5. Stabilité des gels en milieu aqueux	76
Matériels et méthodes	76
Résultats et discussion	76
PARTIE III : BIOLOGIE - INTERACTION DU GEL AVEC LE VIVANT	77
I. ÉVALUATION DES COMBINAISONS « GEL-ANTIMICROBIENS »	78
1. Matériels et méthodes	78
Molécules antibactériennes	78
Pathogènes testés	78
Milieux de culture	79
Réalisation du gel	79
Tests antibactériens utilisés	80
2. Résultats et discussion	81
Évaluation des gels antimicrobiens sur <i>P. gingivalis</i>	81
Évaluation des gels antimicrobiens sur <i>E. coli</i>	86
Évaluation de D-CTL sur <i>S. aureus</i>	88
Évaluation de D-CTL sur <i>C. albicans</i>	88
II. ÉVALUATION DU RELARGAGE DES PEPTIDES HORS DU GEL PAR FLUORESCENCE	90

1. <i>Matériels et méthodes</i>	90
2. <i>Résultats et discussion</i>	91
III. ÉVALUATION DES PEPTIDES RELARGUES PAR HPLC ET MALDI-TOF	92
1. <i>Objectifs</i>	92
2. <i>Matériels et méthodes</i>	92
3. <i>Résultats et discussion</i>	93
Analyse par HPLC.....	93
Analyse par spectrométrie de masse	94
IV. ÉVALUATION DE LA COLONISATION BACTERIENNE EN SURFACE ET AU SEIN DU GEL	98
1. <i>Matériels et méthodes</i>	98
Préparation des gels	98
Traitement des gels	99
Visualisation des gels.....	100
2. <i>Résultats et discussion</i>	101
Microscopie Optique - gel sans antimicrobien	101
Microscopie Électronique à Balayage.....	105
V. TESTS DE BIOCOMPATIBILITE	109
1. <i>Objectifs</i>	109
2. <i>Matériels et Méthodes</i>	109
Culture cellulaire	109
Tests utilisés	109
3. <i>Résultats et discussion</i>	110
VI. INTRODUCTION AU MANUSCRIT 2 (PLOS ONE) ET AU POSTER I	112
PARTIE IV : TEST D'ÉTANCHEITE DES CONNECTIQUES SUR BOITES	127
I. INTRODUCTION	128
II. OBJECTIFS	131

III. MATERIELS ET METHODES	133
1. <i>Préparation des implants et des boîtes</i>	133
2. <i>Céramisation du puits de vissage</i>	134
3. <i>Préparation initiale des couronnes</i>	135
4. <i>Assemblage des couronnes dans les implants</i>	135
Vissage.....	135
Fermeture du puits de vissage.....	136
Mise en place du milieu de culture.....	137
Incubation et suivi	138
Visualisation au Microscope (MEB)	138
IV. RESULTATS	140
1. <i>Microbiologie</i>	140
2. <i>Visualisation MEB</i>	143
Assemblage représentatif du Groupe 2 (collé sans gel)	143
Assemblage représentatif du Groupe 4 (collé avec gel)	158
Assemblage représentatif du Groupe 1 (vissé sans gel)	163
V. DISCUSSION	164
VI. INTRODUCTION AU POSTER II	166
PARTIE V : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	168
PARTIE VI : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	174
PARTIE VII : PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	191
PUBLICATIONS	192
COMMUNICATIONS	193
PARTIE VIII : ANNEXES	195

Liste des figures

<i>Figure 1 : coupe d'assemblage implant/pilier/couronne après ostéointégration (Davarpanah et al. 2009)</i>	21
<i>Figure 2 : péri-implantite</i>	22
<i>Figure 3 : comparaison maladie parodontale/maladie péri-implantaire</i>	23
<i>Figure 4 : structure des peptides antimicrobiens (schéma de Jenssen et coll. 2006)</i>	27
<i>Figure 5 : schéma des mécanismes d'action possibles des PAM avec des membranes (Li et al. 2017)</i>	28
<i>Figure 6 : schéma de la Chromogranine A bovine</i>	31
<i>Figure 7 : positionnement vertical de l'implant : les différentes options (d'après Hermann et coll.)</i>	36
<i>Figure 8 : assemblage implant-pilier : les portes d'entrées bactériennes.</i>	37
<i>Figure 9 : préparation de la chaîne d'alginate-catéchol (Lee et al. 2013)</i>	48
<i>Figure 10 : structure chimique de l'alginate catéchol et du Pluronic bis-SH</i>	57
<i>Figure 11 : alginate catéchol</i>	57
<i>Figure 12 : diagramme de phase sol/gel pour une solution d'AC à 0,5% en masse en présence de différentes concentrations en PlubisSH, avec et sans NaIO₄.</i>	57
<i>Figure 13 : rhéomètre : outil et principe</i>	59
<i>Figure 14 : domaine d'élasticité du gel</i>	61
<i>Figure 15 : cinétique de gélification</i>	63
<i>Figure 16 : cinétique de gélification avec et sans inclusion de D-CTL dans le gel</i>	64
<i>Figure 17 : comparaison de la cinétique de gélification entre l'AC1% en masse et un mélange AC 0,5% en masse (a)-PlubisSH 16% en masse (b) (F= 1Hz, déformation = 1%, expériences effectuées à 37 °C)</i>	64
<i>Figure 18 : évaluation de la stabilité thermique du gel</i>	66
<i>Figure 19 : test d'adhésion effectué après 15 minutes de vieillissement du gel d'AC à 1 % en masse</i>	67
<i>Figure 20 : évolution des forces d'adhésion de gels d'AC 1% après différents temps de prise</i>	68
<i>Figure 21 : comparatif des forces maximales d'adhésion pour la 1^e et la 2^e évaluation,</i>	69
<i>Figure 22 : tableau récapitulatif des valeurs de travail en fonction de la vitesse de retrait et du temps de vieillissement</i>	71
<i>Figure 23 : énergie d'adhésion du gel d'AC 1%</i>	71
<i>Figure 24 : adhésion des gels au titane et à la gencive</i>	74
<i>Figure 25 : variation de la masse relative des gels en milieu aqueux en fonction du temps de stockage dans le tampon PBS.</i>	76
<i>Figure 26 : test Alamar Blue – viabilité de P. gingivalis sur des gels d'AC chargés en L-CTL à 500 µM</i>	81

Figure 27 : formation de colonies de <i>P. gingivalis</i> au contact de gels chargés en L-CTL (500 μ M, soit 0,930 mg/mL), sur boîtes de pétri	82
Figure 28 : contamination de boîtes de pétri (+24 heures) par <i>P. gingivalis</i>	83
Figure 29 : effet bactéricide (+ 24h) de l'association amoxicilline/ D-CTL au sein du gel sur <i>P. gingivalis</i>	85
Figure 30 : pourcentage d'activité antimicrobienne des CTL sur <i>E. coli</i>	86
Figure 31 : concentration initiale de D-CTL en mg/mL introduite dans le gel	88
Figure 32 : évaluation de la CMI de D-CTL sur <i>C. albicans</i> à 24 heures	89
Figure 33 : relargage du CTL-rhodaminé hors des gels (peptide compound release)	90
Figure 34 : analyse HPLC de L et D-CTL à 24 h - comparaison PAM pur et surnageant	93
Figure 35 : analyse au spectrophotomètre de masse de D-CTL : forme oxydée (a) et réduite (b)	94
Figure 36 : analyse spectrophotométrique des surnageants du gel AC1% L-CTL	95
Figure 37 : analyse spectrophotométrique des surnageants du gel AC1% D-CTL	95
Figure 38 : sites préférentiels de clivage pour le peptide CTL	96
Figure 39 : montage du gel dans des seringues	98
Figure 40 : gel d'AC1% sans antimicrobien + <i>P. gingivalis</i> - vues microscope optique	101
Figure 41 : gel d'AC1% sans antimicrobien au contact de <i>P. gingivalis</i> : vues MET	103
Figure 42 : gel d'AC 1% avec D-CTL et amoxicilline + <i>P. gingivalis</i> – vues microscope optique	105
Figure 43 : gel d'AC 1% pur- vue MEB	105
Figure 44 : gel sans antimicrobien au contact de bactéries à 24h – vues MEB G X 100 à G X 5000	107
Figure 45 : gel avec D-CTL – vues MEB G X 100 à G X 5000	108
Figure 46 : test live/dead – image de microscopie à fluorescence	110
Figure 47 : test Alamar Blue sur des fibroblastes humains au contact de surnageant de gel	111
Figure 48 : couronne transvissée avec Ti-base	128
Figure 49 : systèmes de vissage avec puits de vissage angulé (images : NobelBiocare)	129
Figure 50 : montage d'une couronne transvissée : possibilités de passage bactérien	131
Figure 51 : assemblage FCZ, Nobelbiocare : trait de section de l'implant	134
Figure 52 : céramisation du puits de vissage	134
Figure 53 : assemblage prothétique démonté et vissé dans la boîte	136
Figure 54 : protocole clinique de fermeture du puits de vissage	137
Figure 55 : mise en place du milieu de culture	138
Figure 56 : contamination à 1 mois	141
Figure 57 : réensemencement des compartiments	141
Figure 58 : taux d'échantillon contaminés en fonction du temps	142

<i>Figure 59 : assemblage Ti-base/couronne non contaminé, vue MEB</i>	144
<i>Figure 60 : couronne collée avec connectique non contaminée, vue MEB</i>	144
<i>Figure 61 : implant avec connectique non contaminée (groupe 2), vue MEB</i>	146
<i>Figure 62 : vis avec connectique non contaminé, vue MEB</i>	148
<i>Figure 63 : téflon avec connectique non contaminé, vue MEB</i>	149
<i>Figure 64 : comparaison des joints de collage des assemblages collés</i>	150
<i>Figure 65 : couronne collée avec connectique contaminée, vue MEB</i>	152
<i>Figure 66 : implant avec connectique contaminée, vue MEB</i>	153
<i>Figure 67 : vis avec connectique contaminée, vue MEB</i>	154
<i>Figure 68 : téflon avec connectique contaminée, vue MEB</i>	155
<i>Figure 69 : comparaison de la connectique implant contaminé/implant non contaminé</i>	156
<i>Figure 70 : implant « non contaminé », vue MEB</i>	158
<i>Figure 71 : couronne « non contaminée » avec gel, vue MEB</i>	159
<i>Figure 72 : vis « non contaminée » avec gel, vue MEB</i>	160
<i>Figure 73 : bouchon de téflon, échantillon « non contaminée » avec gel, vue MEB</i>	162
<i>Figure 74 : visualisation joint Ti-base/ couronne : vue du Ti-base contaminée</i>	163
<i>Figure 75 : vue de la connectique d'un Ti-base non contaminé (Groupe 1)</i>	164

Liste des abréviations

AA : acide aminé

AB : antibiotique

AC : alginate catechol

Alg : alginate

AMP : peptide anti microbien

C. albicans : *Candida albicans*

CAT : catestatine

CgA : chromogranine A

CHR : chromofungine

CMC : carboxyméthyl cellulose

CMI : concentration minimal inhibitrice

CS : chitosan

CTL : cateslitine

D : dextrogyre

DO : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

F. nucleatum* ou *F. n : *Fusobacterium nucleatum*

GAG : glycosaminoglycanne

GS : gelling solution (solution de gélification)

HA : hydroxy-apatite

HAI : health care-associated infection

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

JCI : joint couronne-implant

JCI : joint couronne/Implant

JPI : joint pilier-implant

JTBI : joint Ti-base/Implant

L : lévogyre

LPS : lipopolysaccharide

M : molaire

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight

MEB : microscopie électronique à balayage

MET : microscope électron

MIC : minimal inhibitory concentration (concentration minimale inhibitrice)

MO : microscopie optique

MPIS : maladie péri implantaire

NAM : nano antimicrobial molecule

P. gingivalis* ou *P.g : *Porphyromonas gingivalis*

PAM : antimicrobial peptide

PEG : polyéthylène glycol

Plu : acide pluronique

PM : poids moléculaire

PVA : polyvinyl alcool

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SEM : Scanning Electro Microscopy

TEM : transmission electronic microscopy

TFA : trifluoroacetic acid

VS : vasostatine

Résumé de thèse

Les maladies péri-implantaires (MPIs) des maladies inflammatoires d'origine bactérienne, liées à la plaque dentaire. Non douloureuses et de diagnostic souvent tardif, elles commencent par une inflammation de la gencive marginale péri-implantaire et peuvent évoluer vers une péri-implantite. L'os alvéolaire est alors détruit, laissant les spires de l'implant exposées (Renvert and Polyzois 2018). La bactérie *P. gingivalis* est particulièrement incriminée dans les processus de destruction avec un de ses facteurs de virulence, le lipopolysaccharide (LPS).

L'assemblage implant-prothèse possède de nombreux espaces vides, liés à la structure et à la précision des pièces prothétiques. *Ce microgap* est facilement colonisable par les bactéries : il s'ouvre jusqu'à environ 60 µm sous contraintes dynamique pour certains systèmes (Zipprich et al. 2007), créant un effet de pompage vis-à-vis des différents fluides buccaux (Steinebrunner et al. 2005). Les bactéries peuvent circuler entre le milieu buccal et ces espaces, qui constituent de véritables réservoirs microbiens que le patient ne peut pas nettoyer. Ainsi, un joint pilier-implant contaminé constitue une épine irritative en face de tissus péri-implantaires fragiles.

Il existe actuellement de très nombreux traitements des MPIs, allant de la résection des tissus contaminés à leur reconstruction. De façon similaire aux maladies parodontales, des traitements antibiotiques sont généralement administrés par voie générale, sans qu'il y ait actuellement de consensus. Les molécules de choix sont l'amoxicilline dont le spectre est large, associée au métronidazole qui est particulièrement efficace sur les bacilles Gram-négatif, dont *P. gingivalis*. Les antibiotiques locaux et les autres traitements locaux antiseptiques peuvent être également mis en place, mais ils ne sont efficaces que sur une courte période seulement. Ils se présentent la plupart du temps sous forme de gels colloïdaux qui se désagrègent sur le long terme.

Les hydrogels se sont développés en médecine ces dernières années. Principalement constitués d'eau, ils ont une consistance physique associée à une structure chimique. Leur base est une matrice de polymères synthétiques ou de polysaccharides, souvent antimicrobiens, d'origine ou d'inspiration naturelle comme le chitosan, l'acide hyaluronique ou l'alginate. La L-DOPA est un acide aminé qui en conditions oxydatives, forme une structure poly(DOPA) fortement adhésive, comme cela a été montré dans le cas du pied de la moule marine, le bysuss, et qui lui permet une forte adhésion au rocher. En 2013, Lee et coll. s'en sont inspirés en conjuguant des groupements catéchols à des chaînes d'alginate, également d'origine marine, pour créer un hydrogel, l'alginate-catéchol (AC). Afin de rendre ces gels

antimicrobiens pour une application chez l'homme (pharmaceutique ou dispositif médical), de très nombreuses combinaisons gel/agents antimicrobiens sont actuellement testées, et sélectionnées en fonction de leurs applications.

Parmi ces agents antimicrobiens, les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des agents anti-infectieux majeurs et naturellement présents dans les organismes agressés. Ils font partie de la première barrière de défense des individus dans l'immunité non spécifique. Ils sont impliqués dans de nombreux autres processus tels que l'inflammation, l'immunomodulation ou la réponse immunitaire spécifique. Chargés positivement et de nature amphipathique, ils se lient à la membrane de la bactérie chargée négativement, la déstabilise et entraînent sa destruction. Les PAMs représentent une alternative aux antibiotiques car ils n'entraînent presque pas de résistance. Ils sont bien tolérés par les individus hôtes, et agissent contre de nombreux microorganismes : bactéries, virus, levures et champignons. Les PAMs dérivés de la chromogranine A (CgA) sont particulièrement intéressants chez l'homme : cette protéine est produite de façon naturelle par les cellules nerveuses, neuroendocrines et immunitaires. Au cours d'une stimulation de ces cellules, la CgA subit une protéolyse pour donner lieu à un ou plusieurs fragments, dont certains ont des propriétés antimicrobiennes. Parmi ces peptides, les plus actifs sont les vasostatines, la chromofungine, la catestatine (CAT) et la cateslytine (CTL). Ils ont une structure courte en hélice- α en présence des membranes biologiques, sont constitués d'environ 20 à 25 acides aminés, sont stables à température corporelle, à pH acide et en présence de sérum. Ils sont faciles à synthétiser, pour un coût raisonnable. La CTL est la partie N-terminale active de la CAT. Elle est proportionnellement plus riche en charges positives que CAT, ce qui la rend particulièrement active contre les bactéries et les levures. La configuration spatiale naturelle de la CTL est lévogyre (L) mais récemment, il a été démontré que la substitution énantiomérique par des acides aminés en conformation dextrogyre (D) augmentait l'activité antimicrobienne de la CTL par sa résistance à la dégradation protéolytique. De plus, ces peptides s'avèrent efficaces sur des souches bactériennes impliquées dans les maladies parodontales et les MPIs, telles que *P. gingivalis*, *P. intermedia* et *F. nucleatum* (Zaet et al. 2017).

Notre travail de thèse a consisté à imaginer puis développer un gel antibactérien qui puisse être injecté dans les connectives implantaires de façon préventive, notamment chez les patients à risque de développer des MPIs. Ce gel doit pouvoir également être injecté dans la connective en cas de péri-implantite afin d'obturer les espaces contaminés, après les avoir désinfectés. Nous avons retenu l'alginate-catéchol comme matrice car nous recherchions un hydrogel aux propriétés adhésives en milieu humide. Afin d'améliorer les propriétés biomécaniques de l'hydrogel, l'AC a été mélangé à l'acide pluronique F127, modifié par rajout de deux groupes sulfidryles (bisSH).

Dans une première partie, nous avons caractérisé le gel d'AC d'un point de vue physico-chimique. L'adjonction de NaIO₄ et de NaOH permet au gel de suivre une transition solution-gel irréversible à 37°C et d'obtenir un gel chimique. La concentration idéale du gel pour le manipuler facilement est de 1% en masse, ou de 0,5%, mélangé avec de l'acide pluronique bisSH à 18%. Les premières expériences de rhéologie évaluent la viscoélasticité du gel. Les cinétiques de gélification indiquent que G' dépasse G'' en moins d'une minute, ce qui est caractéristique de la prise d'un gel chimique, et compatible avec les temps d'usage en pratique clinique odontologique. L'ajout de plubisSH augmente considérablement G' jusqu'à environ 900 Pa. Les variations de température entre 25 et 50°C n'affectent pas les propriétés viscoélastiques du gel. Les tests d'adhésion montrent que plus le gel vieillit et plus la force d'adhésion maximale est importante (1,8 N à 18 heures). Avec le temps, les quinones libres et réactives vis-à-vis des surfaces externes s'agencent entre elles, et améliorent la structure chimique du gel aux dépens de leurs propriétés adhésives. L'énergie d'adhésion des gels d'AC1% reste globalement à environ 1 J.m⁻² pour une vitesse de retrait de 1mm.s⁻¹. Elle augmente jusqu'à 10 J.m⁻² pour les gels d'AC/plubisSH avec les tissus vivants grâce aux groupes SH disponibles. Enfin, les gels évalués s'avèrent stables dans un milieu aqueux (PBS) à + 30 jours, sans perte de volume.

Dans une deuxième partie, nous avons évalué les propriétés biologiques des gels. Des tests antimicrobiens ont été effectués sur des bactéries à Gram négatif (*E. coli* en tant que modèle, et *P. gingivalis*), *S. aureus* (bactérie à Gram positif) et sur *C. albicans*. Les premiers résultats mettent en évidence une bactéricidie du gel sur *P. gingivalis* à une concentration de 500 µM pour L-CTL (dans les deux gels), et de 250 µM pour D-CTL (dans l'AC seul). *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans* sont sensibles à la même concentration de D-CTL dans l'AC. Les observations en microscopie optique et électronique confirment bien l'absence de *P. gingivalis* au contact du gel en présence de D-CTL ou d'amoxicilline, contrairement aux gels non chargés en agents antimicrobiens. L'analyse par fluorimétrie indique que 10% de la CTL rhodaminée est relarguée hors du gel. L'examen de ce surnageant par HPLC corrobore ces résultats, mais il montre que le peptide relargué hors du gel est dégradé. En effet, l'observation par spectrométrie de masse des pics récupérés en HPLC atteste que les éléments retrouvés sont des fragments peptidiques de L et D-CTL. Un certain nombre d'entre eux possède encore le site actif LSFR, ce qui expliquerait la persistance de leur activité antibactérienne. La majeure partie de la CTL reste donc incluse dans le gel, participant à sa structure et restant disponible potentiellement en cas d'altération du gel dans le temps.

Par ailleurs, les tests de biocompatibilité (Alamar Blue et Live/dead) du surnageant des gels sur des fibroblastes humains indiquent une parfaite biocompatibilité, proche de 100% en accord avec les données de Lee et coll. (Lee et al. 2007).

Dans une dernière partie, nous avons souhaité mettre en application le gel dans les connectiques implantaire et évaluer *in vitro* leur colonisation interne. Par un système de boîtes étanches développé dans le cadre de notre thèse, nous avons évalué la contamination de l'extérieur vers l'intérieur de la connectique, de façon qualitative et sur trente jours. La première manipulation montre que les bactéries ne rentrent pas dans les connectiques avec le gel chargé en D-CTL. Sur des observations en MEB, elles sont particulièrement présentes sur les zones rugueuses de la couronne et sur le joint de collage Ti-base/couronne. Lorsque le gel est absent, les bactéries passent par le joint Ti-base/implant et le joint Ti-base/couronne si la couronne n'est pas collée au Ti-base.

En conclusion, le gel d'AC chargé en D-CTL s'avère prometteur en tant que matériau injectable dans les connectiques implantaire pour la prévention des maladies péri-implantaires. Facile et rapide à manipuler, il pourrait être disponible en seringue automélangeuse. Sa tenue dans le temps est fiable en milieu humide. Il présente des propriétés adhésives aux parois implantaire particulièrement intéressantes, agissant comme une barrière mécanique contre les bactéries, et se déformant en fonction des contraintes absorbées par l'assemblage prothétique. La présence de D-CTL est une véritable alternative aux antibiotiques car elle limite les phénomènes de résistance.

PARTIE I :

Introduction et Objectifs de thèse

I. Le parodonte : de l'état sain à l'état pathologique

1. État physiologique

La cavité buccale est une région du corps humain particulière. Sa flore est représentée par plus de 10 milliards de micro-organismes, répartis en plus de 700 espèces différentes et présentes sur toutes les régions anatomiques de la bouche : langue, gencive, dents...

Elle est composée de virus, levures, champignons et surtout de bactéries, en équilibre les unes avec les autres, formant un biofilm (Lin 2017). Cette structure est hautement organisée en un microbiome (Lederberg and MacCray 2001) : les colonies bactériennes représentent 15 à 20% du volume, et s'organisent dans une matrice d'exopolysaccharides représentant 75% à 80% du volume, et qui permet un échange d'informations et de métabolites entre les bactéries. Ce réseau permet également d'éliminer les différents produits antibactériens.

Cliniquement, le biofilm est présent sous forme de plaque dentaire, dépôt collant blanchâtre les premiers jours, puis rapidement sous la forme de tartre si rien n'est effectué pour le perturber. La plaque dentaire et le tartre se forment principalement sur les reliefs anatomiques marqués, notamment au niveau du collet dentaire en regard du sulcus. Si le biofilm est laissé en place, sans nettoyage, sa composition va changer : les bactéries anaérobies se développent et s'organisent en profondeur en « complexes » (Socransky et al. 1998; Socransky and Haffajee 2005; Haffajee et al. 2008). Leur potentiel parodontopathogène étant plus élevé, elles libèrent plus de facteurs de virulence que les bactéries en surface et participent à la destruction des tissus parodontaux (Marsh 2005).

2. État pathologique

Dans tous les cas, la première réaction est une inflammation de la gencive, ou gingivite, qui concerne plus de 90 % de la population (Pihlstrom, Michalowicz, and Johnson 2005). Elle se manifeste principalement par un saignement spontané ou au brossage dentaire. Le biofilm est présent dans le sulcus, et les bactéries colonisent également les tissus mous environnants : épithélium jonctionnel et partie superficielle de l'attache conjonctive. Si l'inflammation persiste dans le temps, l'attache conjonctive est atteinte et se détruit (perte d'attache dentaire) et forme une « poche parodontale », dans laquelle le biofilm continue de se développer (Kjeldsen, Holmstrup, and Bendtzen 1993). Le ciment est contaminé et l'os crestal est à son tour détruit par l'ostéoclasie consécutive à l'inflammation : c'est le début de la maladie parodontale, ou parodontite. La destruction peut aller jusqu'à un stade avancé,

entraînant une mobilité dentaire amenant à la perte de l'organe dentaire, par manque de soutien osseux. Cette maladie chronique inflammatoire d'origine infectieuse concerne environ 15% de la population (Albandar, Brunelle, and Kingman 1999). L'évolution varie considérablement en fonction des patients ; la destruction osseuse se déroulant parfois en quelques semaines, mais le plus souvent en plusieurs années.

D'autres facteurs de risque, parfois modifiables (habitudes ou état de santé), peuvent s'ajouter à ce phénomène : tabac, maladies cardiovasculaires, diabète type II, susceptibilité génétique, grossesse etc. (Kinane, Stathopoulou, and Papapanou 2017). La réponse de l'individu (réponse de l'hôte) au biofilm varie selon ces différents éléments.

3. Traitement

Prévention

Un des buts de la prévention est d'empêcher le biofilm de se former. Sa désorganisation commence par des méthodes adaptées de brossage quotidien à mettre en place lors de l'enseignement à l'hygiène bucco-dentaire : passage de fil dentaire ou de brossettes interdentaires pour éliminer la plaque dentaire entre les dents, brosse à dent adaptée à l'inflammation et au biotype parodontal etc. Ainsi, la prévention limite la survenue de maladies parodontales sur du long terme (Tonetti et al. 2017). Certains facteurs de risque de la parodontite peuvent être modifiés préventivement, comme le tabac.

Traitement mécanique

Le traitement mécanique professionnel de base est le détartrage/déplaquage conventionnel, à réaliser régulièrement, tous les six mois à un an au minimum selon les besoins du patient ('CADTH Rapid Response Reports' 2016). Le détartrage fait ainsi entièrement partie de la prévention des maladies parodontales (Kinane, Stathopoulou, and Papapanou 2017). Lorsque la maladie parodontale est déjà présente, le traitement consiste à réaliser en plus un détartrage sous-gingival, accompagné d'un surfaçage doux des racines contaminées (Ciantar 2014; Smiley et al. 2015).

Traitements complémentaires

De nombreuses thérapies adjuvantes existent à ces thérapeutiques non chirurgicales, leur rôle étant d'agir de façon synergique aux traitements de base. Étant donné que le biofilm agit comme une barrière contre les agents anti-infectieux traditionnels par son organisation (Roberts and Mullany 2010), tous les

traitements adjuvants devront être administrés en parallèle d'un traitement mécanique, et non seuls (Chalas et al. 2015).

Les traitements antibiotiques (par voie générale) sont les plus fréquemment administrés en renfort d'un traitement mécanique lorsque l'inflammation est particulièrement marquée (Feres 2008). Les principales bactéries visées sont les plus pathogènes retrouvées dans les complexes orange et rouge, mais aussi celles des autres complexes (Socransky et al. 1998). L'une des bactéries du complexe rouge, *Porphyromonas gingivalis*, libère un facteur de virulence, le lipopolysaccharide (LPS) qui est particulièrement retrouvé dans les destructions parodontales (Mysak et al. 2014). De même, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* n'appartient pas aux complexes les plus pathogènes mais est retrouvé dans certaines formes agressives de maladies parodontales (Aberg, Kelk, and Johansson 2015).

Le choix de référence actuel est une association de molécules : l'amoxicilline, dont le spectre est large, combinée au métronidazole, qui agit sur les bactéries à Gram négatif (Zandbergen et al. 2016). L'utilisation des macrolides seuls ou combinés avec le métronidazole s'avère également efficace grâce à la bonne pénétration tissulaire des macrolides (tissu osseux) (Poulet et al. 2005; Ercan, Uzun, and Ustaoglu 2015). Ainsi, les associations d'antibiotiques permettent une synergie entre les molécules pour améliorer leur efficacité (Mombelli 2012).

Les antibiotiques locaux existent depuis longtemps en parodontologie, leur but étant d'augmenter localement les concentrations par rapport à des antibiotiques pris par voie générale. Les plus fréquemment utilisés sont des dérivés de la famille des cyclines (doxycycline, minocycline ou tétracycline) et parfois le métronidazole. Leur principale indication concerne le traitement des poches parodontales inflammatoires, profondes, récidivantes et localisées. Mis en place après assainissement de la poche parodontale, ils existent sous de nombreuses formes : gel en seringue injectable, pommade, membranes etc. De nombreuses études ont montré une amélioration dans l'efficacité du traitement, mais de façon limitée sans distinguer quelle était la meilleure forme (Schwach-Abdellaoui, Vivien-Castioni, and Gurny 2000; Da Rocha et al. 2015). La prescription des antibiotiques doit être bien mesurée car il existe un certain nombre de risques : allergie ou intolérance, résistances bactériennes menant à leur inefficacité, ou perturbation du microbiotome humain. Leur utilisation dans des formes modérées de maladie parodontale n'apporte qu'un faible effet clinique, et leur usage doit être limité (Jepsen and Jepsen 2016), comme certaines situations à risque tel que les patients diabétiques (Rovai et al. 2016) ou chez les fumeurs (Assem et al. 2017). Un récent rapport de consensus encourage les prescripteurs à ces pratiques (Pretzl et al. 2019).

II. Les implants dentaires : de l'état sain à l'état pathologique

1. Implants dentaires en situation saine

Les implants dentaires sont des racines artificielles en titane mises en place dans l'os alvéolaire restant, dans le but de remplacer une dent lorsque celle-ci est manquante sur l'arcade dentaire. Un processus « d'ostéointégration » suit la chirurgie implantaire : le tissu osseux vient se fixer sur la surface implantaire, permettant une stabilisation de l'implant (**figure 1**). Ce phénomène de cicatrisation se stabilise au bout d'une année, mais le remodelage osseux commence entre 6 et 12 semaines après le placement de l'implant, et continue toute la vie (Bosshardt, Chappuis, and Buser 2017). La suprastructure prothétique définitive est mise en place dès que la gencive environnante est globalement stabilisée, en moyenne trois mois après la pose de l'implant.

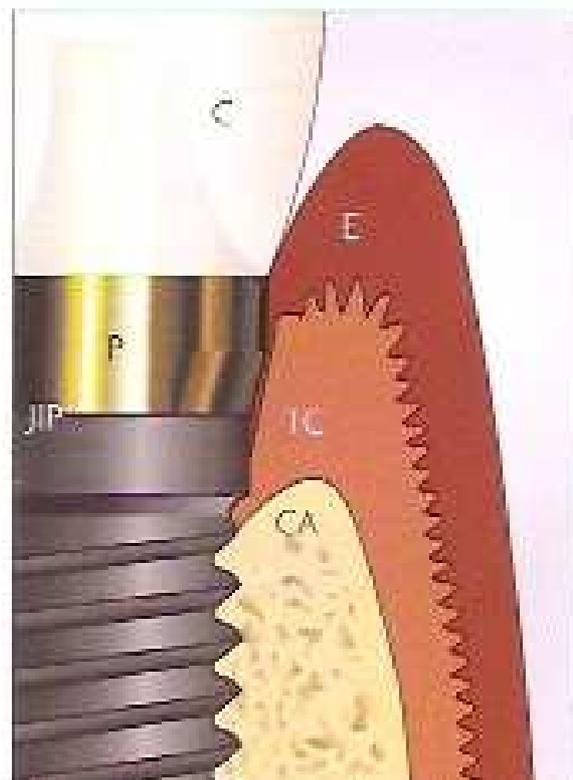


Figure 1 : coupe d'assemblage implant/pilier/couronne après ostéointégration (Davarpanah et al. 2009)

Après cicatrisation, une épaisseur d'environ deux millimètres de tissu conjonctif (TC) se positionne au-dessus de la crête alvéolaire (CA). Il est composé de fibres circulaires qui ne s'attachent pas directement sur le pilier, ni sur l'implant. Au-dessus, l'épithélium de jonction (E) plonge vers le fond du sulcus (S) en direction de la base du pilier (P), en direction de la jonction pilier/implant (JIP ou JPI).

2. Processus pathologique des maladies péri-implantaires (MPIs)

La péri-implantite est une inflammation d'origine bactérienne qui affecte les tissus mous et durs autour d'un implant ostéo-intégré. Chronologiquement, les MPIs commencent par une inflammation marginale de la muqueuse péri-implantaire liée à une accumulation de plaque dentaire (mucosite péri-implantaire) (Berglundh et al. 2018). À ce stade, la gencive saigne au brossage ou au sondage parodontal, et l'épithélium de jonction commence à se détacher des matériaux implantaires. Si aucun traitement n'est réalisé à ce stade, la mucosite peut évoluer en péri-implantite. Dans ce cas, le tissu conjonctif inflammé se réduit en épaisseur et se décolle des matériaux implantaires. Les bactéries et les facteurs de virulence contaminent la crête alvéolaire sous-jacente, qui se réduit en hauteur et se détache progressivement de l'implant. L'épithélium suit cette destruction et plonge apicalement, formant une poche péri-implantaire (**figure 2**). Il y a ainsi une perte osseuse (par rapport à un état précédent) diagnostiquée par radiologie, et confirmée au sondage parodontal (Renvert et al. 2018).

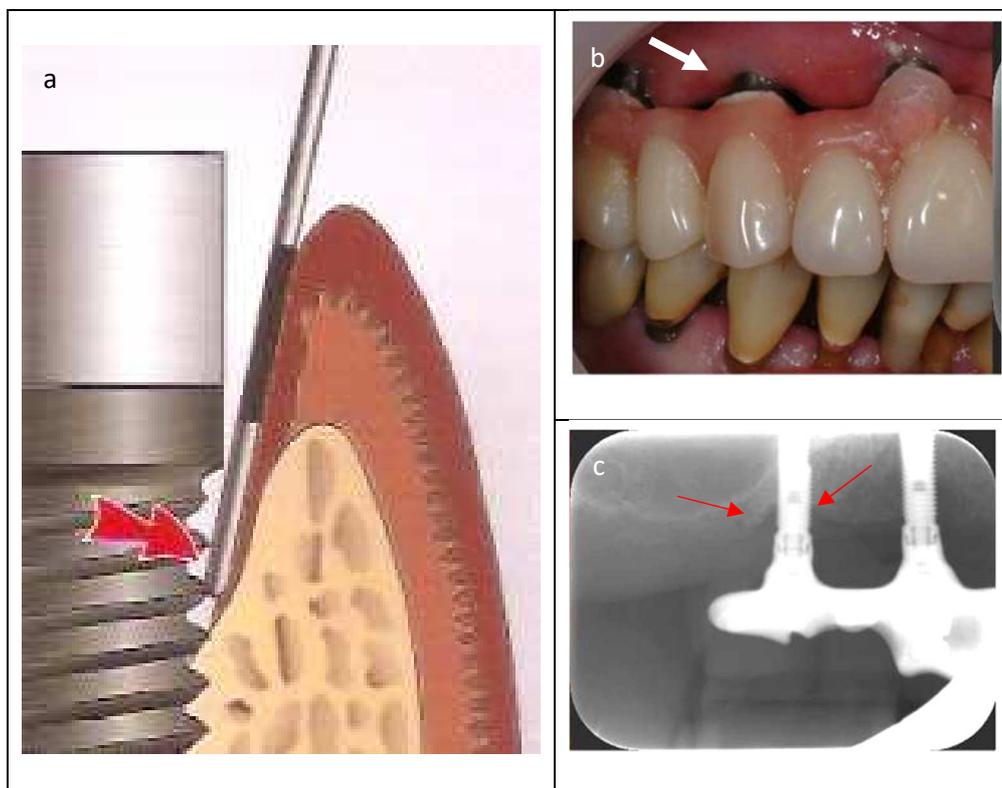


Figure 2 : péri-implantite

La destruction osseuse progresse vers l'apex de l'implant (2a, d'après Davarpanah et coll.). Cliniquement, la gencive laisse à découvert les surfaces implantaire contaminées (2b). La lyse osseuse présente une forme angulaire et circulaire tout autour de l'implant (2c). Photos 2 b-c : (Øilo and Bakken 2005).

Épidémiologie

La prévalence des patients atteints de mucosite péri-implantaire atteint jusqu'à 80%, et celle des patients atteints de péri-implantites varie de 20 à 56% selon les études et la définition exacte de la maladie (Lindhe and Meyle 2008; Smeets et al. 2014; Lee et al. 2017; Salvi, Cosgarea, and Sculean 2019). Ces pathologies constituent ainsi une préoccupation de santé publique majeure.

Relations entre les Maladies Péri-implantaires (MPIs) et les Maladies Parodontales (MPs)

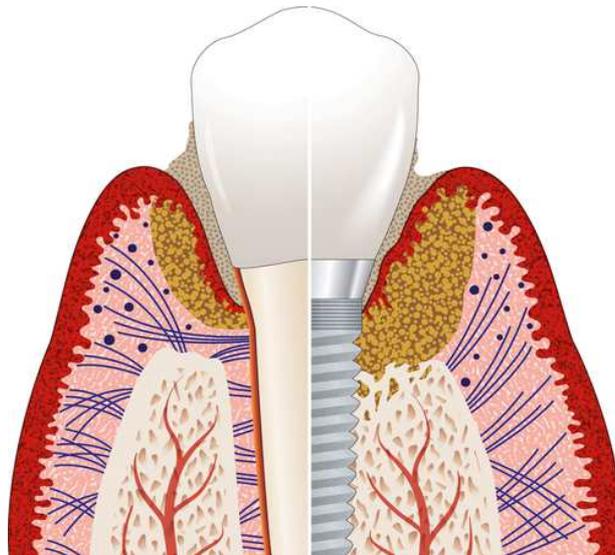


Figure 3 : comparaison maladie parodontale/maladie péri-implantaire

A gauche du schéma, la destruction parodontale des MPs. L'os alvéolaire et le ligament alvéolo-dentaire sont progressivement détruits. A droite, l'os alvéolaire est directement au contact de l'implant, sans ligament. Les bactéries des MPIs ne sont pas freinées par ce ligament, et détruisent directement l'os alvéolaire (Giovannoli and Renvert 2012).

Bien que le processus physiopathologique de destruction des tissus péri-implantaires soit différent de celui des tissus parodontaux (Salvi, Cosgarea, and Sculean 2017) (**figure 3**), il existe un certain nombre de similitudes :

- étiologie bactérienne : dans les deux entités, il existe un noyau commun dans leur microbiotome (Pokrowiecki et al. 2017) et dans l'organisation en biofilm (Mishler and Shiau 2014), mais leur profil microbien est différent (Ting et al. 2018). Certaines spécificités sont par exemple liées aux bactéries en contact des biomatériaux (céramique, titane, etc.).

- Facteurs de risque : ce sont les mêmes que pour les MPs (Dreyer et al. 2018). Les flores bactériennes peuvent être particulièrement sensibles à ces facteurs, comme par exemple le tabac (Tsigarida et al. 2015).

Les patients atteints de MPI (et dans une moindre mesure avec antécédents de MP), ayant une flore pathogène et virulente, sont des patients à risque de développer des MPIs (Monje et al. 2014; Renvert and Persson 2009; Konstantinidis et al. 2015). Les risques de développer une MPI sont également plus élevés chez les patients atteints de maladies cardio-vasculaires ou de diabète type II mal équilibré (Ting et al. 2018).

- Diagnostic : il est plus compliqué que pour les dents naturelles, et une standardisation des critères (besoins spécifiques du patient, facteurs de risque) pourrait aider à ne pas passer à côté d'une maladie péri-implantaire (Tsigarida et al. 2015). Il semble que certains marqueurs spécifiques du fluide crévulaire pourraient aider au diagnostic initial, à l'évaluation de son activité ou de sa résolution (Wohlfahrt et al. 2014; Hall et al. 2015).

3. Traitements actuels des péri-implantites

La prise en charge implantaire ne s'arrête pas à la pose de l'implant. La gestion des facteurs de risque (tabagisme, maladie systémiques et parodontites) est un élément prédéterminant, favorisant le succès du traitement (Neves et al. 2018). Une méta-analyse récente montre que la maintenance est nécessaire, comme pour les maladies parodontales, afin de diminuer le risque de MPI (Monje et al. 2016).

Une vue d'ensemble récente des différentes revues systématiques montre qu'il existe actuellement de nombreux traitements possibles pour la prise en charge des MPIs, sans que l'un d'entre eux s'avère nettement plus efficace que les autres (Ting et al. 2018).

Les mucosites péri-implantaires ou les formes modérées de péri-implantites peuvent être traitées non chirurgicalement (curettes, ultrasons), par photothérapie dynamique ou au laser, le tout associé ou non à des antibiotiques (Figuro et al. 2014). Les chirurgies sont résectrices pour l'élimination des lésions péri-implantaires, régénératrices ou reconstructrices pour remplir les défauts osseux, en associant dans

les deux cas une décontamination de la surface implantaire (Smeets et al. 2014; Renvert and Polyzois 2018). Elle permettent de recréer un environnement de tissus mous péri-implantaires suffisamment épais pour maintenir une hygiène bucco-dentaire satisfaisante (Borghetti and Monnet-Corti 2017).

Il existe peu d'études évaluant l'influence des antibiotiques sur le traitement des MPIs (Renvert, Polyzois, and Claffey 2012). D'après une revue systématique, une étude à risque de biais montre à 4 mois une amélioration de la profondeur de poche en combinant antibiotiques locaux et débridement manuel (Esposito, Grusovin, and Worthington 2012). Une autre étude fait appel à des fibres imprégnées de tétracycline laissées en place dans la poche implantaire pendant 10 jours, et fixées avec une colle cyanoacrylate. Les résultats de traitement sont meilleurs à 3 mois avec ces fibres, mais l'étude nécessite plus de patients afin de confirmer ces résultats préliminaires (Schenk et al. 1997). Dans tous les cas, l'effet des antibiotiques par voie locale semble limité (Figuro et al. 2014).

Les antibiotiques de référence par voie orale restent l'amoxicilline (ou la clindamycine en cas d'allergie), le métronidazole, certains macrolides (azithromycine) et parfois les cyclines comme la doxycycline. Ces molécules sont administrées seules ou en association comme l'amoxicilline et le métronidazole, de façon similaire aux MP. Dans une étude récente, des souches bactériennes prélevées sur des implants atteints de MPIs sont testées avec ces antibiotiques *in vitro*. Il en résulte que plus de 70% des patients montrent des résistances à au moins un antibiotique testé. Cependant, seulement 6,7% des souches testées présentent des résistances à l'association amoxicilline/métronidazole (Rams, Degener, and van Winkelhoff 2014). Cette combinaison s'avère donc la plus efficace, et l'objectif est de pouvoir administrer un traitement sur la plus courte durée, avec la concentration maximale inhibitrice (CMI) la plus faible possible.

Les traitements actuels des MPIs passent par une désinfection mécanique des tissus mous : élimination mécanique des tissus contaminés, utilisation de techniques récentes de décontamination (laser, photothérapie...) et éventuellement, reconstruction des tissus lésés. Un traitement antibiotique est recommandé de la même façon que pour le traitement des MP. Le plus souvent, il est pris sur une à deux semaines, par voie générale, et avec les mêmes molécules que pour les MP, l'association amoxicilline/métronidazole étant la meilleure.

III. Alternatives aux antibiotiques

1. Antiseptiques

Différents antiseptiques ont déjà été testés, notamment :

- Chlorhexidine à 0,12 % en bain de bouche, une fois par jour pendant trois mois après le traitement initial
- Irrigation sous gingivale à la chlorhexidine 0,06%
- Brossage à l'aide d'une brosette interdentaire imprégnée de gel de chlorhexidine 0,5%, autour de l'implant, deux fois par jour pendant 4 semaines (Heitz-Mayfield et al. 2011)
- Protocoles mixtes combinant gels et bains de bouche à la chlorhexidine à différentes concentrations
- Bains de bouche aux huiles essentielles (Listerine®), 2 fois 30 secondes pendant 3 mois

Ces méthodes variées diminuent le saignement au sondage, mais ne modifient pas le niveau osseux et la profondeur au sondage. De plus, ces études sont menées seulement sur un an pour les plus longues et elles n'ont pas toujours les contrôles nécessaires (Figuro et al. 2014). Les antiseptiques sont ainsi un traitement d'appui du au traitement principal.

2. Phages (ou bactériophages)

Ce sont des virus qui s'attaquent aux bactéries. L'arrivée et le succès des antibiotiques après la Seconde Guerre mondiale les ont fait tomber dans l'oubli en Europe de l'Ouest, contrairement à l'ex-URSS. Avec le développement des résistances et des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, ils présentent un regain d'intérêt ces dernières années, car ils ne présentent que très peu de résistance. Leur multiplication est rapide et fournit une bactéricidie rapide et intense, mais il existe une spécificité d'un phage pour chaque famille de bactéries. Utilisés en combinaison avec les antibiotiques, ils peuvent avoir une action synergique (Ravat, Jault, and Gabard 2015). Le cadre réglementaire de leur utilisation limite pour l'instant leur usage, mais ils s'avèrent prometteurs, notamment dans le traitement de pathologies orales comme les maladies parodontales ou péri-implantaires, où certaines souches sont plus pathogènes que d'autres (Shlezinger et al. 2017).

3. Peptides antimicrobiens (PAM) : caractères communs

Les peptides antimicrobiens sont produits par de nombreux organismes comme première ligne de défense contre les microorganismes (Hancock and Lehrer 1998; Diamond et al. 2009).

Historique

Le lysozyme, une protéine bactériolytique, fut le premier PAM observé (Fleming and Allison 1922). En 1925, Gratia et coll. mettent en évidence que le « principe P » (découvert plus tard sous le nom de colicine) inhibe des souches de *E. coli*. En 1939, la gramicidine, issue de *Bacillus brevis*, est mise en évidence pour son activité sur un large spectre de bactéries Gram positives (Dubos and Cattaneo 1939). Parmi les propriétés antimicrobiennes, l'activité antibactérienne fut la première à être mise en évidence (Mattick and Hirsch 1947). Ils ont été isolés à partir de microorganismes, de plantes, d'insectes ou de vertébrés (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006). Actuellement, des centaines de peptides sont déjà identifiés, ce qui montre leur importance dans le système immunitaire inné non spécifique (Hancock and Diamond 2000; Wang, Li, and Wang 2016; Abdelhamed et al. 2015).

Structure de base

Ils sont en général relativement courts (12 à 100 acides aminés) (Ramesh et al. 2016; Lai and Gallo 2009), chargés positivement (2 à 9 charges positives) et amphiphiles.

Les peptides cationiques présentent des structures générales assez similaires, avec des conformations qui reviennent fréquemment : peptide amphiphile avec deux à quatre feuillets- β , peptide amphipathique en hélice α , structure en boucle et structure étendue (**figure 4**). Cependant, ils possèdent des structures secondaires très différentes qui constituent leurs spécificités.

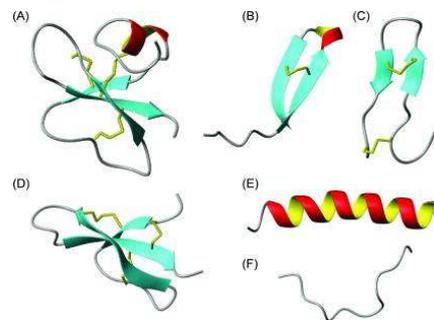


Figure 4 : structure des peptides antimicrobiens (schéma de Jenssen et coll. 2006)

(A) : Structure mixte de β -défensine-2 humaine ; (B) : boucle thanatine ; (C) : feuillet- β polyphémusine ; (D) : défensine-1 de rein de lapin ; (E) : hélice- α de la magainine-2 ; (F) : structure linéaire de l'indolicine. Les ponts disulfures sont indiqués en jaune.

Mode d'action antibactérienne

Tous les peptides antibactériens cationiques interagissent avec la membrane cytoplasmique. Leur activité est directement liée à certaines de leurs propriétés (**figure 5**) :

- Leur charges positives interagissent avec les lipides anioniques ou d'autres éléments des bactéries, plus chargées négativement que les cellules eucaryotes
- L'hydrophobicité pour la pénétration à travers la membrane lipidique

- La mobilité, permettant au peptide de passer d'une conformation en solution à une conformation transmembranaire (Hancock and Rozek 2002; Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Chronologiquement, la première étape est l'interaction électrostatique entre les peptides chargés positivement et les composants chargés négativement sur la bactérie, comme le LPS des Gram négatives ou l'acide lipoteichoïque des Gram positives (**figure 5**). Les peptides adoptent alors une structure en hélice- α peu flexible, ce qui rigidifie la membrane et crée des pores (Sugawara et al. 2010). Pour les Gram négatives, le peptide est inséré dans la membrane externe grâce à des structures semblables à cette membrane. Il vient la déstabiliser puis la perméabilise. Par des interactions hydrophobes et des forces électrostatiques, le peptide traverse ensuite la membrane cytoplasmique.

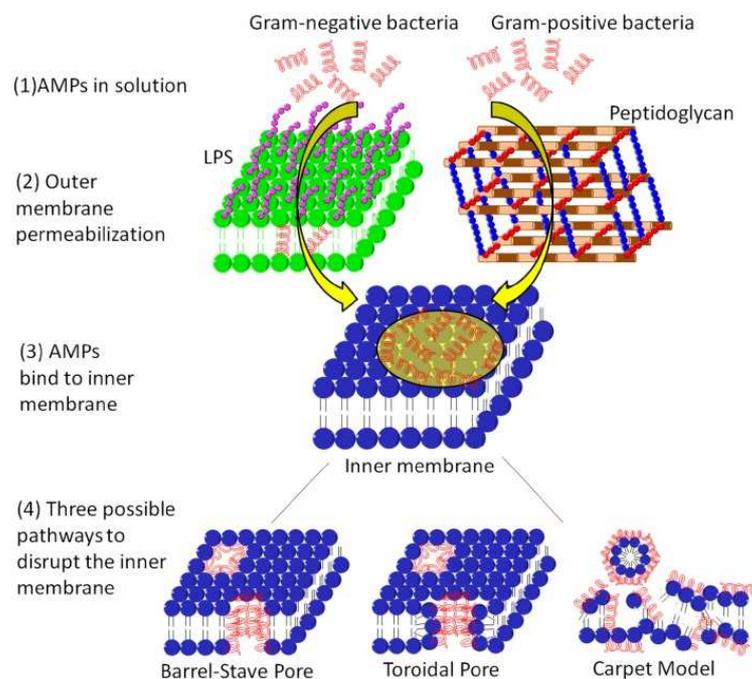


Figure 5 : schéma des mécanismes d'action possibles des PAM avec des membranes (Li et al. 2017)

Pour passer la membrane interne, il existe plusieurs possibilités selon la configuration des peptides. Soit ils passent à travers les deux membranes en « douve de tonneau », soit ils les relient en formant un pore toroïdal, soit ils tapissent les lipides, et passent finalement à travers.

Différents modèles de passage ont déjà été proposés (formation d'un tunnel provisoire ou de micelles, translocation à travers la membrane etc.). Si les concentrations de peptides cationiques sont suffisantes, la majorité des bactéries, des virus et des champignons ne survit pas à ce stade (Zhang, Rozek, and Hancock 2001; Nagy et al. 2015). Ils représentent ainsi une classe d'agents anti-infectieux vaste et prometteuse (Scorciapino et al. 2017; Kang et al. 2017).

Diversité d'action en milieu naturel

L'expression de ces peptides peut être constitutive ou induite par un processus inflammatoire ou infectieux, comme le LPS ou des cytokines (Cunliffe and Mahida 2004; Hancock 2001). Dans des conditions physiologiques, l'activité antimicrobienne est assurée par la présence des fortes concentrations de cations mono ou divalents, de protéases, d'anions polyvalents (comme les glycosaminoglycanes) et de concentrations faibles de peptides (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006). Les PAM sont également capables de déclencher les mécanismes de phagocytose, de stimuler le relargage de prostaglandine, de neutraliser les effets septiques du LPS, de promouvoir le recrutement des cellules de l'immunité spécifique sur les sites inflammatoires (Elsbach 2003; Yang et al. 2002), de stimuler l'angiogenèse (Koczulla et al. 2003) et d'induire la cicatrisation (Chan and Gallo 1998). Ils ont également un rôle dans la réponse immunitaire en agissant dans le chimiotactisme des monocytes humains (Territo et al. 1989) et des lymphocytes T (Chertov et al. 1996). Ils possèdent aussi un effet polarisant qui influence le développement des cellules dendritiques (Davidson et al. 2004).

En tant qu'éléments de « l'ancienne » réponse immunitaire innée, les peptides agissent directement sur les organismes pathogènes, en les envahissant et en les tuant. Ensemble, ils ont une activité antifongique et antibactérienne, parfois antivirale ou antiparasitaire (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Cependant, leur rôle dans l'organisme est beaucoup plus général, car ils sont impliqués dans l'orchestration de la réponse immunitaire innée et dans la réponse inflammatoire (Hancock and Diamond 2000). Par exemple, les α -défensines sont présentes à de fortes concentrations bactéricides dans les neutrophiles, mais elles agissent probablement d'abord comme immunorégulateur, à plus faible concentration relarguée sur les sites inflammatoires (Jenssen, Hamill, and Hancock 2006).

Historique et classification

Il existe de nombreuses classifications de PAM, établies au fil de leur découverte, mais aucune ne fait actuellement consensus. Ils peuvent être classifiés en fonction de leur espèce d'origine, de leur effet antimicrobien, selon leur structure ou l'organe où ils sont produits.

Certains peptides produits par les bactéries, les bactériocines, possèdent une activité particulièrement élevée (Klaenhammer 1988). Les invertébrés, ne dépendant que d'un système de défense immunitaire non spécifique, possèdent des peptides remarquablement efficaces. Parmi eux, les hélices- α de

cécropine ou de melitine, ou les peptides en épingles à cheveux- β de tachyplesine ou polyphémusine. (Zhang et al. 2000).

L'hélice- α de la magainine issue de la peau de xénope possède une activité forte de perméabilisation des membranes sur les bactéries Gram positives et négatives, les virus, les levures et les champignons (Zasloff 1987).

Le groupe des cathélicidines est largement représenté chez les vertébrés. Ils ont un segment N-terminal bien conservé (domaine catheline), qui est clivé pour donner le peptide mature. Les neutrophiles sont les principaux pourvoyeurs de ce peptide, mais ils sont également retrouvés dans la bouche, les reins, et les kératinocytes de la peau lors de processus inflammatoires, libérant la cathélicidine humaine (LL37) (Frohm et al. 1997). Au-delà du site N-terminal, il existe des structures diverses : hélice- α , feuillets- β , structures en épingles à cheveux, régions riches en arginine. LL-37 a même déjà été retrouvée déficiente dans certains types de parodontites chroniques, et pourrait être marqueur des MPs (Putsep et al. 2002).

Un autre groupe de peptides est la famille des défensines (Selsted and Ouellette 2005). Ces peptides cycliques sont classifiés en trois sous-catégories, basées sur l'existence de pont disulfures entre leur six cystéines conservées (α et β défensines), ou sur leur nature macrocyclique (θ -défensines). Les deux premières catégories sont retrouvées dans les granules des neutrophiles, dans les macrophages, et dans de nombreux tissus humains : la peau, les cellules épithéliales, et certaines muqueuses de surface.

4. PAM dérivés de la chromogranine A (Cg A)

Les chromogranines sont des protéines retrouvées dans les granules de sécrétion des cellules immunitaires, endocrines, neuroendocrines et des neurones (Helle 2004). La chromogranine A est la principale protéine de cette famille. Elle a été plus récemment retrouvée dans d'autres cellules, comme les cardiomyocytes (Pieroni et al. 2007), les keratynocytes (Corti and Ferrero 2012) et les neutrophiles (Briolat et al. 2005). En cas d'infection, elle est libérée dans le serum ou la salive afin d'arriver sur le site malade (Aslam et al. 2012; Metz-Boutigue et al. 2003).

Physiologie

La médullosurrénale est la partie centrale de la glande surrénale. Elle représente environ 20% de son volume, et contient les cellules chromaffines. Elles sécrètent la principale source d'hormones du groupe des catécholamines, à savoir l'adrénaline (90%) et la noradrénaline (10%). D'autres protéines telles que chromogranine A et de nombreux peptides sont aussi sécrétés (Metz-Boutigue et al. 1998; Taupenot, Harper, and O'Connor 2003), ainsi que la morphine et des enzymes protéolytiques (prohormone convertase), qui agissent sur les sites de clivage de la chromogranine A (Seidah and Chretien 1999). La chromogranine A est également un marqueur biologique de pathologies comme le diabète, ou certaines tumeurs neuroendocrines (Marotta et al. 2018; Broedbaek and Hilsted 2016).

Structure de base

La chromogranine A possède un poids moléculaire de 48 kDa. Sa forme humaine comporte 439 acides aminés (AA) (Konecki et al. 1987), et sa forme bovine 431 AA. Certains de ses sites sont particulièrement favorables à la phosphorylation et à l'O-glycosylation.

Les différents fragments dérivés de la CgA ont ainsi des actions physiologiques très variées (Bauer et al. 1999). Ils sont obtenus après clivage sur des sites sensibles par des enzymes. L'une d'entre elles, la carboxypeptidase H, agit entre les AA 78 et 79 pour donner deux fragments : la vasostatine-I et la prochromacine (Metz-Boutigue et al. 1993; Strub et al. 1996; Lugardon et al. 2000). La CgA est un précurseur d'autres peptides, notamment : la vasostatine-II (CgA₁₋₁₁₃), la chromofungine (CgA₄₇₋₆₆), et à l'autre extrémité, la catestatine (CgA₃₄₄₋₃₆₄) et la cateslytine (CgA₃₄₄₋₃₅₈) (Briolat et al. 2005) (**figure 6**).

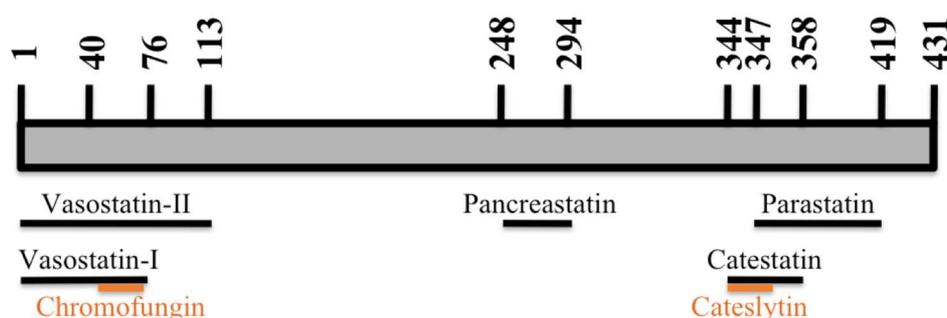


Figure 6 : schéma de la Chromogranine A bovine

La protéine possède plusieurs sites de clivage, donnant lieu à différents peptides antimicrobiens. Les fragments N terminal (AA 1 à 76 : CgA₁₋₇₆) et C terminal (AA 316 à 431 : CgA₃₁₆₋₄₃₁) sont hautement conservés dans l'évolution des mammifères, et correspondent aux peptides chromofongine et cateslytine (Benedum et al. 1987).

Les vasostatines (VS)

Ce sont les peptides issus de la partie N-terminale de la CgA (**figure 6**) (Aardal and Helle 1992) qui assurent des activités diverses dans l'homéostasie cardiovasculaire (Tota, Cerra, and Gattuso 2010), incluant la vasodilatation et l'inhibition de la parathormone (Russell et al. 1994; Angeletti, D'Amico, and Russell 2000). Elles participent à l'entrée du calcium dans les neutrophiles, jouant ainsi un rôle dans l'immunité (Zhang et al. 2009). Elles agissent sur les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, en modulant leur adhésion aux protéines de la matrice extracellulaire (Ratti et al. 2000).

Elles ont également une activité bactéricide et fongicide en déstabilisant la membrane microbienne (Aslam et al. 2012; Lugardon et al. 2000). La vasostatine bovine agit sur les bactéries à Gram positif, certains champignons filamenteux et certaines levures (*C. albicans*). Sa CMI est généralement comprise entre 0,5 et 3 μM . Elle n'a cependant pas d'action sur *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

La chromofongine (CHR)

Cet autre peptide est issu de la partie C-terminale de la vasostatine (**figure 6**), après clivage par l'endoprotéase Cgu-C de *S. aureus* (Aslam et al. 2012; Metz-Boutigue et al. 1993). Elle possède une structure en hélice- α cationique associée à une partie hydrophobe. Son activité est plus ciblée sur les levures et certains champignons filamenteux (Lugardon et al. 2001). Elle agit aussi sur les membranes cellulaires, et plus particulièrement sur la calmoduline, ce qui permet l'arrivée de calcium dans la cellule (Zhang et al. 2009). Elle a ainsi un rôle dans la proprioception de la douleur et sur l'inflammation en fonction de sa concentration (Ghia et al. 2004).

La catestatine (CAT)

Ce peptide est issu de la partie C-terminale de la CgA (**figure 6**), et plus précisément de la partie N-terminale de la parastatine (Fasciotto et al. 1993). Elle est constituée de 20 AA, qui forment un peptide hydrophobe (Mahata et al. 1997). Sa richesse en arginine (surtout pour sa forme bovine) lui permet de prendre une conformation en hélice- α rigide (Sugawara et al. 2010), et d'avoir une activité antibactérienne intéressante et puissante vis-à-vis des levures, des champignons, des parasites et des bactéries (Shooshtarizadeh et al. 2010).

La catestatine est un inhibiteur fort de la libération d'adrénaline (Mahata et al. 1997). Elle permet la vasodilatation et recrute de nombreux éléments de la réaction inflammatoire : neutrophiles, monocytes et mastocytes, dont elle permet la dégranulation, ainsi que leur production de cytokines proinflammatoires et de chimiokines (Zhang et al. 2009; Pasqua et al. 2017). Cet effet chimiotactique semble spécifique aux monocytes, car elle n'a pas d'effet chimiotactique sur les neutrophiles (Egger et al. 2008). En revanche, elle stimule l'ouverture de leur canaux calciques et l'entrée du calcium intracellulaire, ce qui favorise l'exocytose et la libération d'éléments de l'immunité non spécifique (Aslam et al. 2012; Zhang et al. 2009).

Elle favorise la croissance des fibroblastes en agissant comme une cytokine angiogénique (Theurl et al. 2010), et participe à la cicatrisation en stimulant les kératynocytes (Hoq et al. 2011; Radek et al. 2008).

La cateslytine (CTL)

La CTL est un peptide issu de la partie N-terminale de la catestatine (**figure 6**), grâce aux prohormones convertases 1 et 2 (PC 1 et 2), et à la cathepsine L, présentes dans les cellules chromaffines (Aslam et al. 2013).

Elle est constituée de 15 acides aminés qui contiennent son site actif, hautement conservé au cours de l'évolution (Mahata et al. 1997). Il est proportionnellement plus chargé en charges positives (arginines) que la catestatine (33% vs 23%). Il est informe en suspension aqueuse ou dans les micelles de dodécylphosphatidylcholine, mais il adopte une forme en hélice- α au contact du trifluoroéthanol, et une forme stable en feuillet- β , avec des résidus chargés positivement, disponibles pour les membranes chargées négativement (Jean-Francois et al. 2007; Jean-Francois et al. 2008; Dufourc et al. 2012).

A l'état naturel, la CTL n'est pas hémolytique pour les érythrocytes humains (Briolat et al. 2005). Elle permet de réguler l'immunité (Zhang et al. 2006), ainsi que le développement des cellules musculaires lisses (Guo, Zhou, and Sun 2011).

La CTL possède une activité antimicrobienne générale, sur les levures (*C. albicans*), les champignons et les bactéries (Briolat et al. 2005; Biswas et al. 2009; Aslam et al. 2013; Postma and Liskamp 2016; Cado et al. 2013). Afin de limiter les phénomènes de dégradation par protéolyse, une configuration dextrogyre (D) a été donnée aux acides aminés de ce peptide à la place de leur configuration naturelle lévogyre (L). Il en résulte un peptide beaucoup plus efficace sur certaines bactéries et levures (Zaet et al. 2017). Ces processus ont été mis en évidence récemment *in vitro* sur *B. subtilis* : une enzyme transforme la configuration des AA d'un peptide en modifiant la position des atomes d'hydrogène du

carbone α . Ce processus d'« épimérisation » permet de les faire passer d'une conformation L à D (Benjdia et al. 2017).

5. Traitements médicaux et autres applications

Les PAMs, de par leur demi-vie relativement courte, sont le plus souvent administrés par voie intraveineuse. Seuls quelques peptides ont actuellement une utilisation clinique : le bocéprevir et le télaprévir (hépatite C, per os), l'enfuvirtide (VIH, sous-cutané), la bacitracine (pneumonie, usage topique), la dalbavancine, la daptomycine, l'oritavancine, la teicoplanine, la télavancine, la vancomycine et la guavanine-2 contre les infections bactériennes.

Ils peuvent être associés à des multicouches de polyélectrolytes apposées sur des surfaces (Cado et al. 2013), ou inclus dans des structures tridimensionnelles comme les hydrogels (voir chapitre V) (Yang et al. 2018).

IV. Spécificités des assemblages implantaires

L'assemblage implantaire est constitué d'un implant dans lequel est vissée la suprastructure prothétique. En fonction de la situation clinique, il s'agit :

- soit d'un pilier implantaire, vissé dans l'implant. Une couronne est alors scellée avec un ciment sur le pilier par le praticien.

- soit d'une couronne transvissée, composée d'une base, généralement en titane (« Ti-base »), sur laquelle est collée la couronne. Le Ti-base assure la connexion avec l'implant. En fonction du système, la couronne peut être soit vissée directement dessus, soit collée au Ti-base préalablement au laboratoire de prothèse (voir chapitre 4). Dans les deux cas, le vissage de l'assemblage se fait à travers un puits sur la face occlusale de la dent (« puits de vissage »).

Il existe donc un joint implantaire « pilier/implant » (ou Ti-base/implant), et un joint « couronne-implant » (ou Couronne/Ti-base »), les deux représentant la connexion de l'édifice prothétique.

1. Anatomie

Tissus mous : les implants possèdent un épithélium de jonction long, contrairement aux dents qui, dans un état physiologique et non cicatriciel, possèdent un épithélium de jonction court (**figures 1 et 7**). Les fibres du tissu conjonctif sous-jacent sont circulaires et n'ont pas d'attaches avec l'assemblage implantaire. Elles sont seulement apposées contre l'assemblage.

Tissus durs : l'implant est directement au contact de l'os alvéolaire, sans ligament (**figures 1 et 7**). Le positionnement vertical de la connectique (donc du joint implantaire) varie selon le type d'implant. La majorité des implants posés dans le monde est soit en position juxta-crestale, soit en position supra-crestale. Dans ce cas, la partie « osseuse » de l'implant se prolonge par un col lisse qui s'arrête en regard de la gencive marginale. Le joint implantaire est alors à distance de la crête osseuse, contrairement aux implants juxta-crestaux.

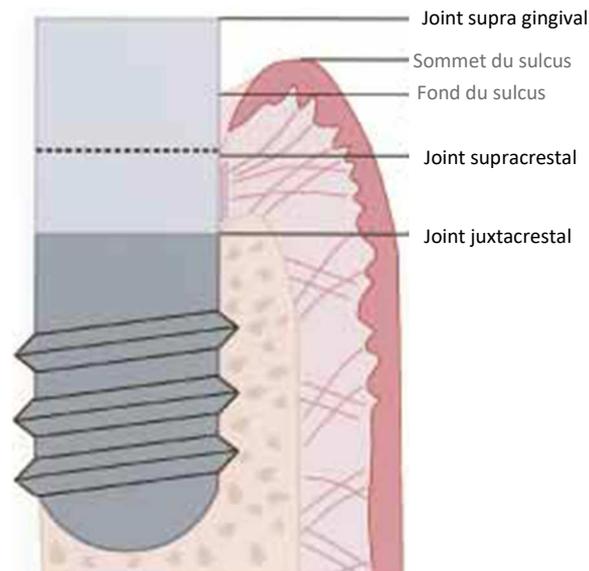


Figure 7 : positionnement vertical de l'implant : les différentes options (d'après Hermann et coll).

L'implant peut être positionné à différents niveaux. En gris clair, un positionnement implantaire supra-crestal ou supra-gingival, en gris foncé, un positionnement juxta-crestal. En fonction de la position du joint implantaire, les tissus réagiront différemment lors de la cicatrisation et face à une agression microbienne (Hermann et al. 2001).

2. Matériaux

Le titane est un des matériaux de référence pour les implants, les piliers, les Ti-base, les vis et les suprastructures prothétiques, dont les Ti-base. Le titane de grade 4 (grade relativement pur) ou de grade 5 TiAL₆V₄ (alliage de titane) sont principalement utilisés en odontologie.

La zircone est une céramique cristalline dense apparue au début des années 2000 en implantologie. Elle était initialement utilisée pour réaliser le pilier implantaire dans les situations esthétiques où le titane donne un aspect grisâtre à travers la gencive. Cependant, sa dureté beaucoup plus importante que celle du titane endommage la connectique dans l'implant (Chen et al. 2016). De ce fait, elle est actuellement utilisée en tant que couronne ou armature de la couronne supra-implantaire, qui est assemblée sur le Ti-base (prothèse « transvissée ») ou scellée sur un pilier en titane (prothèse « scellée »). Une céramique cosmétique (feldspathique) est stratifiée sur les armatures en zircone, sauf sur la zone en regard de la gencive. En effet, la zircone possède de meilleures propriétés biologiques que les autres céramiques. Une autre option actuelle consiste à utiliser à la place de la zircone des céramiques à base de disilicate de lithium. Leur structure étant moins dense, elles présentent un meilleur rendu esthétique, mais de moins bonnes propriétés mécaniques et biologiques (Brunot-Gohin et al. 2016; Tinschert et al. 2001).

3. Biomécanique et biologie : introduction au manuscrit 1

Les assemblages implantaires possèdent une mécanique totalement différente de celle des dents. En effet, les dents possèdent un ligament alvéolodentaire qui amortit directement les chocs subis lors de la mastication et de la déglutition. En implantologie, c'est la suprastructure prothétique qui absorbe ces chocs, et les dissipe. En fonction des forces impliquées, des micromouvements vont avoir lieu entre les pièces et peuvent mener à un dévissage, voire à une fracture de l'un des éléments de l'assemblage (vis, céramique, pilier ou implant).

De plus, la précision d'adaptation des pièces prothétiques au niveau de la connectique implantaire varie selon de très nombreux paramètres. Un manque d'étanchéité à ce niveau, qui peut exister également au niveau du puits occlusal (**figure 8**), laisse passer les fluides et les microorganismes, qui se retrouvent en face de tissus péri-implantaires, vivants et fragiles.

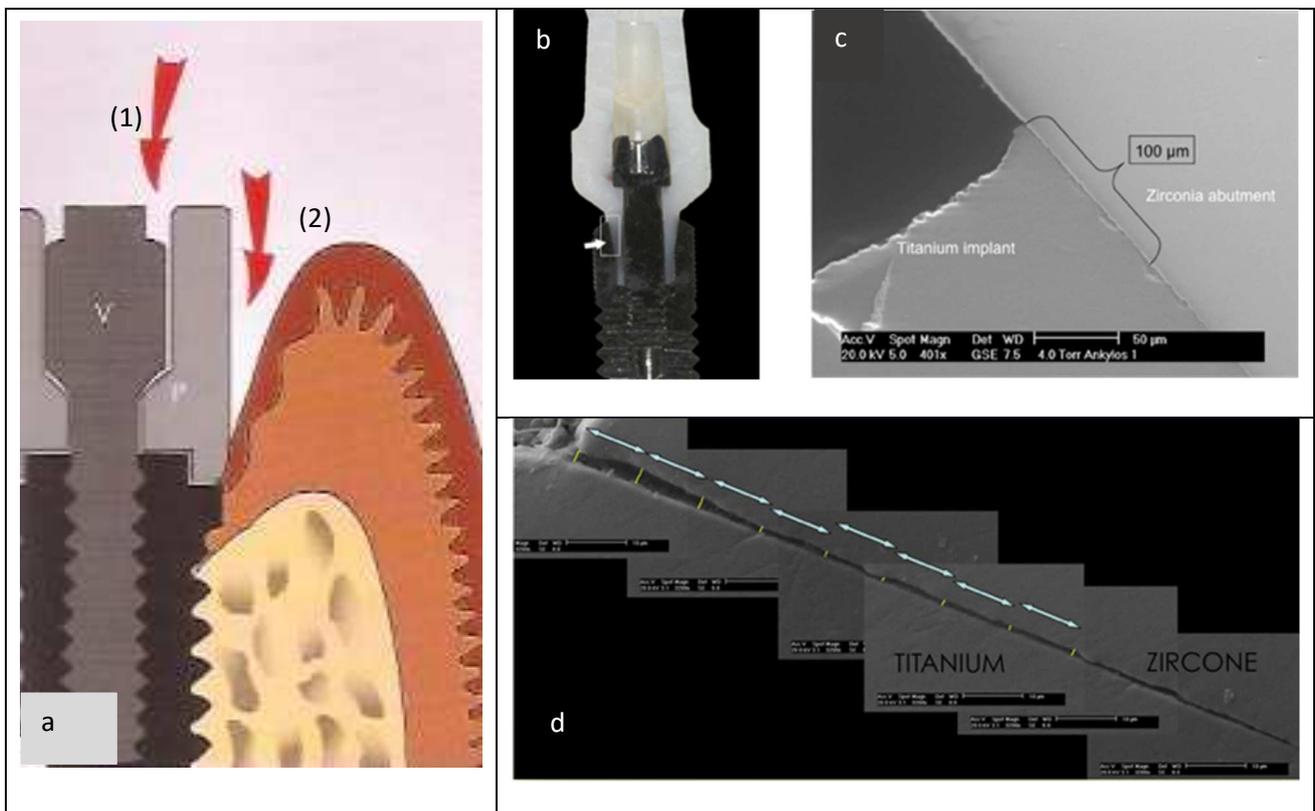


Figure 8 : assemblage implant-pilier : les portes d'entrées bactériennes.

(a) Les bactéries buccales peuvent contaminer l'intérieur de l'assemblage par le puits de vissage de la vis (1), et par le sulcus (2). Le joint pilier-implant est alors contaminé. D'après Davarpanah et coll.

(b-d) : le joint prothèse-implant n'est pas étanche à l'échelle microscopique ($> 2\mu\text{m}$), et peut laisser passer les bactéries (Baixe et al. 2010).

L'objet de cette revue (publiée en français et en vue d'être soumise en anglais (voir annexes)) est de comprendre l'importance de ces espaces spécifiques aux implants, de connaître leurs mécaniques et leurs interactions avec les tissus vivants (Baixe, Tenenbaum, and Etienne 2016).



Reçu le :
29 juillet 2015
Accepté le :
24 novembre 2015
Disponible en ligne
30 décembre 2015



Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Pénétration microbienne dans la connectique pilier-implant : revue de littérature

Microbial contamination of the implant-abutment connections:
Review of the literature

S. Baixe^a, H. Tenenbaum^b, O. Etienne^{a,*}

^a Département de prothèses, faculté de chirurgie dentaire, 8, rue Sainte-Elisabeth,
67000 Strasbourg, France

^b Département de parodontologie, faculté de chirurgie dentaire, 1, place de l'Hôpital,
67000 Strasbourg, France

Summary

Today manufacturing process of dental implant parts allows for a precision of fit between implant and abutment of several microns. This microgap opens and closes under occlusal forces, leading to a pumping effect and to a contamination of the implant from bacteria and oral fluids. This kind of contamination is seen in all systems even if less often with internal connections that offers a better fit. Apart from this junction area, the screw well is another contamination pathway if the filling materials do not guarantee a hermetic sealing. The nature of contamination depends on the surrounding oral flora. When present, contamination leads to a persistent inflammatory reaction nearby the seal. The use of antiseptics or other materials for sealing the microgap decreases the risk of contamination and improves the gingival reaction. However, these solutions are time-limited.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Dental implants, Dental abutments, Peri-implantitis

Résumé

La qualité de fabrication des pièces implantaires permet actuellement d'assurer une coaptation de quelques microns entre le col de l'implant et le pilier prothétique. Cet espace (*microgap* en anglais) s'ouvre et se ferme lorsqu'il est soumis à des forces occlusales, créant un mouvement de pompage vis-à-vis des micro-organismes et des fluides buccaux environnants et aboutissant à une possible contamination de l'implant. Cette contamination concerne toutes les connectiques, même si les connectiques internes présentent une meilleure précision d'adaptation. Hormis cette zone de jonction, une autre voie de contamination est possible par le puits de vissage si l'obturation sus-jacente n'est pas étanche. La nature de la contamination dépend de la flore environnante. Elle tend à entretenir une réaction inflammatoire en regard du joint. La mise en place d'antiseptiques, ou de dispositifs comblant le *microgap*, limite la présence de bactéries au sein de la connectique et améliore la réaction gingivale. L'effet de ces solutions reste cependant limité dans le temps.

© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Implants dentaires, Piliers implantaire, Piliers implantaires

Introduction

Les maladies péri-implantaires se sont développées avec l'implantologie. Elles surviennent souvent tardivement, plu-

sieurs mois à plusieurs années après la pose des implants [1]. La maladie est marquée par une inflammation initiale des tissus mous (mucosite péri-implantaire). Si cette dernière persiste, l'os crestal péri-implantaire est à son tour détruit, marquant le début de la péri-implantite. Dans le rapport de consensus du 6^e Workshop européen de parodontologie, la prévalence des mucosites est évaluée à 80 % des patients

* Auteur correspondant.
e-mail : olivier.etienne@unistra.fr (O. Etienne).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.revsto.2015.11.004> Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale 2015;117:20-25
2213-6533/© 2015 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

implantés, et celle des péri-implantites est comprise entre 28 % et 56 % des patients selon les études [2].

Dans la zone de connexion pilier-implant, l'espace biologique péri-implantaire est composé d'un manchon de tissu conjonctif placé au-dessus de l'os alvéolaire et qui sertit le pilier. Il est surmonté d'un épithélium de jonction long. La connectique pilier-implant est considérée comme un facteur pouvant irriter cet environnement. En effet, il existe un *microgap* ou hiatus entre les pièces implantaires dans lequel des micro-organismes peuvent se loger. Les autres espaces vides, tels que la chambre implantaire ou l'espace à proximité de la tête de vis, constituent aussi des niches colonisables. La diffusion de ces micro-organismes dans l'espace biologique péri-implantaire est susceptible de participer à son inflammation, voire à sa destruction.

L'objectif de cette revue de littérature était d'évaluer tout d'abord la précision d'adaptation et le comportement de la connectique pilier-implant de façon statique et dynamique. La pénétration des micro-organismes dans ces espaces a été ensuite examinée à travers les études *in vitro* et *in vivo*, afin de mieux comprendre ses possibles conséquences biologiques. Enfin, les solutions actuellement proposées pour étanchéifier le joint pilier-implant ont été évoquées.

Matériel et méthode

La revue concerne des articles entre 1981 et 2015, abordant la mesure *in vitro* du joint pilier-implant, la pénétration bactérienne de la connectique, les conséquences biologiques correspondantes et les systèmes d'étanchéification du joint pilier-implant. Pour cela, les bases de données de Medline (Pubmed) ont été utilisées. Les mots clés ont été : « precision of fit », « implant » et « abutment » pour la première partie, puis « implant », « abutment » et « bacteria » pour les trois parties suivantes. Les articles ou revues les plus proches de la thématique ont été choisis pour réaliser cette revue. Les résumés d'articles et les articles complets ont été sélectionnés, et les articles n'ayant pas de résumé dans Pubmed ont été éliminés. Pour les trois dernières parties, les articles n'abordant pas la contamination bactérienne des pièces implantaires ont été écartés.

Résultats et discussion

Évaluation dimensionnelle du hiatus pilier-implant

La précision de la connectique pilier-implant est étudiée depuis longtemps dans la littérature. Elle est en effet garante de la pérennité de l'édifice pilier-implant sur l'arcade. Un manque de précision d'adaptation peut entraîner des échecs mécaniques (dévissage, fracture de vis...) ou favoriser la contamination microbienne. De nombreuses

études ont évalué les dimensions du hiatus, dans des conditions statiques et/ou dynamiques.

Études statiques

L'évaluation de la coaptation du pilier avec son implant a été envisagée dans le sens vertical (hiatus) mais aussi dans le sens horizontal (adaptation des motifs anti-rotationnels). En effet, en dehors des restaurations plurales, un motif de connexion anti-rotationnel est aujourd'hui reconnu comme indispensable à la pérennité de l'assemblage. Ce motif anti-rotationnel crée un emboîtement qui ne doit pas être trop précis, sous peine de nuire à l'insertion complète du pilier. Un degré de rotation de moins de 2° d'une connexion hexagonale externe est actuellement considéré comme cliniquement acceptable [3].

Les évaluations du hiatus vertical sont généralement réalisées en microscopie électronique à balayage sur des assemblages torqués. Elles mesurent ce hiatus en moyenne autour de 5 µm [4], avec toutefois des variations entre 10 et 50 µm. Plus précisément, le hiatus varie en fonction de la zone de la mesure : il est plus ouvert en périphérie et plus fermé au centre du pilier, à proximité de la vis. La forme de la connectique n'est pas corrélée à la précision d'adaptation entre le pilier et l'implant, qui semble plutôt liée à la qualité de fabrication des piliers et/ou aux matériaux les constituant. Ainsi, la conception et la fabrication des piliers en zirconne individualisés permettent d'apporter une précision au moins équivalente à celle des piliers en titane [5].

Études dynamiques

Les études dynamiques *in vitro* cherchent à simuler les contraintes masticatoires sur les assemblages implant-pilier. Lorsque des forces latérales sont appliquées sur le pilier, le hiatus s'ouvre d'un côté et se ferme de l'autre. L'amplitude de ce mouvement dépend de l'intensité de la force appliquée, du type de connectique et de la qualité de fabrication des pièces. Deux types d'études ont été publiées dans la littérature, les premières faisant appel à des modèles mathématiques par la méthode des éléments finis, les secondes faisant appel à des techniques d'imagerie complexes.

Les études en éléments finis permettent essentiellement la comparaison entre les différentes morphologies de connectiques, mais leur interprétation est limitée par le caractère « idéal » de l'emboîtement recréé. À l'aide de cette approche virtuelle, il a été mis en évidence que sous une pression occlusale latérale, plus l'angle de la connectique interne est fermé et plus le *microgap* est faible. Au delà d'une certaine conicité, il persiste seulement de faibles différences entre les connectiques et le *microgap* ne varie presque plus. Saidin et al. ont montré qu'à conicité identique, il est similaire pour les hexagones, les octogones et les cônes morses (autour de 1 µm) [6]. Il diminue encore pour les connectiques internes non coniques (trilobes), constituées d'une partie externe en

plateau contre plateau, et d'une partie interne anti-rotationnelle (0,2 μm). Ces valeurs ne concernent cependant que la portion apicale de la connexion, car des micromouvements plus importants ont été calculés dans sa partie cervicale (autour de 2 μm).

La seconde catégorie d'études dynamiques in vitro a l'avantage de travailler sur de réelles pièces implantaires et prothétiques, soumises par conséquent à tous les défauts d'usinage éventuels. Des dispositifs font appel à la radiologie pour mesurer les ouvertures de hiatus périphérique, après application de forces transversales. Dans cette étude, les hiatus se sont ouverts à 36 μm pour des connectiques internes *bone level* et à 64 μm pour des connectiques externes supragingivales s'engageant sur le col lisse (Straumann®) [7].

Hiatus et contamination bactérienne in vitro

L'étanchéité de l'assemblage pilier-implant est généralement évaluée en plongeant un assemblage pilier-implant dans un bouillon bactérien. L'assemblage est ensuite retiré, puis dévissé. Les bactéries ayant pénétré à l'intérieur de la connectique sont soit visualisées directement, soit remises en culture. Cette approche met en évidence la colonisation centripète du hiatus [4,8-11]. Une autre approche consiste à inoculer la pointe de la vis de pilier, puis à visser l'assemblage avant de le plonger dans un milieu de culture propre. Ce dernier se trouble si les bactéries fuient à travers le joint pilier-implant, depuis l'intérieur vers l'extérieur de l'assemblage [12,13].

La majorité des études a utilisé des bactéries comme agent infectant. Les souches impliquées dans les péri-implantites sont parfois utilisées [8], mais d'autres souches plus faciles à cultiver et servant de modèle expérimental sont plus fréquemment employées [4,9,12-14]. Enfin, certains auteurs ont évalué directement la pénétration du lipopolysaccharide (LPS) en tant que facteur de virulence. Ce dernier, mesurant moins de 0,1 μm , colonise facilement des hiatus de quelques microns seulement [15].

Études statiques in vitro

Impact de la morphologie de la connectique

Aucune connectique n'est parfaitement étanche. L'étude de Jansen et al. a montré une fuite bactérienne à 14 jours avec une bactérie modèle (*E. coli*) pour tous les assemblages provenant de différents systèmes, quelle que soit la morphologie de la connectique [4].

Connectiques internes

Les connectiques internes coniques présentent la meilleure étanchéité au travers des différentes études et revues [16]. En revanche, les connectiques internes trilobes semblent plus perméables. En comparant la pénétration de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) et d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) dans les connectiques à cône

morse (Ankylos®) et trilobes (Nobel Replace®), Tesmer et al. ont montré une contamination de ce dernier système, contrairement au cône morse d'Ankylos® [8].

Connectiques externes

Dias et al. ont évalué 5 connectiques à hexagone externe. Le hiatus statique mesurait en moyenne moins de 3 μm pour tous les assemblages titane-titane testés [12]. Seul un des systèmes présentait une percolation bactérienne (dans 25 % des échantillons). Les auteurs ont conclu qu'à ce degré de précision d'adaptation, aucune corrélation directe entre la colonisation bactérienne et la valeur du hiatus ne peut être avancée. Ces résultats sont manifestement liés à la précision d'adaptation des pièces étudiées. Ils doivent toutefois être relativisés puisque l'étude a été réalisée sans contraintes dynamiques, susceptibles d'ouvrir le hiatus et d'y associer un phénomène de pompage.

Impact du diamètre de la connectique

Dans une évaluation en microscopie électronique à balayage sur deux systèmes implantaires (Bicon® et Sweden-Martina®), Pappalardo et al. ont observé que plus le diamètre de la connectique est grand, plus il laisse passer les bactéries [9].

Impact du torque et des vissages-dévisages

Le respect du torque et le nombre de vissage-dévisage sont critiques pour l'étanchéité de l'assemblage. Ils permettent de limiter, voire d'empêcher la pénétration microbienne. Après seulement 2 manipulations, 70 % des connectiques sont contaminées, contre 30 % après un seul vissage-dévisage [10].

Impact des matériaux et de leur mise en œuvre

Les matériaux constituant le pilier prothétique sont variés et dépendent de la technique de mise en œuvre. Ainsi, les techniques coulées, surcoulées ou usinées permettent le recours à des matériaux spécifiques. Même si elle n'est plus une option de première intention aujourd'hui, la réalisation d'armature de pilier ou de couronne peut faire appel à des pièces calcinables préfabriquées qui se positionnent à terme directement au contact du plateau implantaire. Initialement, ces pièces peuvent être entièrement calcinables ou conçues avec un plateau métallique pré-usiné coiffé d'une tige calcinable. L'étude de do Nascimento et al. a montré que lorsqu'ils sont traités par cire perdue selon les recommandations des fabricants, les piliers obtenus possèdent étonnamment la même étanchéité [14].

Impact de la prothèse transvissée

La contamination se fait également par le puits de vissage, mais peu d'études ont évalué cette voie de passage microbien. Quirynen et al. ont mis en culture des assemblages

partiellement et totalement immergés dans des milieux contaminés [17]. En observant la contamination de l'intérieur à 7 jours, ils ont remarqué que les assemblages complètement immergés ont une charge bactérienne plus importante que ceux dont seul le joint pilier-implant est en contact avec le milieu. L'étanchéité occlusale permet ainsi de limiter la charge bactérienne dans la connectique. Ces résultats donnent tout leur sens au respect de protocoles de fermeture des puits occlusaux.

Étude dynamique in vitro

Le pilier soumis à des contraintes s'ouvre et se ferme, ce qui va créer un effet de pompage des bactéries, de leurs métabolites et des fluides présents le long de la connectique (*pumping effect*). Steinebrunner et al. ont mis en évidence cette problématique en inoculant *E. coli* dans la chambre implantaire, puis en appliquant des forces sur un pilier dans un simulateur d'occlusion [13]. Plus le nombre de cycles était important et plus la pénétration bactérienne était marquée.

Hiatus et contamination bactérienne in vivo

Présence de bactéries dans la connectique

Origine et composition des bactéries

La composition de la flore péri-implantaire est influencée par celle des dents voisines : les bactéries présentes dans le sulcus implantaire et les compartiments internes de l'implant proviennent des sites dentaires périphériques infectés qui servent de réservoir. Initialement, Quirynen et van Steenberghe ont montré l'existence de bactéries sur le filetage de la vis après 3 mois de mise en place du pilier : principalement des cocci (86 %) et des bâtonnets non mobiles (12 %) [18]. La présence de micro-organismes mobiles (1 %) ou de spirochètes (0,1 %) est faible. Cette flore, vraisemblablement non pathogène, est liée au hiatus selon les auteurs.

Une étude récente a évalué la présence de bactéries sur des assemblages provenant de bridges transvissés ayant été portés pendant environ 9 ans, sans contexte pathologique [19]. La flore du sulcus, de la tête de vis et du pas de vis est étudiée. Des pathogènes associés aux péri-implantites sont retrouvés, ainsi que certaines bactéries inhabituelles, telles que *Helicobacter pylori* ou *Streptococcus aureus*. Même si la quantité de bactéries du pas de vis est moindre que celle du sulcus, la composition de la flore des compartiments internes était globalement proche du sulcus sain. Les auteurs ont considéré que leur colonisation se fait soit par le hiatus pilier-implant, soit par le puits de vissage poreux, et ce, de façon continue. En effet, des bactéries ne peuvent survivre dans un compartiment étanche, sans milieu de culture. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Quirynen et van Steenberghe [18]. De plus, selon les auteurs, la pénétration bactérienne est sous-estimée dans la majorité des études car dans la plupart des cas, un seul test bactérien est réalisé, sur un prélèvement

ponctuel. Certaines contaminations sont évaluées avec des bactéries volumineuses, telles que *Fusobacterium nucleatum*, ce qui ne tient pas compte de la contamination par des micro-organismes plus petits.

Chronologie de la contamination in vivo

Il a été montré que les connectiques pouvaient être contaminées au moment de la pose d'implant, des bactéries ayant été découvertes au deuxième temps chirurgical après prélèvement [18]. La colonisation se poursuit à la mise en place du pilier de cicatrisation et/ou du pilier prothétique. Enfin, le hiatus pilier-implant continue d'être envahi par les bactéries s'il est perméable ou si le puits de vissage est poreux [17]. Après un traitement parodontal, Quirynen et al. ont estimé que la flore péri-sulculaire et parodontale peut se reconstituer en une semaine. Les bactéries qui la composent et qui sont retrouvées dans les poches profondes appartiennent principalement aux complexes orange et rouge [20]. Elles sont de fait situées directement en regard du hiatus pilier-implant, qu'elles peuvent de nouveau envahir.

Impact des matériaux

Les options les plus couramment utilisées en prothèse supra-implantaire à ce jour sont constituées par des matériaux usinés, sous la forme soit de piliers standardisés, soit de piliers personnalisés. Le titane et la zircone en sont les principaux représentants. Les études in vivo récentes ont montré à ce jour que les bactéries se développent de façon similaire dans les connectiques en titane ou en zircone [21].

Implications biologiques et cliniques

Relation entre présence de bactéries intra-implantaires et inflammation

Si la résorption osseuse péri-implantaire relève d'une étiologie pluri-factorielle, pour autant, la présence d'un hiatus pilier-implant à proximité de la crête osseuse (*bone level*) est classiquement associée à un infiltrat de cellules inflammatoires. Cette observation n'existe pas en l'absence de hiatus, comme c'est le cas pour les implants à cols transgingivaux (*tissue level*). L'inflammation a été mise en évidence dans ces études précliniques, même si les implants étaient posés dans de bonnes conditions, avec un contrôle de plaque satisfaisant [18,22].

Pour Brogginini et al., la persistance de la réaction inflammatoire dans le temps a suggéré qu'il existe un chimiotactisme local, vraisemblablement dû aux bactéries présentes dans le hiatus [23]. Les polymorphonucléaires neutrophiles sont les principales cellules stimulées lors de cette réaction. Des plasmocytes et des lymphocytes sont également retrouvés à proximité de l'interface pilier-implant. En l'absence de contamination, l'infiltrat inflammatoire n'est pas présent [23]. De plus, le LPS participe à la survie des préostéoclastes via une interleukine (IL-6) dont le rôle est important dans la pathogenèse des

maladies parodontales. Ce facteur de virulence induisant la résorption osseuse, sa présence dans la connectique s'avère ainsi néfaste pour l'os crestal péri-implantaire.

Impact de la position spatiale du hiatus pilier-implant sur l'inflammation

Plus l'enfouissement sous-crestal de l'implant est marqué, plus la concentration de neutrophiles en regard et au-dessus du joint est importante. La position du hiatus joue donc un rôle dans l'intensité de la réaction inflammatoire et peut contribuer indirectement à la destruction osseuse lorsqu'il se situe en position sous-crestale [23]. Il n'y a pas ou très peu de destruction osseuse crestale en cas de joint positionné plus coronairement. Les résultats de Brogini et al. ont montré également l'existence d'un lien entre l'intensité de la réaction inflammatoire péri-implantaire et l'importance de la destruction osseuse.

Impact de la morphologie de la connectique sur l'inflammation

Les espaces vides fournissent vraisemblablement des conditions anaérobies dans lesquelles les bactéries peuvent se développer et libérer des pathogènes immunogènes. Dans une revue systématique de la littérature, Schmitt et al. ont montré que les connectiques internes coniques ont moins d'ouverture de joint et plus d'étanchéité que les autres connectiques en conditions in vitro [16], malgré un enfouissement important de la connectique dans l'implant. Ce type de connectique permettrait donc de limiter l'inflammation.

Le *platform switching* décale aussi l'interface pilier-implant vers l'intérieur de l'implant. De ce fait, la perte osseuse marginale est plus limitée. Les taux de succès et de survie implantaires sont néanmoins similaires aux autres connectiques in vivo [16].

Relation entre présence de bactéries intra-implantaires et péri-implantites

Certains auteurs constatent que *A. actinomycetemcomitans* et les bactéries des complexes orange et rouge sont présentes dans le sulcus implantaire sain, 10 ans après la mise en place d'implants [24]. Dans l'étude de Cosyn et al., les implants n'étaient pas en situation de péri-implantite. Toutefois, certains d'entre eux possédaient dans leurs compartiments internes des bactéries, telles que *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *L. buccalis*, *P. micra*, *P. melaninogenica* et *Treponema denticola* [19]. Les auteurs ont suggéré que ce réservoir peut participer au déclenchement de la péri-implantite dès que la charge bactérienne s'avère suffisante, même si les implants ont été en situation saine pendant des années. Cela limite l'efficacité des traitements chirurgicaux des péri-implantites car le sulcus est recontaminé par les bactéries présentes dans la connectique.

L'analyse histologique d'implants déposés suite à une péri-implantite avancée a montré une quantité de bactéries particulièrement élevée, le long et dans le hiatus pilier-implant [25]. La présence de cette contamination à proximité de l'os crestal est considérée comme un facteur de risque du succès implantaire [20].

Désinfection et oblitération du hiatus pilier-implant

Le lien entre l'inflammation péri-implantaire et l'existence d'un hiatus contaminé peut être évalué en étudiant l'efficacité de dispositifs obturant ou désinfectant le hiatus.

Des joints en silicone, voire en gutta percha, ont déjà été placés dans la connectique pilier-implant [4]. Une étude in vitro a montré que les joints en silicone étaient perméables aux bactéries après 2 mois dans des conditions statiques, sans évaluation de leur vieillissement lié aux contraintes mécaniques et l'environnement salivaire [11].

Parmi les propositions avancées, des gels à base de chlorhexidine, dont la concentration varie de 0,2 à 1 %, ont été mis en place dans les connectiques. Les évaluations, sur une durée de 2 à 6 mois chez l'homme, ont montré une baisse de la concentration et de la présence des pathogènes parodontaux [26]. Ces évaluations sont cependant réalisées à court terme, et il n'existe pas encore d'évaluation de l'efficacité de ce type de gel sur plusieurs années.

L'étanchéité de piliers scellés dans l'implant a été comparée à des piliers vissés conventionnels dans une étude rétrospective sur 16 ans. Des hiatus externe de 40 µm sont observés pour les piliers vissés, contre 60 µm pour les piliers scellés [27]. Les bactéries ne sont pas détectées dans ces derniers assemblages, contrairement aux piliers vissés.

L'étanchéification de la connectique par un biomatériau déformable ou la mise en place d'un gel antiseptique limite donc la pénétration bactérienne et a fortiori la réaction inflammatoire attenante. Toutefois, les études publiées à ce jour se déroulent sur un court terme et n'évaluent pas la résistance à la dégradation de ces joints dans des conditions buccales (salive, contraintes occlusales...). Un biomatériau permettant de combler le hiatus de façon durable, sans entraver l'insertion des pièces entre elles, reste une perspective clinique intéressante à développer.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Giovannoli JL, Renvert S. La prévalence. In: Péri-implantites. 1^{er} éd., Paris: Quintessence International; 2012 52-7.
- [2] Lindhe J, Meyle J, Groupe D of European Workshop on Periodontology. Peri-implant diseases. In: Consensus Report of the

- Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clinical Periodontol* 2008;35(8 Suppl.):282-5.
- [3] Binon PP. The effect of implant/abutment hexagonal misfit on screw joint stability. *Int J Prosthodont* 1996;9:149-60.
- [4] Jansen VK, Conrads G, Richter EJ. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12(4):527-40 [Erratum in *Int J Oral Maxillofac Implants* 1997;12:709].
- [5] Baixe S, Fauxpoint G, Arntz Y, Etienne O. Microgap between zirconia abutments and titanium implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2010;25(3):455-60.
- [6] Saidin S, Abdul Kadir MR, Sulaiman E, Abu Kasim NH. Effects of different implant-abutment connections on micromotion and stress distribution: prediction of microgap formation. *J Dent* 2012;40(6):467-74.
- [7] Zipprich H, Weigl P, Lange B, Lauer HC. Micromovements at the implant-abutment interface: measurement, causes, and consequences. *Implantologie* 2007;15:31-46.
- [8] Tesmer M, Walleit S, Koutouzis T, Lundgren T. Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study. *J Periodontol* 2009;80:1991-7.
- [9] Pappalardo S, Milazzo I, Nicoletti G, Baglio O, Blandino G, Scalini L, et al. Dental implants with locking taper connection versus screwed connection: microbiological and scanning electron microscope study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2007;20(1 Suppl. 1):13-7.
- [10] do Nascimento C, Pedrazzi V, Miani PK, Moreira LD, de Albuquerque Jr RF. Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1394-7.
- [11] Duarte AR, Rossetti PH, Rossetti LM, Torres SA, Bonachela WC. In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces. *J Periodontol* 2006;77:1828-32.
- [12] Dias EC, Bisognin ED, Harari ND, Machado SJ, da Silva CP, Soares GD, et al. Evaluation of implant-abutment microgap and bacterial leakage in five external-hex implant systems: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2012;27:346-51.
- [13] Steinebrunner L, Wolfart S, Bossmann K, Kern M. In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2005;20:875-81.
- [14] do Nascimento C, Barbosa RE, Issa JP, Watanabe E, Ito IY, Albuquerque Jr RF. Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:177-80.
- [15] Harder S, Dimaczek B, Acil Y, Terheyden H, Freitag-Wolf S, Kern M. Molecular leakage at implant-abutment connection-in vitro investigation of tightness of internal conical implant-abutment connections against endotoxin penetration. *Clin Oral Investig* 2010;14:427-32.
- [16] Schmitt CM, Nogueira-Filho G, Tenenbaum HC, Lai JY, Brito C, Doring H, et al. Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review. *J Biomed Mater Res A* 2014;102:552-74.
- [17] Quirynen M, Bollen CM, Eysen H, van Steenberghe D. Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study. *Clin Oral Implants Res* 1994;4:239-44.
- [18] Quirynen M, van Steenberghe D. Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study. *Clin Oral Implants Res* 1993;4:158-61.
- [19] Cosyn J, Van Aelst L, Collaert B, Persson GR, De Bruyn H. The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;13:286-95.
- [20] Quirynen M, Vogels R, Pauwels M, Haffajee AD, Socransky SS, Uzel NG, et al. Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets. *J Dent Res* 2005;84:340-4.
- [21] Salihoglu U, Boynuegri D, Engin D, Duman AN, Gokalp P, Balos K. Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2011;26:101-7.
- [22] Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited. *J Clin Periodontol* 1996;23:971-3.
- [23] Broggini N, McManus LM, Hermann JS, Medina R, Schenk RK, Buser D, et al. Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface. *J Dent Res* 2006;85:473-8.
- [24] Leonhardt A, Gröndahl K, Bergström C, Lekholm U. Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters. *Clin Oral Implants Res* 2002;13:127-32.
- [25] Covani U, Marconcini S, Crespi R, Barone A. Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces. *Implant Dent* 2006;15:298-304.
- [26] D'Ercole S, Tete S, Catamo G, Sammartino G, Femminella B, Tripodi D, et al. Microbiological and biochemical effectiveness of an antiseptic gel on the bacterial contamination of the inner space of dental implants: a 3-month human longitudinal study. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2009;22:1019-26.
- [27] Scarano A, Assenza B, Piattelli M, Iezzi G, Leghissa GC, Quaranta A, et al. A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments. *J Oral Implantol* 2005;31:269-75.

V. Gels en Médecine

1. Définition

Un gel est un réseau tridimensionnel constitué d'un solide dilué dans un fluide.

- Le réseau est solidarisé par des liaisons chimiques ou physiques, qui confèrent au gel ses propriétés mécaniques. La matrice est formée par de longues chaînes moléculaires (polymères ou macromolécules). La réticulation est effectuée par action de la chaleur, des ultra-violets ou d'un agent réticulant (en présence ou en l'absence d'un catalyseur).

- Le fluide qui imbibe le réseau est un bon solvant du réseau, aqueux pour les hydrogels, et qui permet son gonflement/dégonflement lors d'une variation de la pression osmotique.

Le gel peut se présenter ainsi en suspension (particules $> 1 \mu\text{m}$) et donner un colloïde, liquide, ou semi-solide. Il reste ainsi de façon naturelle, ou juste avant sa réticulation. Certains glucides forment des colloïdes, comme la pectine, l'amidon ou la cellulose ; mais également les protéines comme l'ovalbumine ou la gélatine. Les hydrogels sont considérés comme « superabsorbants », car ils peuvent contenir plus de 99% d'eau. La qualité de réticulation, la forme du réseau et la teneur en eau vont déterminer ainsi les propriétés physicochimiques et biologiques du gel.

Une des propriétés principales des gels est de pouvoir convertir une sollicitation mécanique en une déformation élastique grâce à leur faible rigidité. Leur forte teneur en eau leur apporte des propriétés de déformation proche de celle des tissus vivants. Ils présentent dans de nombreuses situations une excellente biocompatibilité, et peuvent être associés ou non à des agents antimicrobiens.

2. Classification

Il existe plusieurs classifications basées sur le fluide support (hydrogel/aérogel), sur l'origine (synthétique/naturelle) et la taille des charges (macro ou supramoléculaire), sur la nature de la réticulation (par addition ou condensation), son mode d'activation (température, enzymes, irradiation de haute énergie, polymérisation etc.) et la nature des liaisons donnant la structure du gel (physique, chimique, mixte) (Gulrez, Al-Assaf, and O. Philips 2011).

3. Utilisation biomédicale

Les hydrogels sont utilisés de plus en plus en pharmacologie et en biomédecine pour un très large champ d'applications (Brandl et al. 2010; Chae et al. 2014; Gupta et al. 2015). Les indications de chaque type de gel reposent principalement sur l'application souhaitée. Ils sont retrouvés dans des domaines divers, tel que la fabrication des lentilles de contact (hydrogels siliconés), dans certains pansements pour brûlés ou en recherche pour construire des échafaudages cellulaires.

3.1 Matrices de gel

Certains polymères et polysaccharides antimicrobiens ont été décrits comme support des PAM (Kong et al. 2010). Parfois, ces gels peuvent être combinés, mêlant les avantages de chacun d'entre eux, tout en restant biocompatibles (You, Xie, and Jiang 2019).

- Acide hyaluronique : c'est un polymère de diholosides (acide D-glucuronique/D-N acetyl glucosamine) liés par des liaisons glycosidiques. Il se retrouve dans tous les tissus, attaché à certaines protéines sous forme de glycosaminoglycanes (GAG). Cette longue chaîne est assez rigide et chargée négativement. Elle participe à la rétention de l'eau et constitue un gel assez visqueux et élastique, adapté à subir de fortes contraintes mécaniques. On le retrouve ainsi dans les cartilages. Il est efficace dans les processus de cicatrisation de la peau (Neuman et al. 2015).

- Chitosane (ou chitosan (CS)) : ce polyholoside est constitué d'une distribution aléatoire de glucosamine lié en β (1-4) (unité desacétylée) et de N-acétyl-D-glucosamine. Il est produit en désacétylant la chitine, l'un des composants majeurs de l'exosquelette des crustacés et des insectes. On le retrouve également dans les parois cellulaires des champignons et des algues. Ce biopolymère cationique se fixe facilement aux lipides, et possède des propriétés antibactériennes naturelles (Tsao et al. 2010; Ahsan et al. 2018). Il pourrait être appliqué en revêtement de dispositifs médicaux comme les implants dentaires afin de prévenir les infections bactériennes (Campos et al. 2015; D'Almeida et al. 2017).

- Acide alginique (alginate) : c'est un polymère d'acide guluronique et d'acide mannuronique. À l'état naturel, il vient d'une algue marine, *Macrocystis pyrifera* et *Ascophyllum nodosum*. Il est beaucoup utilisé dans l'industrie agro-alimentaire, en odontologie pour la réalisation des pâtes à empreintes

dentaires et pour créer des hydrogels en recherche (Lee and Mooney 2001). L'alginate de sodium est très soluble dans l'eau contrairement à l'acide alginique qui est presque insoluble. La formation du gel se fait par interaction des polymères hydrophiles avec des cations inorganiques multivalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Ba^{2+}). Il peut être utilisé en tant que matrice pour délivrer des médicaments (Giri et al. 2012). Cependant, le gonflement, la viscoélasticité et les propriétés biophysiques du gel ne sont pas évidentes à contrôler par ce type de liaison. De nombreuses autres méthodes ont été essayées pour réaliser la réticulation, mais elles se sont avérées cytotoxiques (Jeon et al. 2009).

- Alginate catéchol : Récemment, la dopamine a été greffée à des chaînes d'alginate, pour former une matrice d'alginate-catéchol (AC) (Lee et al. 2013). Dans des conditions oxydantes, les catéchols réagissent entre eux pour former la matrice du gel. Ce système est inspiré du pied de moule marine (*mytilus edulis*), le byssus, qui adhère à son substrat rocheux malgré les courants et les vagues (Lee, Messersmith, et al. 2011), et *a fortiori* sur n'importe quel type de matériau (Kang et al. 2010) (**figure 9**). Il est constitué de multiples petits filaments contenant des fibres riches en kératine et en L-DOPA. Cet acide aminé issu de la tyrosine est très représenté dans ses protéines mefp-5 et mefp-3 ; et permet une forte adhésion en milieu aqueux (**figure 9**) (Danner et al. 2012).

La dihydroxy-L- phénylalanine (L-DOPA), possède une activité redox permettant des liaisons oxydatives pour former le réseau protéique. Dans des conditions légèrement basiques ($\text{pH} > 7,5$) (Lee et al. 2007), il se forme des o-quinones réactives, formant ensuite des liaisons catéchol-catéchol, et des structures type poly(DOPA). Ce système a déjà été recréé en conjuguant des groupements catéchols à du chitosan ou du PolyÉthylène glycol (PEG), avec de bons résultats de biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*. Il est utilisé en tant qu'adhésif tissulaire ou pour la fonctionnalisation de surfaces (Brubaker et al. 2010; Ryu et al. 2011).

- Carboxyméthylcellulose (CMC). La cellulose est un polymère naturel de D-glucose contenu dans le bois et la paroi des végétaux. Il constitue près de la moitié de la biomasse végétale terrestre. La CMC est un polymère artificiel, formant un éther de cellulose. Absorbant l'humidité de l'air, il est principalement utilisé en médecine contre les sécheresses oculaires.

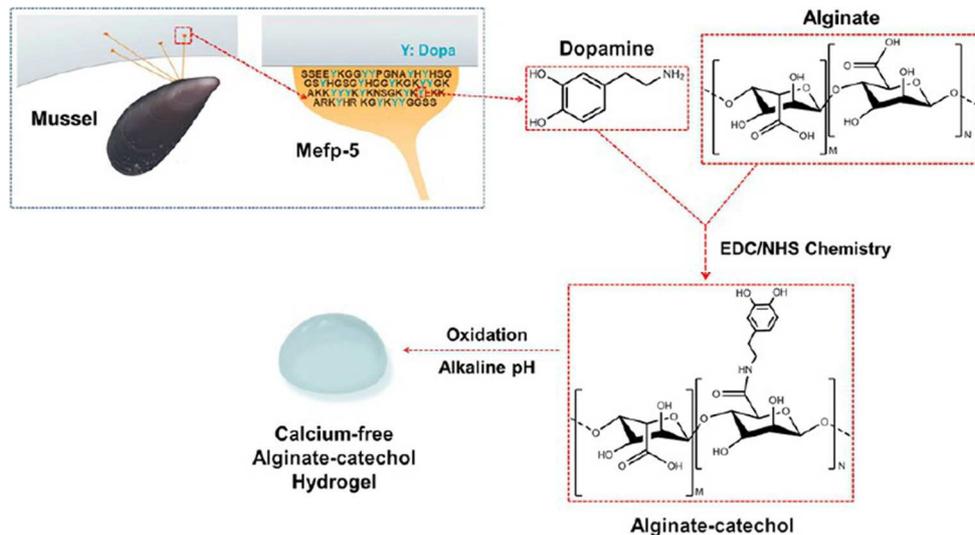


Figure 9 : préparation de la chaîne d'alginate-catéchol (Lee et al. 2013)

La réaction de liaison des chaînes d'alginate-catéchol est inspirée de la liaison du pied de la moule marine à son rocher.

3. 2 Antimicrobiens ajoutés aux gels

De nos jours, les dispositifs médicaux s'avèrent de plus en plus diversifiés et variés. Cependant, il existe de plus en plus d'infections liées à leur présence, et les antibiotiques par voie générale ne peuvent pas toutes les traiter à cause des résistances bactériennes. La gestion des conséquences de ces infections (« *health care-associated infections* », ou *HAI*s) présente également un coût extrêmement important : plus de 33 milliards de dollars par an aux États-Unis par exemple (Stone et al. 2014). Les gels antibactériens sont une des solutions à ce problème de santé publique majeur. Ils peuvent avoir des propriétés antimicrobiennes intrinsèques (Sahiner et al. 2016; Tsao et al. 2010) , ou être combinés à d'autres molécules antimicrobiennes. Deux possibilités existent pour leur utilisation :

- soit ils équipent préventivement les dispositifs médicaux : tapissage de sondes urinaires, de cathéters artério-veineux ou de nombreux autres dispositifs médicaux implantés (Noimark et al. 2009; Hetrick and Schoenfisch 2006). Les multicouches des polyélectrolytes associés à des gels peuvent aussi servir à cet usage (Cado et al. 2013), notamment pour revêtir les matériaux dentaires (Etienne et al. 2006; Etienne et al. 2004). La CHR a déjà été évaluée pour ce type d'applications (Etienne et al. 2005).

- soit ils sont utilisés aussi en tant que médicament. L'un des objectifs actuels est d'obtenir un médicament absorbable, à libération retardée avec une concentration efficace pour le tissu cible. Certains gels sont des nanotransporteurs ou des « nanodélivreurs » de molécules antimicrobiennes. Les « nanoantimicrobiens » sont les nanomatériaux avec une activité antimicrobienne intrinsèque, ou qui améliorent l'efficacité des molécules antimicrobiennes (*nanoantimicrobials molecules ou NAMs*) (Jamil and Imran 2018). Ils peuvent avoir divers rôles : amélioration de la biocompatibilité, protection du médicament, adhésion à une surface ou un tissu, augmentation de l'absorption, contrôle du relargage etc. (Yang et al. 2018; Cavalieri et al. 2014).

En fonction de l'activité souhaitée, ils peuvent être administrés *per os* ou injectés localement quand le site est accessible. Ils peuvent alors améliorer la cicatrisation ou relarguer un principe actif, en l'occurrence des molécules antimicrobiennes (Ghobril and Grinstaff 2015).

Molécules actives utilisées

Dans une revue de littérature récente, Yang et coll. décrit tous les gels et les molécules antibactériennes actuellement utilisés en médecine et en recherche (Yang et al. 2018).

Antibiotiques

Ils restent une référence dans les traitements des infections bactériennes en dépit des résistances, notamment en parodontologie et dans le traitement des péri-implantites (Norowski and Bumgardner 2009). Les gels offrent une surface suffisamment importante rapportée à leur volume. En fonction de leur porosité, le relargage des antibiotiques peut être contrôlé. Certaines molécules sont déjà utilisées en médecine, d'autres sont en cours d'évaluation préclinique :

- la teixobactine n'a pas de résistance actuellement aux bactéries à Gram positif, et pourrait être incluse dans un gel (Giltrap et al. 2016).

- la ciprofloxacine est une fluoroquinolone habituellement utilisée pour les infections de la peau et des yeux. Elle peut être associée à un peptide, dans un gel possédant une nanostructure antibactérienne et apposé en tant que revêtement. Son relargage est prolongé, et permet la prévention des infections de matériaux comme le titane (De Giglio et al. 2011). Sous forme de gel liposomal, elle peut être encapsulée correctement dans la cornée.

- la gentamycine possède un spectre ciblé pour les infections de la peau et des reins, mais sa concentration plasmatique est faible. Mise en place au sein d'un gel de PVA lié avec la sterculia, l'ensemble possède de bonnes propriétés mécaniques, une bonne compatibilité avec le sang, et peut faire office de pansement très efficace (Singh and Pal 2012). En orthopédie, la gentamycine est incorporée dans des hydrogels composites thermodurcissables (granules Orthoss[®]), liés par du beta-glycerophosphate et lyophilisés. Ce substitut osseux réduit ainsi considérablement le risque infectieux (Dorati et al. 2017). Les applications sont ainsi nettement plus nombreuses et les doses efficaces plus faibles que par voie générale.

- la vancomycine est un antibiotique glycopeptidique macromoléculaire. Elle est traditionnellement donnée en dernière intention contre le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM), responsable d'ostéomyélites. De nombreux gels ont été associés à cet AB et ont amélioré son efficacité *in situ* : gels injectables de pluronic- α -cyclodextrine (Simoes et al. 2012), hydrogel de CS thiolaté, lié avec de la dextrine greffée avec de l'acide maléique (Zhao et al. 2014) etc.

Peptides antimicrobiens

- β -herpine : ce peptide de 20 AA forme au sein d'un hydrogel un réseau autoassemblé, utilisé pour la régénération tissulaire (Salick et al. 2007). La β -herpine a une activité bactéricide sur les SARM lorsqu'elle est introduite dans un hydrogel (Salick, Pochan, and Schneider 2010). Liu et coll. ont identifié un hydrogel contenant un peptide autoassemblé en fonction de certaines conditions de pH, de force ionique et de température. Il est bactéricide sur certaines bactéries comme *E. coli* (Liu et al. 2013).

- Un hydrogel photopolymérisable de methacrylamide greffé avec de l' ϵ -poly-l-lysine a été proposé pour revêtir les dispositifs médicaux et les implants (Zhou et al. 2011).

- Fonctionnant globalement sur le même modèle, les ions amphotériques peuvent être également une solution antibactérienne.

Polysaccharides antimicrobiens

Le chitosane et ses dérivés représentent la principale famille : il est non toxique, biodégradable, biocompatible et abondant dans la nature (Nazarzadeh Zare, Mansour Lakouraj, and Mohseni 2014). Sous l'effet d'une acidification légère, le relargage de NH_4^+ ou d'autres cations greffés sur le CS déstabilise les membranes bactériennes (Sang et al. 2010; Fan et al. 2015).

Nanoparticules métalliques

Les métaux lourds sont utilisés depuis longtemps pour combattre les infections en médecine, notamment l'or, le cuivre et plus particulièrement l'argent.

Une des hypothèses est que le cation Ag^+ interagit avec des protéines membranaires de la bactérie, provoquant une fuite des ions K^+ et la mort de la bactérie (Taglietti et al. 2012). Ils ont une action bactéricide sur les Gram positif et négatif. Même si les membranes des Gram négatif sont moins résistantes, le LPS capte les ions Ag^+ , et limite son entrée dans la bactérie (Pelgrift and Friedman 2013). L'argent est principalement inclus dans des hydrogels de polysaccharides. Il a tendance à s'agréger lorsqu'il est assemblé avec de l'alginate. De nombreux travaux ont amélioré la chimie du gel, notamment avec un réseau d'alginate/PVA et de borohydrure de sodium (Ghasemzadeh and Ghanaat 2014). Les gels formés à partir de CS, de CMC et de gélatine sont de bons supports pour l'argent, actifs sur *E. coli* (Tang et al. 2013; Hebeish et al. 2013; Vimala et al. 2009). Une grande variété de gels synthétiques a également été développée avec de l'argent, en visant différentes propriétés : l'adhésion, le relargage à long terme, parfois avec une efficacité supérieure aux AB (Bhowmick, Mohanty, and Koul 2016). Les hydrogels de nano particules d'argent synthétisés à partir de polyéthylène glycol (PEG) et de groupements catéchol apportent un potentiel adhésif, comme pour l'AC. Il existe cependant une toxicité cellulaire aux nanoparticules d'argent (Xu et al. 2012), que les travaux actuels tendent à diminuer.

L'or a été testé en combinaison avec des gels. Son spectre d'utilisation est moins large que celui de l'argent, mais les gels évalués sont plus actifs sur les SARM (Brown et al. 2012), et interfèrent moins avec le tissu osseux dans les processus de régénération osseuse (Ribeiro et al. 2017).

Le zinc est utilisé en raison de son effet bactéricide sur les bactéries à Gram positif et négatif, et de sa non-toxicité cellulaire (Hashem et al. 2013). Il présente également des effets positifs sur la régénération osseuse (Fielding and Bose 2013).

Les métaux présentent ainsi de nombreux avantages, mais ils sont difficilement éliminés par l'organisme.

Il existe ainsi de très nombreuses formulations et combinaisons hydrogel/molécule antibactérienne, et la variété de ces assemblages ne cesse de croître. Le choix du gel dépend de son mode d'administration (*surface, per os*), de la molécule antibactérienne et de l'effet souhaité : relargage intense et bref,

prolongée etc. Bien que beaucoup de gels servent à tapisser des surfaces de matériaux, ils peuvent être construits de façon tridimensionnelle. Il est également possible de combiner des molécules afin d'obtenir des effets synergiques, dans un but préventif ou curatif. Les gels permettent ainsi d'apporter *in situ* la molécule en plus grande concentration, plus efficace, ce qui repousse leurs limites. Ces thérapies ciblées permettent de faire descendre la CMI des antibiotiques, ainsi que leurs effets secondaires. La résistance de nombreuses souches microbiennes pourrait alors diminuer.

VI. Objectif de la thèse

L'objectif de ce travail de thèse consiste à développer un gel injectable antibactérien pour la prévention des péri-implantites.

Il existe actuellement peu de moyens préventifs pour les MPIs, hormis une bonne hygiène bucco-dentaire, un contrôle des facteurs de risque et un suivi régulier des patients pour un diagnostic précoce.

Le gel qui ne gêne pas la mise en place de la suprastructure prothétique va colmater tous les espaces vides dans l'assemblage prothèse/implant. Le but est de l'injecter au départ dans la connectique implantaire, dès la mise en place de la couronne, notamment chez les patients à risque. Le gel doit pouvoir rester intact le plus longtemps possible, afin d'empêcher les bactéries de coloniser les espaces vides.

Il doit être biocompatible car en débordant légèrement, il se retrouve au contact d'un tissu conjonctif fragile, non adhérent aux tissus implantaires. Le gel doit aussi être antibactérien, dans les jours qui suivent sa mise en place mais aussi sur un plus long terme. Un des enjeux est de créer un gel qui puisse se déformer et se comprimer selon les mouvements de la prothèse sur son implant. Ainsi, un potentiel adhésif est également recherché.

Pour répondre à ce cahier des charges, nous avons retenu comme gel l'alginate-catéchol (AC), chargé ou non en acide pluronique bis SH (PlubisSH). Ce gel possède une stabilité en milieu aqueux, ce qui correspond à un usage endobuccal. Son potentiel adhésif et ses propriétés rhéologiques seront évalués dans une première partie de ce travail.

Nous avons choisi la CTL comme agent antibactérien. L'activité antibactérienne et antifongique de ce peptide a déjà été mise en évidence pour des souches endobuccales parodontopathogènes, notamment *P. gingivalis* (Zaet et al. 2017). Le but de la deuxième partie de ce travail est d'évaluer si la CTL est toujours active une fois incorporée dans le gel. Nous avons utilisé la CTL sous sa forme L puis D, la conformation dextrogyre étant beaucoup plus efficace que la lévogyre du peptide naturel (Zaet et al. 2017). La réaction des bactéries au contact du gel est mise en évidence à travers différentes techniques de microscopie : optique, microscope électronique à balayage et à transmission.

Dans une troisième partie, l'étanchéité d'assemblages implant/prothèse est évaluée avec et sans gel chargé en CTL. Chaque prothèse est constituée d'une couronne et d'un pilier. L'implant, coupé à son apex jusqu'à la chambre interne, est mis en place entre 2 compartiments de façon étanche. La prothèse est vissée et les compartiments sont remplis de milieux de culture. L'un est laissé stérile (apex) et l'autre est contaminé par des bactéries (couronne). Le passage bactérien interne, s'il a lieu, est mis en évidence par la contamination du milieu stérile, et la visualisation au microscope électronique à balayage des pièces prothétiques.

PARTIE II :

**Caractérisation physicochimique
du gel**

I. Préparation du gel

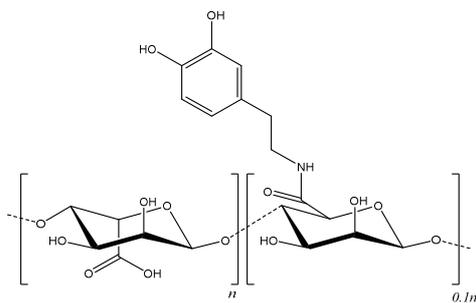
L'alginate, le pluronic F127, le périodate de sodium (NaIO_4), le tampon phosphate (PBS) ont été achetés chez Sigma-Aldrich. La cateslytine (L-CTL) d'origine bovine a été achetée chez ProtéoGenix, France. Le D-CTL a été fourni par les laboratoires Pierre Fabre, France.

1. Préparation chimique préalable

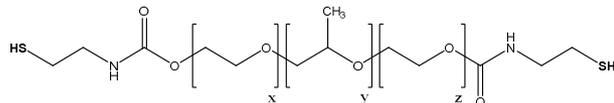
Dans un premier temps, des transformations chimiques de l'alginate et du Pluronic F127 ont été effectuées à l'Institut Charles Sadron par le Professeur Loïc Jierry et ses collaborateurs (ICS, Strasbourg) afin de créer les composants principaux du gel :

- Des groupements catéchols sont greffés sur les chaînes d'alginate, le tout formant l'alginate catéchol (AC). Le taux de greffage des catéchols sur l'alginate est compris entre 10 et 15%. Ce taux de greffage a été déterminé par résonance magnétique nucléaire. Deux lots successifs ont été fabriqués pour l'ensemble des manipulations de ce travail de thèse.
- Des groupes sulhydryles (SH) sont ajoutés sur le Pluronic F127 pour former le Pluronic bis-SH (PlubisSH). Le taux de thiolation est d'environ 65% (connu par spectroscopie de résonance magnétique nucléaire).

La structure des deux polymères est représentée en **figure 10**. Ces composés sont lyophilisés, et conservés dans une atmosphère présentant le moins d'oxygène possible afin de limiter leur oxydation.



Alginate Catéchol (AC)



Pluronic F-127 bis SH (PlubisSH)

Figure 10 : structure chimique de l'alginate catéchol et du Pluronic bis-SH

2. Réhydratation

Dans un deuxième temps, le gel est reconstitué en l'hydratant dans du PBS à 1% et à pH 7,4. Cette concentration est adéquate et suffisante pour créer la suspension initiale du gel. Deux principales formes de gel sont développées :

- Un gel d'alginate catéchol (AC) « pur » à 1% en masse (**figure 11**).
- Un gel composé d'AC à 1% en masse mélangé à du PlubisSH à 36% (ratio 1:1 en volume de solutions mélangées), le tout formant un gel d'AC à 0,5% et de PlubisSH à 18% en masse. Ce rapport optimal est défini à l'aide des courbes de transition sol/gel préalablement tracées (**figure 12**).



Figure 11 : alginate catéchol

La forme déshydratée (à gauche) limite l'oxydation. A droite, l'alginate-catéchol réhydraté à 1% en masse avec du PBS.

Les gels sont laissés au minimum une nuit à 4°C afin que la réhydratation soit complète.

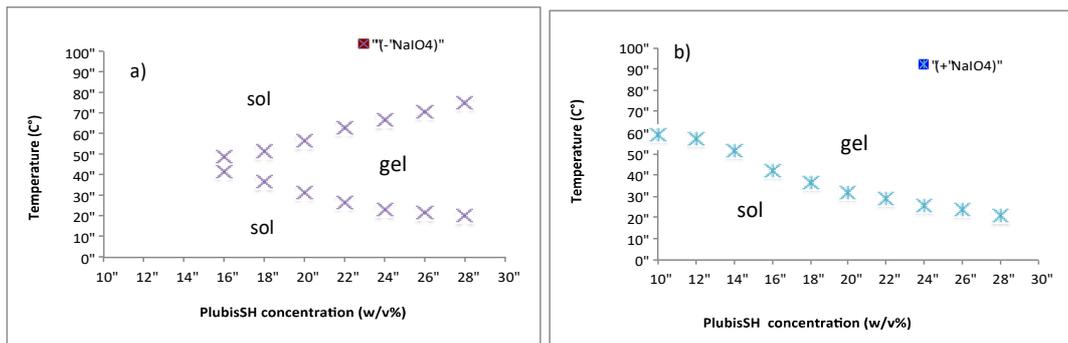


Figure 12 : diagramme de phase sol/gel pour une solution d'AC à 0,5% en masse en présence de différentes concentrations en PlubisSH, avec et sans NaIO₄.

Sans NaIO₄ (Figure 12a) : Lorsque la concentration de plubisSH n'est que de 16%, le gel AC-PlubisSH se présente principalement sous forme de solution. Il faut augmenter sa concentration pour obtenir un gel à des températures comprises entre 20 et 70°C.

Avec NaIO_4 à 0,4M (Figure 12b) : le gel gélifie de façon irréversible à 37°C à partir d'une concentration de 18% en masse de PlubisSH, d'où l'intérêt d'une solution de gélification. Plus la concentration de plubisSH est importante et plus la température peut être basse pour que l'ensemble gélifie.

3. Fonctionnalisation

Préalablement, une solution fraîche d'agents antimicrobiens (CTL, amoxicilline...) est préparée avec de l'eau ultrapure (MilliQ). Elle est rajoutée et mélangée à la solution initiale du gel (1/4 du volume), en homogénéisant bien l'ensemble. Pour les manipulations « contrôles », de l'eau ultrapure seule est rajoutée à la solution de gélification.

4. Gélification

Pour former rapidement les gels, une solution oxydante de gélification (*Gelling Solution* ou GS) doit être ajoutée et mélangée à la préparation (ratio 1 :4 afin de rester biocompatible). Elle est composée de NaIO_4 (4,72 mM) et de NaOH (0,4M), en solution dans du PBS ou de l'eau ultrapure (MilliQ).

- Le NaIO_4 est préparé à une concentration de 4,72 mM (1 mg/mL).
- Le NaOH est préparé à une concentration de 0,4M.
- Ces deux solutions sont ensuite mélangées fraîchement, selon un rapport $\text{NaIO}_4/\text{NaOH}$ de 8/1 pour obtenir la solution de gélification.

Le mélange est effectué pendant une dizaine de secondes. Après deux minutes et à température ambiante, les gels prennent visuellement une couleur entre le jaune foncé et le brun clair.

II. Matériel

Chronologiquement, la caractérisation des gels a été effectuée à l'aide de deux rhéomètres :

- Thermo Haake Rheowin Rheometer RS-100 (Fisher Scientific, France) : sur le lot 1 d'AC et l'AC-PlubisSH, pour les courbes de transition gel/sol, la comparaison de cinétique de gélification entre l'AC et le PlubisSH, et l'adhésion au titane et à la peau.
- Kinexus Ultra Plus (Malvern) : sur le lot 2 d'AC pour toutes les autres mesures.

Principe

Le rhéomètre est un appareil de laboratoire permettant de mesurer les propriétés viscoélastiques d'un fluide ou d'un gel. Il est constitué d'un plateau principal statique (inférieur) sur lequel est apposé l'échantillon, et d'un plateau ou d'un cône secondaire mobile (supérieur) qui vient au contact de l'échantillon. Le plateau ou le cône secondaire applique ensuite des forces de traction et/ou de cisaillement à différentes vitesses angulaires, de façon statique, en compression ou en retrait selon la manipulation (**figure 13**). Le plateau principal possède une plaque Peletier qui permet de faire varier la température de façon précise.

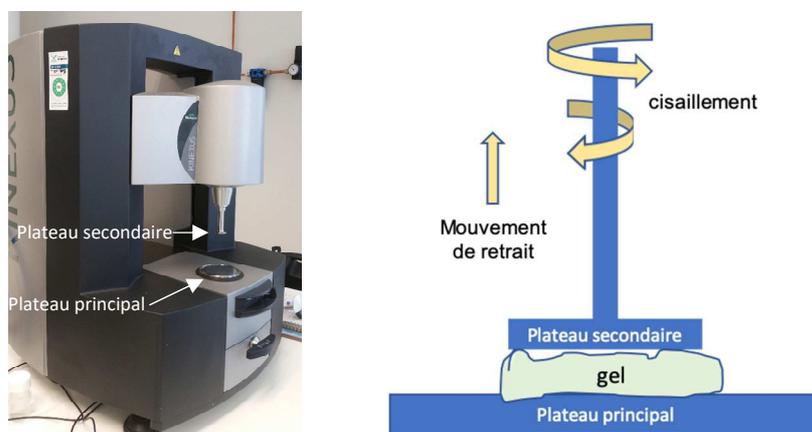


Figure 13 : rhéomètre : outil et principe

Le rhéomètre permet de caractériser les propriétés viscoélastiques et adhésives d'un gel

L'aptitude au gonflement et la viscoélasticité (G^*) sont les propriétés principales d'un gel (Cabane and Hénon 2003). La viscoélasticité tient compte de la dualité entre sa viscosité et son élasticité. Elle est exprimée selon la formule $G^* = G' + i G''$.

G' est le module de conservation. Il caractérise la rigidité d'un matériau élastique (énergie conservée et totalement restituée par le matériau après application de la contrainte).

G'' est le module de perte (partie imaginaire du module). Il caractérise le comportement visqueux d'un gel (énergie dissipée après application de la contrainte).

Par ces valeurs, les cinétiques de gélification, l'influence de la fréquence d'application des contraintes, l'influence de la valeur de la déformation sous cisaillement sont étudiées dans une configuration cône-plan de l'appareil tandis que les expériences visant à quantifier l'adhésion du gel sont effectuées dans une configuration plan-plan.

Matériels et méthodes généraux

Les mesures au rhéomètre nécessitent 1,2 mL de gel pour chaque mesure. L'alginate catéchol (AC) (lot 2) solubilisé à 1% dans du PBS est mélangé au préalable à de l'eau ultrapure, ou à un Peptide Anti Microbien (PAM) en solution. Cette opération est effectuée dans un flacon séparé afin d'homogénéiser le mélange. Pour respecter le rapport, 750 μ L d'AC sont mélangés à 187,5 μ L d'eau ou de solution de D-CTL (concentrée à 3mg/mL). 937,5 μ L de ce mélange sont déposés sur le plateau principal du rhéomètre.

La solution de gélification (GS) (262,5 mL) est ajoutée à l'AC directement sur le plateau inférieur du rhéomètre. Un dispositif rotatif vient contre le gel pour réaliser les mesures ; sa forme (cône ou plan) et le moment de la mesure (juste après l'introduction du gel ou après vieillissement pendant une durée déterminée) sont choisis selon la manipulation à effectuer.

III. Évaluation physico-chimique

1. Domaine d'élasticité du gel

Méthode

Un cône de 40 mm de diamètre à la base avec un angle au sommet de 4° est amené au contact du gel (lot 2) à $150\ \mu\text{m}$ de distance du plateau inférieur.

Deux types de manipulations sont effectuées :

- *Fréquence constante/déformation variable* :

Fréquence constante de rotation du cône de 1 Hz jusqu'à 50% de son angle de rotation maximal (c'est-à-dire 2°).

- *Fréquences variables/déformation constante* :

Fréquences variables croissantes (de 0,01 Hz à 50 Hz) et déformation de 1° .

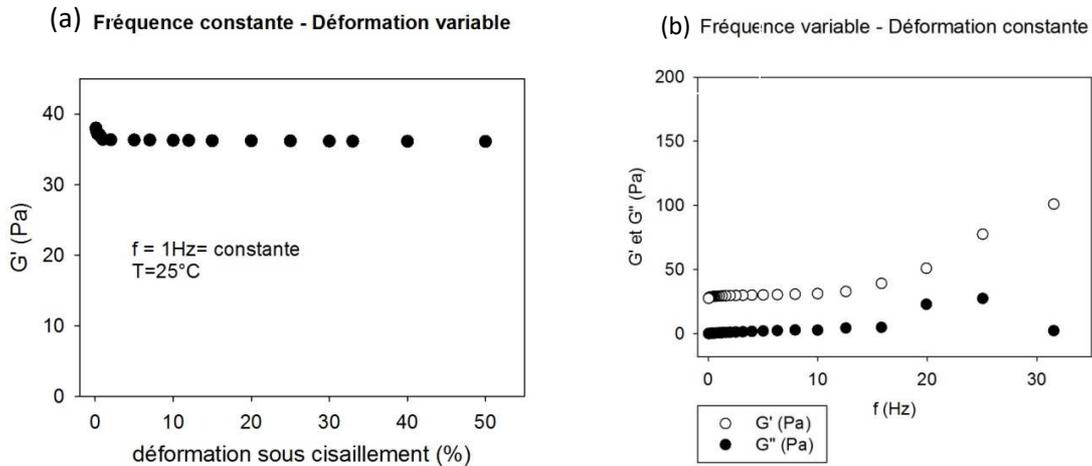


Figure 14 : domaine d'élasticité du gel

A déformation variable, G' diminue très légèrement (de 35 à 33 Pa) après application des premières contraintes, puis il reste stable (14a).

A fréquence variable (14b), G' est stable autour de 40 Pa de 0 à 15 Hz, puis il augmente dans les fréquences supérieures jusqu'à 30 Hz. G'' reste systématiquement en dessous de G' , et augmente un peu entre 15 et 25 Pa.

Résultats

Fréquence constante/déformation variable :

Quelle que soit la déformation appliquée sur le gel, dans le domaine de déformation compris entre 0.1 et 50%, G' reste stable entre 32 et 35 Pa (**figure 14a**).

Fréquence variable/déformation constante :

La **figure 14b** montre que G' est supérieur à G'' pendant toute la durée du test, ce qui prouve que la gélification a bien lieu. De plus, jusqu'à une fréquence de 15 Hz, G' prend une valeur constante proche de 40 Pa. Lorsque la fréquence augmente (jusqu'à 30 Hz), G' augmente également jusqu'à 100 Pa. Ceci est un comportement classique des matériaux viscoélastiques en général, et des gels en particulier (Cabane and Hénon 2003; Couarraze and Grossiord 1991).

Discussion

Lorsque le gel à base d'AC est en bouche dans une connectique implantaire, il peut subir des contraintes de cisaillement : à déformation variable (dureté des aliments différentes, chocs, bruxisme etc.), et à fréquence variable, comme l'alternance des périodes de repos avec les périodes de mastication. Dans le cas présent, ces variations ne modifient pas les propriétés du gel. Au contraire, les propriétés viscoélastiques du gel augment à partir de 30 Hz, ce qui lui confère une application clinique appropriée. Ces résultats montrent donc que le gel possède un domaine d'élasticité important. Ce test doit toutefois être réalisé sur du plus long terme afin de confirmer ces résultats préliminaires obtenus immédiatement après la préparation du gel.

2. Cinétique de gélification

L'enregistrement de la cinétique de prise du gel après ajout de la solution gélifiante (GS) permet de savoir si le gel formé visuellement (gel physique) devient un gel chimique grâce aux liaisons créées au sein du gel. Vu la composition du gel et la structure des polymères utilisés (**Figure 10**), des liaisons de type quinone-quinone peuvent se former entre deux chaînes de polymère ou au sein d'une chaîne unique.

Méthode

Un cône de 40 mm de diamètre à la base vient au contact du gel (lot 2) à 150 μm de distance du plateau inférieur. Le temps entre la fin du mélange des différents constituants du gel et le début de la mesure est d'environ 1 minute. La cinétique de gélification est mesurée à fréquence constante de 1.0 Hz et à déformation constante (1%) conformément aux résultats obtenus précédemment pour un gel formé (**figure 15**). La manipulation est effectuée avec et sans peptide antimicrobien PAM, et répétée à plusieurs reprises, d'abord sur une durée de 15 minutes puis de deux heures.

Résultats

1. Cinétique de gélification de l'AC

La solution est considérée comme un gel lorsque la courbe de G' dépasse celle de G'' , ce qui est le cas pour l'AC à 1% en masse (Couarraze and Grossiord 1991). Ce stade est déjà dépassé lorsque le rhéomètre commence à enregistrer les valeurs du module de conservation et du module de perte. En effet, lorsque la solution de gélification est introduite, le gel prend très vite et le rhéomètre n'a pas le temps d'enregistrer le croisement des deux courbes (**figure 15a**). G' croît très rapidement dès les premières secondes de la mesure : il passe de 18 Pa à une valeur comprise entre 28 et 35 Pa (selon la mesure) en 300 secondes. De plus, les résultats de ce test sont reproductibles à 10 % près sur des manipulations réalisées sur du court terme (30 minutes) (**figure 15b**).

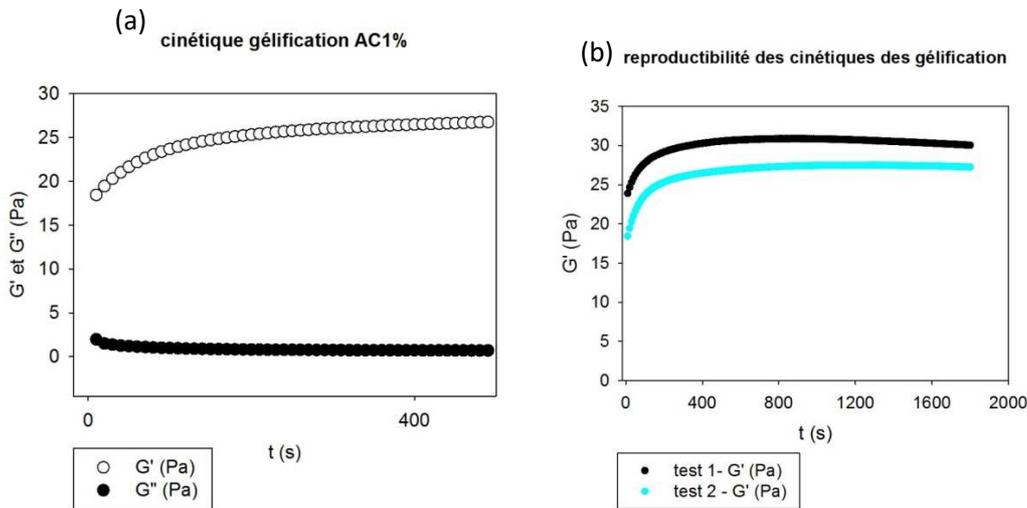


Figure 15 : cinétique de gélification

Dès que l'appareil commence à enregistrer les mesures, G' dépasse déjà G'' : le gel est donc déjà formé (Figure 15a). Lorsque la manipulation est répétée plusieurs fois sur 1800 secondes (Figure 15b), le plateau de formation du gel est très vite atteint, dès 800 secondes.

2. Cinétique de gélification avec et sans D-CTL

La vitesse de gélification des gels avec et sans D-CTL est très proche et très rapide (autour de 30 secondes, le temps de préparer les gels). En revanche, les valeurs de G' et G'' sont plus élevées quand la D-CTL est présente : G' se situe autour de 40 Pa avec D-CTL et à 32 Pa sans D-CTL après 200 secondes (**figure 16**). Le plateau est plus rapidement atteint en présence de D-CTL : après 10 mn, G'

vaut 40 Pa avec D-CTL et 35 Pa sans D-CTL. D'après ces expériences, la D-CTL semble jouer un rôle dans la formation chimique du gel.

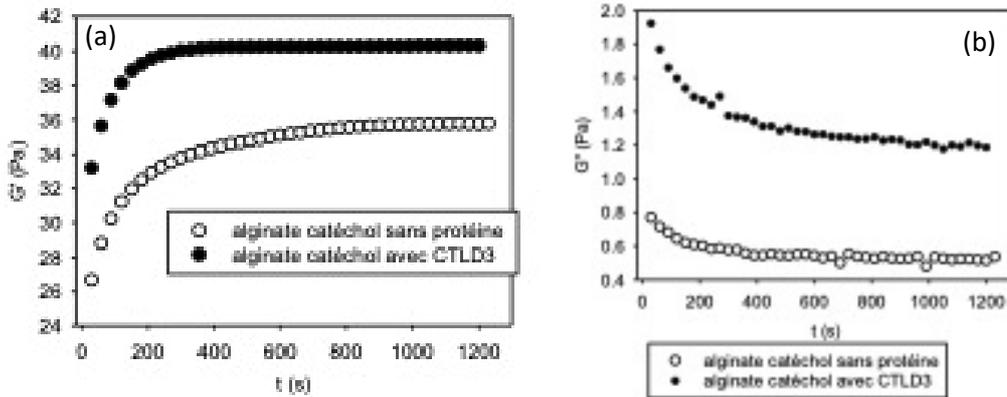


Figure 16 : cinétique de gélification avec et sans inclusion de D-CTL dans le gel

G' (16a) et G'' (16b) sont plus élevées pendant toute la cinétique de gélification quand la D-CTL est ajoutée. Le plateau est atteint après 800 secondes sans D-CTL, et après 200 secondes avec la D-CTL.

3. Cinétique de gélification avec et sans PlubisSH

Ces premières mesures ont été effectuées à l'aide du rhéomètre RS-100. G' continue d'augmenter au-delà de 14 minutes pour l'AC, et enregistre une valeur maximale de 2 Pa. En revanche, avec l'ajout du PlubisSH, il se stabilise entre 900 et 1000 Pa (figure 17).

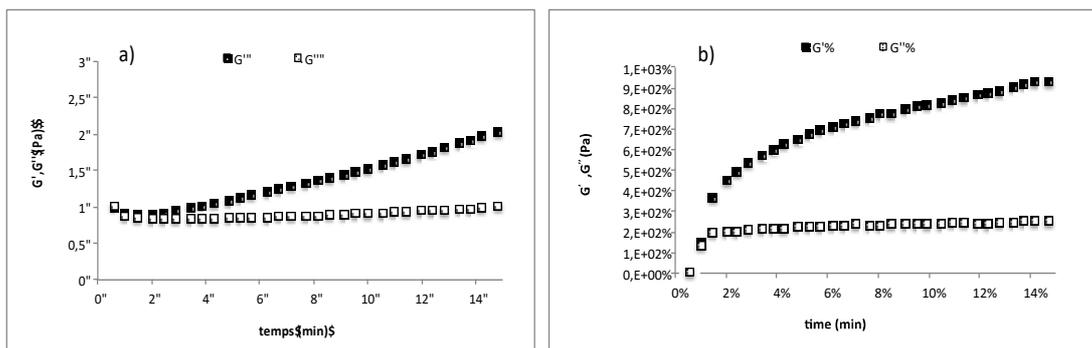


Figure 17 : comparaison de la cinétique de gélification entre l'AC1% en masse et un mélange AC 0,5% en masse (a)- PlubisSH 16% en masse (b) ($F= 1\text{Hz}$, déformation = 1%, expériences effectuées à 37 °C)

G' dépasse G'' dans les deux situations (Figure 17a et 17b). En comparant l'AC et l'AC/PlubisSH, une différence d'un facteur 1000 est presque enregistrée après 15 minutes de prise des gels.

Discussion

La cinétique de gélification montre que le gel à base d'alginate catéchol prend rapidement, en un intervalle de temps proche de celui du temps d'homogénéisation. Les premières mesures du rhéomètre étant effectuées peu après le mélange de la solution initiale et de la solution de gélification (environ 60 secondes), le gel a déjà commencé à se former. L'adjonction de D-CTL permet d'atteindre un plateau en 4 fois moins de temps : 200 secondes environ contre 800 secondes. Ces résultats sont donc entièrement compatibles avec des temps d'utilisation clinique (souvent autour de 5 minutes, soit 300 secondes). Il est possible que le peptide antimicrobien établisse des liaisons covalentes avec les groupements catéchols oxydés (quinones) au sein du milieu réactionnel, ce qui peut expliquer les valeurs plus fortes de G' (autour de 40 Pa vs 32 Pa).

Les mesures initiales enregistrées à l'aide du rhéomètre RS-100 sont plus faibles que celle du rhéomètre Malvern (2 contre 30 Pa). Cette différence est probablement liée à la différence de lots d'AC utilisés et aux différentes conditions expérimentales. D'autres manipulations sont nécessaires afin de confirmer ces valeurs d'un point de vue statistique. En revanche, il est clair que le rajout de PlubisSH renforce considérablement le module de conservation G' du gel. Cela provient de la réactivité des fonctions thiol terminales du PlubisSH qui sont capables d'effectuer une addition nucléophile sur les atomes de carbone adjacents aux groupements quinones produits lors de l'oxydation des catéchols portés par l'alginate catéchol.

3. Stabilité thermique

Méthode

Une fois le gel (lot 2) mis en place sur le plateau, le cône vient au contact du gel et l'écrase, en respectant une distance de 150 μm . Un mouvement de rotation à fréquence constante (1 Hz) avec 1% de déformation est appliqué sur le gel. Grâce à la plaque Peletier contenue dans le plateau principal du rhéomètre, la température est augmentée progressivement de 1° C par minute de 25 à 50°C, et G' et G'' sont enregistrés en fonction du temps, donc de la température (**figure 18**).

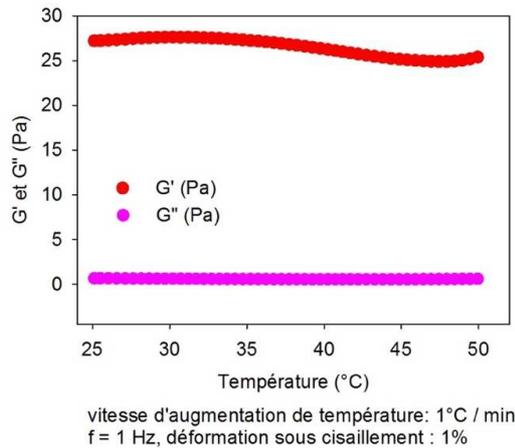


Figure 18 : évaluation de la stabilité thermique du gel

Le gel d'AC 1% reste stable malgré l'augmentation de température

Résultats et discussion

Ce domaine de température est représentatif des augmentations de température qui peuvent avoir lieu en milieu buccal chez l'homme (boissons ou alimentation chaude). Le gel est donc stable dans cette plage d'utilisation physiologique.

4. Tests d'adhésion (*tacking test*)

Ces tests consistent à évaluer la force d'adhésion d'un gel jusqu'à la rupture, adhésive, cohésive ou mixte.

4.1 Tests d'adhésion sur plateau en acier inox

Matériels et méthodes

Le gel (lot 2) est mis en place sur le plateau principal. Son épaisseur est d'environ 3 millimètres. Le plateau mobile (plan de 2 centimètres de diamètre) vient l'écraser jusqu'à 1 millimètre de distance entre les plateaux, avec une force de 1 Newton pendant 10 secondes. Le gel établit alors des contacts adhésifs entre les deux plateaux en acier inox.

Une vitesse de retrait de $100 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ est appliquée ensuite jusqu'à rupture du gel entre les plateaux.

Le test est répété deux fois pour chaque gel. La rupture est atteinte lorsque le dynamomètre mesure une force nulle.

- Pour la première évaluation, le gel est laissé entre les deux plateaux pendant une durée variable (15 mn, 1h, 4h, 18h) avant le test d'adhésion (**figure 19**). De l'eau est placée dans la rigole externe du plateau inférieur pour les manipulations à 4h et 18h afin de minimiser la déshydratation du gel.
- Pour la deuxième évaluation, le plateau principal est nettoyé, le rhéomètre est recalibré puis le même gel est déposé dessus. Cette expérience vise à évaluer si le gel peut être réutilisé après dépôt et s'il conserve une part de ses propriétés adhésives initiales.

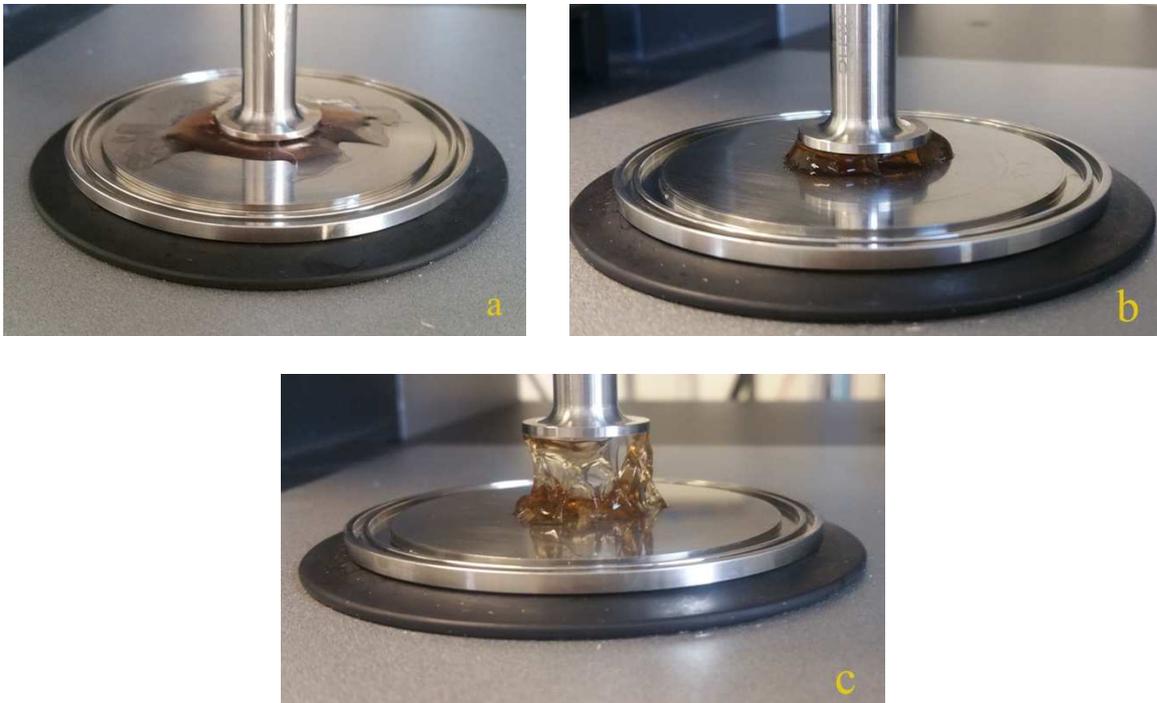


Figure 19 : test d'adhésion effectué après 15 minutes de vieillissement du gel d'AC à 1 % en masse

Le gel est écrasé par le plateau mobile après sa préparation, puis laissé 15 minutes au repos (19a). Lorsque le plateau supérieur se soulève, il adhère initialement aux 2 plateaux en se déformant (19b), puis rompt partiellement : la rupture est mixte (adhésive + cohésive) (19c). La force globale d'adhésion est maximale lors des premiers millimètres de retrait.

Résultats

Force d'adhésion

Les courbes enregistrent la force d'adhésion en Newtons (N) en fonction de la position du plateau mobile, donc également en fonction du temps, puisque le retrait est effectué à vitesse constante. Toutes les courbes enregistrées présentent un profil similaire.

Dans les toutes premières secondes, la courbe décroît. La première partie (force positive) de cette décroissance correspond à l'énergie restituée par le gel suite à sa compression. La deuxième partie (force négative) correspond à la contrainte exercée sur le gel lors du retrait. Toutes les courbes sont caractérisées par un minimum correspondant à un pic d'adhésion maximal (**figure 20**). Le pic le plus important est enregistré pour un gel formé pendant 18 heures avant le test.

Après l'atteinte de la force minimale, la valeur absolue de la force tend vers 0 N, ce qui correspond à la rupture totale de toutes les liaisons. Lors de cette remontée, le gel commence à se rompre entre les plateaux, de façon cohésive ou adhésive.

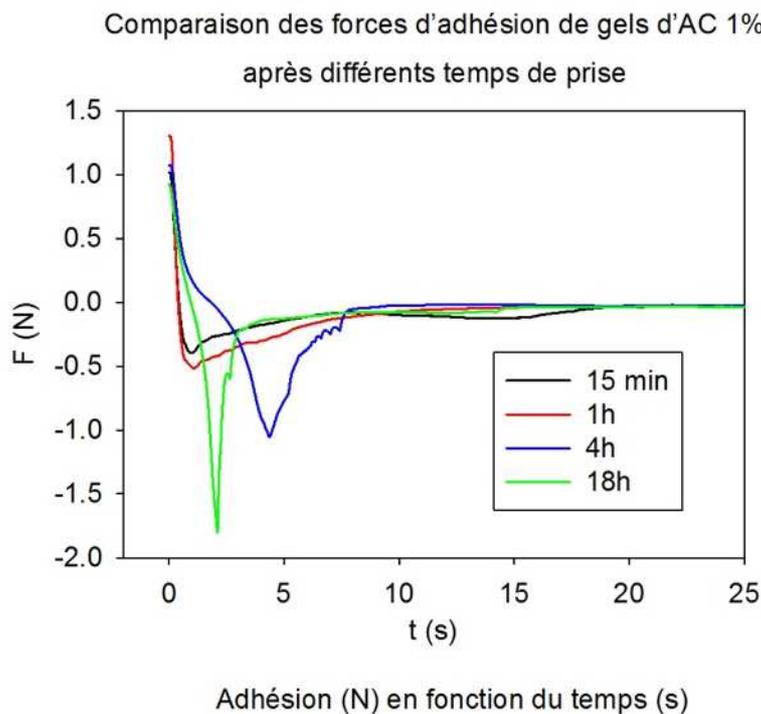


Figure 20 : évolution des forces d'adhésion de gels d'AC 1% après différents temps de prise

Le gel possède un pic d'adhésion initial, variable selon le temps de prise, puis l'adhésion diminue lorsqu'il est étiré.

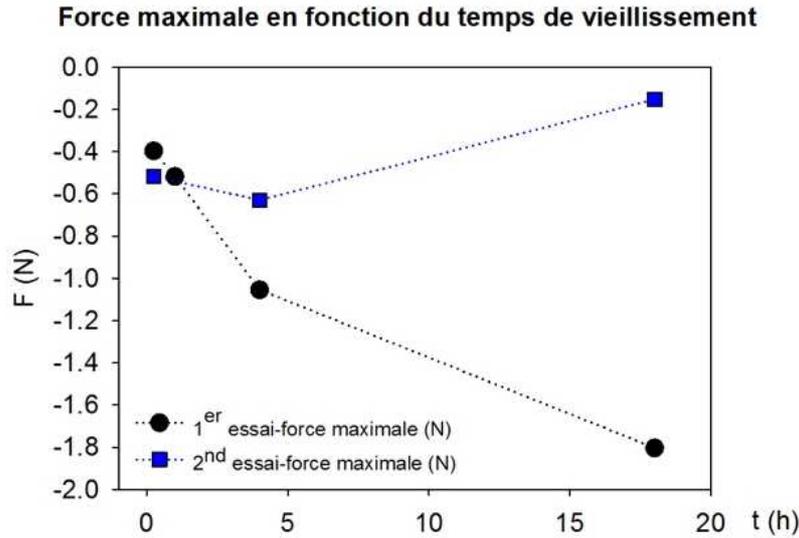


Figure 21 : comparatif des forces maximales d'adhésion pour la 1^e et la 2^e évaluation, en fonction du temps de vieillissement des gels

La force maximale d'adhésion mesurée lors du 2^e test est plus faible en valeur absolue que lors du 1^{er} test.

Énergie d'adhésion

Le calcul de l'énergie d'adhésion, exprimée en J/m² ou en J/m³, permet de comprendre le potentiel adhésif global des gels en fonction de leur temps de prise. Il est exprimé en joule (W) et correspond à l'intégration de l'aire sous la courbe de la force d'adhésion (valeurs négatives, Figure 10). Le travail se calculant en additionnant les travaux élémentaires effectués lors de chaque déplacement infinitésimal du plateau supérieur soit :

$$W = \sum_i^x F_i * \Delta d$$

Différentes vitesses de retrait du plateau mobile sont appliquées sur le gel afin d'évaluer son comportement viscoélastique dans différentes conditions :

10 μm/seconde

100 μm/seconde

1 mm/seconde

Les valeurs sont enregistrées sur 1 centimètre (L) :

$$\Delta d = v * \Delta L$$

$$\Delta d = 0,1 \mu\text{m} \text{ à } 10 \mu\text{m} \text{ (selon la vitesse)}$$

Le volume de chaque gel se calcule selon la relation $V_i = \pi r^2 * h_0$, où h_0 est la distance initiale entre les deux plateaux

$$\text{Soit } V_i = 3,14 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3$$

	Temps de prise du gel avant retrait du plateau (heure)	W (J)	Énergie d'adhésion (J/m ³)	Énergie d'adhésion (J/m ²)
Retrait à 100 $\mu\text{m/s}$	0,25	$3,72 \cdot 10^{-4}$	1180	1,180
	1	$3,52 \cdot 10^{-4}$	1120	1,120
	4	$3,34 \cdot 10^{-4}$	1063	1,063
	4	$3,08 \cdot 10^{-4}$	980	0,980

	(Manipulation 2)			
	18	$3,79 \cdot 10^{-4}$	1205	1,205
	23	$2,48 \cdot 10^{-4}$	791	0,791
Retrait	2	$1,27 \cdot 10^{-4}$	3990	3,99
à $10 \mu\text{m/s}$	2	$1,16 \cdot 10^{-4}$	3640	3.64
Retrait	2	$1,08 \cdot 10^{-4}$	3400	3.40
à 1 mm/s	2	$7,49 \cdot 10^{-5}$	2350	2.35

Figure 22 : tableau récapitulatif des valeurs de travail en fonction de la vitesse de retrait et du temps de vieillissement

L'énergie d'adhésion est le travail rapporté à la surface du plateau en contact du gel. Elle peut être exprimée en (J/m^2 ou en J/m^3). Elle varie de 1 à 4 J/m^3 en fonction de la vitesse de retrait du petit plateau.

Energie adhesion AC1% en fonction du temps de vieillissement

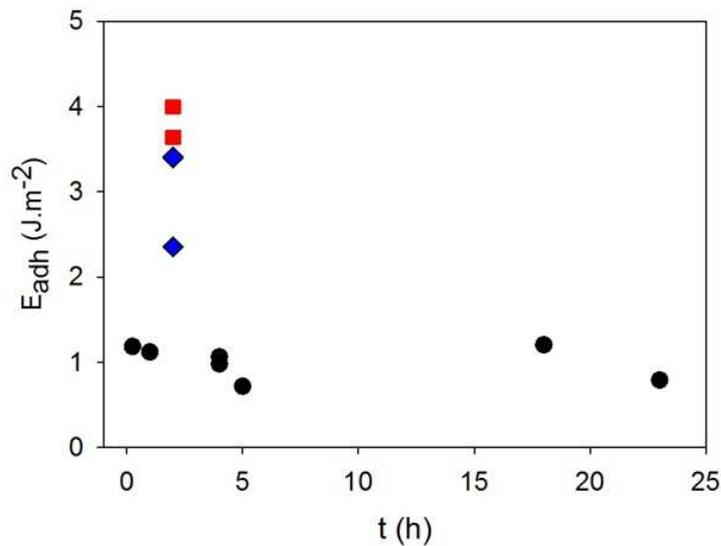


Figure 23 : énergie d'adhésion du gel d'AC 1%

L'énergie d'adhésion du gel se situe autour de 1 J/m^3 dans la plupart des manipulations. Les carrés rouges, les disques noirs et les losanges bleus correspondent à une vitesse de de retrait de $10 \mu\text{m.s}^{-1}$, $100 \mu\text{m.s}^{-1}$ et 1 mm.s^{-1} respectivement.

Discussion

Les vitesses de retrait utilisées dans ces manipulations (10, 100 et 1000 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) ont permis d'effectuer des tests d'adhésion du gel d'alginate catéchol entre deux surfaces d'acier inox. Les valeurs appliquées se rapprochent de l'amplitude des micromouvements entre le pilier et l'implant (de quelques micromètres à plusieurs dizaines de micromètres) (Zipprich et al. 2007).

De plus, même si les valeurs maximales des forces adhésives ne s'élèvent qu'à 1.5 N après 18 h de vieillissement du gel (**figure 20**), elles restent relativement élevées par rapport à la concentration à 1% en AC. Dans ces conditions la contrainte adhésive est donc de 4.7 kPa, une valeur plus élevée que celle des gels de fibrine (1 à 2 kPa) mais plus faible que celle obtenue avec les gels de polyéthylène glycol (PEG) modifiés avec des groupements catéchols aux extrémités de chaînes, et mélangés avec du collagène, adhérant à environ 40 kPa en conditions humides sur de la peau de porc (Feng et al. 2017). Une augmentation de la concentration en AC pourrait permettre d'améliorer ces valeurs, mais il est difficile de préparer ce gel à des plus hautes concentrations à cause de sa viscosité. Nous envisageons également d'ajouter des particules inorganiques, comme des phosphates de calcium dans la formulation des gels d'AC, afin d'augmenter l'énergie globale d'adhésion. Une autre façon d'augmenter l'adhésion serait de fonctionnaliser les surfaces implantaires en titane comme cela a déjà été proposé (Renoud et al. 2012), et d'obtenir ainsi des liaisons de ce revêtement avec l'AC.

La force maximale d'adhésion augmente entre le 1^{er} et le 2^e test jusqu'à 15 minutes de temps de prise selon nos mesures (**figure 21**). En effet, tous les groupements catéchol n'ont pas été encore utilisés lors du premier test et une fraction non négligeable doit être disponible de nouveau pour le 2nd test d'adhésion. En revanche, pour des gels formés depuis 4h et plus, ces groupements apportent une adhésion initiale forte avec les deux plateaux, mais ils sont déjà « consommés » et non disponibles pour permettre une réutilisation efficace du gel en tant que gel adhésif. La force maximale d'adhésion devient alors plus faible pour des gels vieillis longtemps. De plus, le 2^e test est réalisé immédiatement après le premier, et nécessiterait d'être réalisé après un temps de contact plus long entre les deux plateaux. D'un point de vue clinique, le gel pourrait être laissé en place au moins une fois après démontage d'un pilier ou d'une couronne transvissée, et garderait ainsi des propriétés adhésives intéressantes.

Bien que des pics d'adhésion plus importants soient enregistrés avec un plus grand temps de prise du gel (**figure 20**), l'énergie d'adhésion reste la même entre les gels vieillis pendant différentes périodes (**figures 22 et 23**). Les groupements catéchols disponibles sont ainsi plus nombreux au début (15 minutes), mais les liaisons au sein du gel sont plus faibles. Avec le temps, la cohésion du gel se renforce

mais les liaisons disponibles diminuent inversement et proportionnellement. L'intensité de l'énergie d'adhésion correspond à celle de liaisons faibles de type van der Waals. L'acier inox est composé d'environ 10% de chrome qui forme une couche protectrice (Cr_2O_3), peu propice aux réactions chimiques avec les quinones disponibles du gel. Les deux plateaux du rhéomètre pourraient être remplacés par des plateaux en titane afin de mieux préfigurer le comportement adhésif de ces gels au sein d'une connectique implantaire, mais il faut s'attendre au même type de valeurs car il existe également une couche de passivation (TiO_2) en surface, faiblement réactive.

Il est à noter que pour 2 h de vieillissement du gel, l'énergie d'adhésion prend une valeur maximale lors que la vitesse de retrait est égale à $10 \mu\text{m.s}^{-1}$, une valeur minimale à $100 \mu\text{m.s}^{-1}$ et une valeur intermédiaire pour la vitesse de 1mm.s^{-1} (**figure 23**). Cela traduit des mécanismes de dissipation différents de l'énergie mécanique fournie, notamment sous forme de chaleur.

Des expériences supplémentaires nécessitent d'être réalisées afin de pouvoir attribuer une barre d'erreur à toutes ces mesures. Des temps de vieillissement plus longs que 18 heures doivent aussi être expérimentés, afin de voir s'ils permettent d'augmenter encore la force maximale d'adhésion et si l'énergie d'adhésion reste constante.

4.2 Tests d'adhésion au titane et aux tissus mous

Matériels et méthodes

Pour cette évaluation, un dynamomètre est utilisé (MTS Systems, Lhomargy, DY34, France, logiciel Testworks). Les deux gels testés sont l'AC à 1% en masse (lot 1) et le mélange AC à 0,5% en masse - PlubisSH (18%).

Préalablement, une barre de titane grade 5 ($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$) est achetée (ACNIS, France), puis découpée en plusieurs disques de 1cm d'épaisseur et de diamètre. Les faces sont polies à l'aide de papier siliconé abrasif en carbone de granulométrie décroissante (600, 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 4000), afin d'obtenir un poli proche de celui des pièces implantaires.

Le disque est ensuite collé à la sonde à l'aide d'une colle cyanoacrylate, puis 100 μL de gel sont déposés sur la face plane du disque.

De l'autre côté du dispositif, deux conditions sont évaluées :

- soit un autre disque de titane similaire est collé
- soit un morceau de gencive de porc (1cm^2) est collée à la cyanoacrylate (côté conjonctif).

5 minutes après avoir apposé le gel sur le disque, ce dernier est compressé pendant 30 minutes à 37°C avec une force de 0,1 mN. La sonde effectue ensuite un mouvement de retrait à 300 $\mu\text{m}/\text{minute}$ (5 $\mu\text{m}/\text{seconde}$). L'expérience est renouvelée 3 fois.

Résultats et discussion

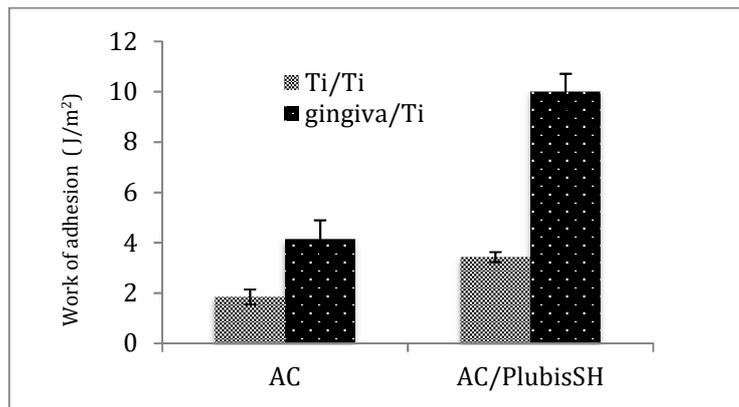


Figure 24 : adhésion des gels au titane et à la gencive

L'énergie d'adhésion est directement calculée en J/m^2 . L'adhésion du gel est meilleure sur la gencive que sur le titane. Une nette augmentation de l'énergie d'adhésion est obtenue pour le gel mixte AC/PluBis SH.

L'énergie d'adhésion du gel est plus de deux fois plus importante pour la gencive de porc que pour le titane (**figure 24**) (Mateescu et al. 2015). Cette différence est encore plus marquée pour l'AC/PlubisSH (10 J/m^2 contre 4,1 J/m^2). Elle peut s'expliquer par la présence de groupes sulfhydryles disponibles dans le PlubisSH, qui permettent d'améliorer d'une part la cohésion du gel en réagissant avec les groupements OH disponibles des catéchols et de l'alginate, et d'autre part de réagir en surface avec d'autres interfaces. Ces résultats vont dans le sens des travaux de Lee et coll. qui, en associant l'HA au Plu-SH sous forme d'hydrogel, augmentent les propriétés adhésives du gel néoformé (de 1,47 à 7,18 kPa) (Lee et al. 2010). Le titane est recouvert d'une pellicule de TiO_2 , chimiquement peu réactive avec des matériaux mous tels que les hydrogels. Il se forme avec le gel des liaisons faibles de type van der Waals et qui lui confère ses propriétés adhésives. En revanche, il est possible que les groupes -SH disponibles interagissent avec les groupes $-\text{NH}_2$, -OH, COOH ou SH des protéines et autres composés organiques présents dans la gencive de porc. La formation de liaisons covalentes expliquerait la plus forte adhésion aux tissus mous

qu'à une surface de titane, plane et polie. La rupture du gel au tissu est alors plutôt de type cohésif qu'adhésif.

5. Stabilité des gels en milieu aqueux

Matériels et méthodes

Les gels d'AC (lot 1) et d'AC-PlubisSH (avec et sans NaIO_4) sont préparés puis laissés dans une solution de PBS à pH 7,4 pendant 1 mois. A différents intervalles, ils sont pesés.

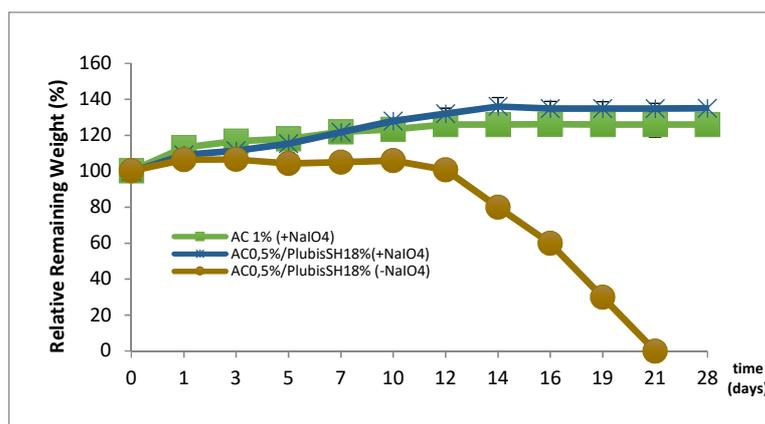


Figure 25 : variation de la masse relative des gels en milieu aqueux en fonction du temps de stockage dans le tampon PBS.

Seuls les gels avec NaIO_4 restent stables sur une période de 1 mois

Résultats et discussion

Le traitement au NaIO_4 est donc nécessaire pour la stabilité des gels AC-Plubis SH en milieu aqueux sur du long terme. Sans traitement au NaIO_4 , ces gels commencent à s'éroder à partir de 12 jours (**figure 25**). Les gels préparés avec NaIO_4 présentent une augmentation d'environ 30% de leur masse dans les 10 premiers jours, ce qui correspond à leur réhydratation en présence de PBS. Cette masse reste ensuite stable dans le temps, ce qui va dans le sens des résultats de Lee et coll. pour des gels d'AC 2% et 4%, et qui constatent également une stabilité des gels à 14 jours (Lee et al. 2013). Toutefois, un gel mis en place dans une connectique implantaire n'est pas au contact direct de l'environnement salivaire, et ne subira pas forcément ces variations volumiques.

Partie III :

Biologie - interaction du gel avec le vivant

I. Évaluation des combinaisons « gel-antimicrobiens »

1. Matériels et méthodes

Molécules antibactériennes

Différentes molécules antibactériennes ont été testées dans ce travail : l'amoxicilline en tant qu'antibiotique de référence (Sigma Aldrich) ; la L-CTL (forme lévogyre) et la D-CTL (forme dextrogyre), toutes deux d'origine bovine (Protéogenix, France). Les manipulations sont initialement réalisées avec la L-CTL. Vu que sa CMI est plus élevée que la D-CTL sur de nombreuses bactéries, elle n'est retenue que pour les premières manipulations faites au début du travail de thèse sur *P. gingivalis* et *E. coli*.

Pathogènes testés

Escherichia coli (*E. coli*) a été utilisé en tant que pathogène modèle de référence (souches ATCC 25922TM et K-12 mutante (PHL 628)), une souche qui peut facilement coloniser les surfaces inertes et former un biofilm (Vidal et al. 1998). C'est un bacille à Gram négatif aérobie dont la croissance est facile : elle se divise toutes les 20 minutes à 37°C en présence d'un milieu de culture adapté.

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*) est la bactérie parodontopathogène la plus étudiée à cause de ses facteurs de virulence (souche ATCC 33277TM pour ces travaux). C'est une bactérie de la classe *bacteroidales* à Gram négatif, anaérobie stricte. Sa culture est réalisée dans une boîte hermétique contenant un sachet anaérogène (AnaeroGen 2.5L, thermoScientific).

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) est une bactérie « modèle » à Gram positif responsable d'intoxications alimentaires et d'infections parfois graves, comme chez l'immunodéprimé ou sur certains dispositifs médicaux comme les prothèses valvulaires (souche ATCC 25923TM).

Candida albicans (*C. albicans*) est une levure fréquemment retrouvée en milieu buccal, et responsable de certaines infections fongiques. Une souche sensible ATCC 10231TM a été utilisée dans ces travaux.

Pour chaque expérience, les microorganismes sont mis dans un incubateur à 37°C la veille (préculture), dans des conditions d'oxygénation propre à chacune. La solution est diluée à 1/10^e le lendemain, puis ramenée à une densité optique (DO⁶²⁰) de 0,001 afin de pouvoir faire croître les bactéries ou levures selon une échelle logarithmique.

Milieus de culture

Un milieu de culture adapté à chacun des microorganismes est utilisé :

- le milieu BHI (Brain Heart Infusion) (Sigma Aldrich) supplémenté avec de l'hémine (5µg/mL) et du ménadione (1µg/mL, Sigma Aldrich) est utilisé pour *P. gingivalis*.
- le milieu LB (DifcoTM LB Broth, Miller (Luria-Bertani)) est utilisé pour *E. coli*.
- le milieu Sabouraud (DifcoTM Sabouraud Dextrose Broth) est le milieu de référence pour les levures, dont *C. albicans*.
- le milieu MH (DifcoTM Mueller Hinton) est un milieu standard utilisé pour *S. aureus*.

Réalisation du gel

L'antimicrobien est aliquoté préalablement à différentes concentrations dans du PBS ou de l'eau ultrapure (MiliQ).

80 µl d'AC 1% (AC), ou de mélange AC1%-plubisSH (50/50) (AC-Plus bisSH) sont mélangés à 20 µl d'antimicrobien préparé précédemment. L'ensemble est mélangé en prenant garde à ne pas faire de bulles.

La solution de gélification (GS) est un mélange de NaIO₄ (25 µl) et NaOH (3µl), qui est ensuite ajouté dans chacun des puits d'une plaque de 96 puits. Le volume final du gel fait 128 µl. Les gels sont préparés la veille de chaque manipulation et laissés 24 heures à 4°C.

Tests antibactériens utilisés

1. Méthode indirecte : test Alamar Blue™

Principe : le test contient un agent bleu faiblement fluorescent et non toxique, la résazurine. Les bactéries vivantes sont capables de le réduire en résorufine, fluorescente en rouge à 570 nm.

Un milieu de culture contaminé par *P. gingivalis* (100 µl) est mis au contact d'un gel précédemment formé dans des plaques 96 puits. Chaque condition est répétée en trois ou quatre fois. Il est ensuite récupéré selon la manipulation, à 5 heures et 24 heures, et mis en place dans une autre plaque 96 puits. 10 µl du test Alamar Blue sont ajoutés dans chaque puits, et l'ensemble est mis à incuber à 37°C pendant 4 heures. L'ensemble est visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

2. Formation de colonies

Un milieu de culture contaminé est mis sur des gels dans des plaques 96 puits. Après 24 heures, le surnageant est récupéré et étalé sur une boîte de pétri (agar). Le taux d'inhibition est calculé en mesurant le nombre de colonies croissant sur un gel testé/ nombre de colonies croissant sur un gel témoin sans antibactérien x 100.

3. Gamme d'évaluation

Pour vérifier l'efficacité des PAM sur les bactéries en milieu liquide, un mélange de 90 µL de milieu contaminé avec 10 µL d'agent antimicrobien est laissé 24 heures dans une boîte de 96 puits. La DO est mesurée le lendemain.

4. Test par Densité Optique

Un milieu de culture contaminé issu d'une préculture est mis sur des gels dans des plaques 96 puits (120 à 150 µL selon la manipulation). Chaque condition est répétée en trois ou quatre fois. Le milieu est récupéré à 24 heures (100 µL), et la densité optique est mesurée en comparaison avec des témoins négatifs (milieu non contaminé au-dessus d'un gel, milieu seul) et positifs (milieu contaminé seul, milieu contaminé au-dessus d'un gel sans antimicrobien).

Dans certaines manipulations, un nouveau milieu contaminé (à DO 0,001) est de nouveau rajouté au-dessus du gel afin de mesurer l'efficacité des gels sur du plus long terme. Cette expérience est menée jusqu'à une semaine.

Afin de confirmer les résultats indiqués par la densité optique, 5 µl du surnageant sont prélevés et mis sur une boîte de pétri afin de vérifier si les bactéries sont encore viables.

Calcul des concentrations initiales à mettre dans les gels

Vu que le relargage de peptide antimicrobien (PAM) concerne environ 10% de sa quantité introduite dans le gel, nous avons choisi de charger le gel à environ 10 fois la CMI des antimicrobiens. Selon ces estimations,

→ La concentration de CTL dans 150 μL de surnageant est de 312 $\mu\text{g/mL}$.

→ La masse moléculaire du CTL est de 1860 g/mol. La concentration molaire d'une solution-mère de 1 mg/mL de CTL (eau MiliQ) est de 537 μM ($1\text{mg/mL} / 1860\text{mg/mMol}$) ; soit 84 μM dans le gel (20/128 μL) et 9 μM dans 150 μL de surnageant.

2. Résultats et discussion

Évaluation des gels antimicrobiens sur *P. gingivalis*

Effet du L-CTL

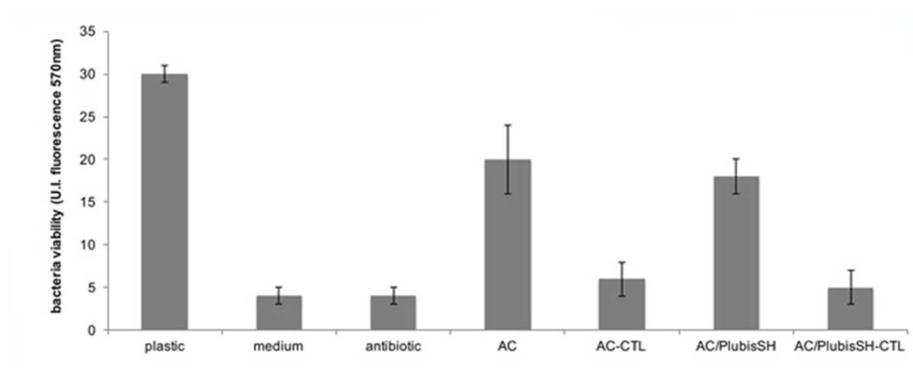


Figure 26 : test Alamar Blue – viabilité de *P. gingivalis* sur des gels d'AC chargés en L-CTL à 500 μM

Le test Alamar Blue montre une différence de viabilité entre :

- les bactéries (vivantes) qui ont été au contact : de gels non chargés en L-CTL
- les bactéries (mortes) qui ont été au contact d'antibiotiques ou de gels chargés en L-CTL

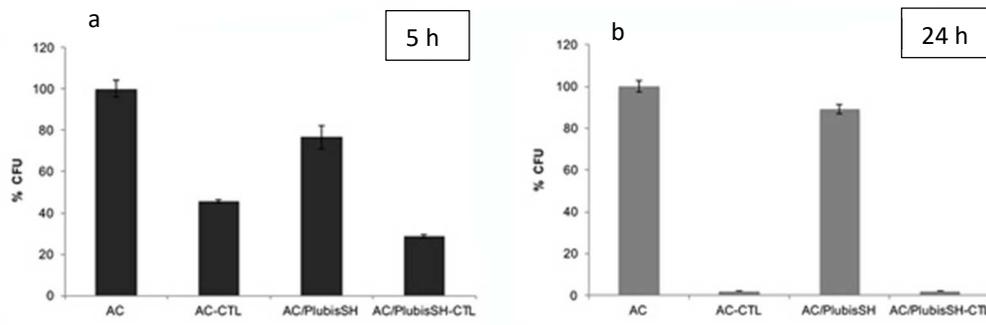


Figure 27 : formation de colonies de *P. gingivalis* au contact de gels chargés en L-CTL (500 μ M, soit 0,930 mg/mL), sur boîtes de pétri

P. gingivalis recolonise les boîtes à presque 100% lorsqu'il est au contact des gels sans antibactérien.

- Après 5 heures de contact du surnageant/gel avec L-CTL, entre 30 et 40% des bactéries peuvent survivre (a).
- Après 24 heures, aucune colonie ne survit et ne peut croître de nouveau (b).

Les premiers résultats montrent que L-CTL a une activité antibactérienne dès l'introduction d'une concentration de 500 μ M de L-CTL, soit une concentration relarguée théorique de 50 μ M (**figure 26**) (Mateescu et al. 2015). À cette concentration, seulement 50 % des colonies sont susceptibles de se reformer à 5 heures, et aucune à 24 heures, quel que soit le gel (AC ou AC plubisSH) (**figure 27**). Le test Alamar-Blue montre une activité bactérienne persistante à 5 heures, mais identique à celle des antibiotiques « contrôles ». Ainsi, le L-CTL pourrait être bactériostatique à de telles concentrations mais vu qu'aucune bactérie ne repousse à 24 heures, il présente plutôt des propriétés bactéricides.

Effet du D-CTL

a

b

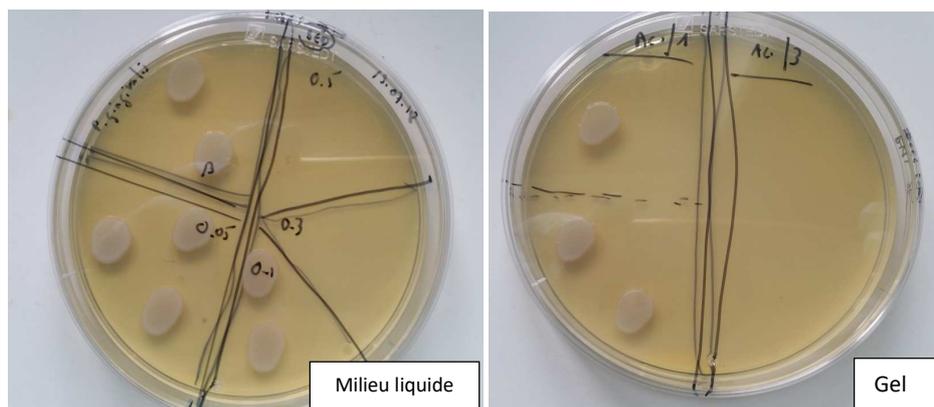


Figure 28 : contamination de boîtes de pétri (+24 heures) par *P. gingivalis*

La CMI de D-CTL sur *P. gingivalis* (*Pg*) en milieu liquide est de 30 $\mu\text{g/mL}$ (a). Le gel doit être chargé d'une solution-mère de D-CTL concentrée à 3mg/mL afin d'être efficace (b).

Milieu liquide

Les calculs de la CMI sont réalisés en faisant des gammes de concentration croissante de D-CTL. La CMI de D-CTL sur *Pg* est de 30 $\mu\text{g/mL}$ (solution-mère de 300 $\mu\text{g/mL}$) (**figure 28a**), est proche des résultats précédemment trouvés par Zaet et coll., qui sont de 10 $\mu\text{g/mL}$ (Zaet et al. 2017).

Gel

En mettant une solution-mère de 3 mg/mL dans le gel, le gel est concentré à 0,469 mg/mL, et le surnageant théoriquement à environ 310 $\mu\text{g/mL}$. Comme attendu, ce mélange est bactéricide (**figure 28b**). Cependant, les concentrations plus faibles n'ont pas d'effet bactéricide ; la CMI du gel est environ dix fois plus importante que la CMI attendue. De ce fait, soit le peptide est moins relargué que prévu (plutôt 1%), soit il est dégradé lors de son relargage. Les concentrations sont plus importantes qu'avec le L-CTL (**figure 26 et 27**), ce qui peut être lié au lot d'AC. En effet, les résultats précédents sont réalisés avec le premier lot d'AC, et le reste des résultats avec le 2^e lot. La libération d'antimicrobiens peut ainsi différer. De plus, ces CMI de D-CTL sont nettement bactéricides contrairement aux résultats retrouvés avec la L-CTL. Un test Alamar Blue devrait être réessayé afin de comparer les deux peptides. Dans cette étude, nous sommes partis de concentrations de solutions-mère maximales de 5 mg/mL de CTL, le PAM ne pouvant pas être soluble à des concentrations plus élevées.

Effet de l'amoxicilline

Milieu liquide

Selon les mêmes modes de calculs et les mêmes expérimentations, la CMI de l'amoxicilline est de 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Gel

La concentration minimale de solution-mère à introduire dans le gel afin d'obtenir un effet bactéricide est de 5 $\mu\text{g/mL}$ (test sur plaque par densité optique). Selon les mêmes hypothèses de relargage (10%), il y aurait une concentration d'amoxicilline de 3,3 $\mu\text{g/mL}$ dans le surnageant. Cette concentration étant bien bactéricide correspond à 7 fois la CMI en milieu liquide. Il y a donc vraisemblablement moins d'amoxicilline relarguée que prévue, ou de l'amoxicilline dégradée également.

Effet d'associations d'antimicrobiens

Des associations ont été effectuées en première approche :

$\frac{1}{2}$ CMI amoxicilline - $\frac{1}{2}$ CMI D-CTL

$\frac{1}{2}$ CMI amoxicilline - $\frac{1}{4}$ CMI D-CTL

$\frac{1}{4}$ CMI amoxicilline - $\frac{1}{2}$ CMI D-CTL

En effet, Zaet et coll. ont montré que l'utilisation de ces antibiotiques était synergique, et permet de faire baisser le risque de résistances (Zaet et al. 2017).

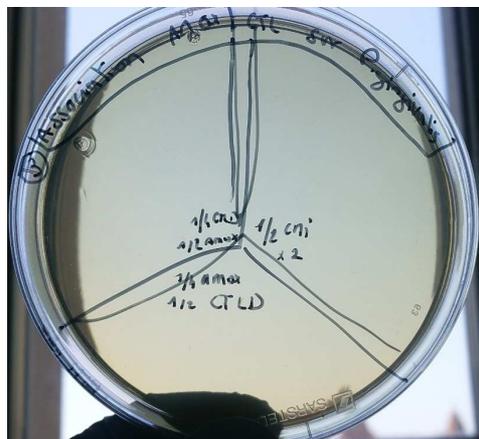


Figure 29 : effet bactéricide (+ 24h) de l'association amoxicilline/ D-CTL au sein du gel sur P. gingivalis

Le fait de d'associer l'amoxicilline et la D-CTL permet de diminuer la CMI des 2 antimicrobiens.

Cette « prémanipulation » s'avère en effet prometteuse (**figure 29**), et va dans le sens des résultats retrouvés dans la littérature sur la combinaison d'antimicrobiens, qui agissent de façon synergique (Yang et al. 2018). Elle doit être répétée avec des contrôles positifs et négatifs précis.

Évaluation des gels antimicrobiens sur *E. coli*

Effet du L et D-CTL

Milieu liquide

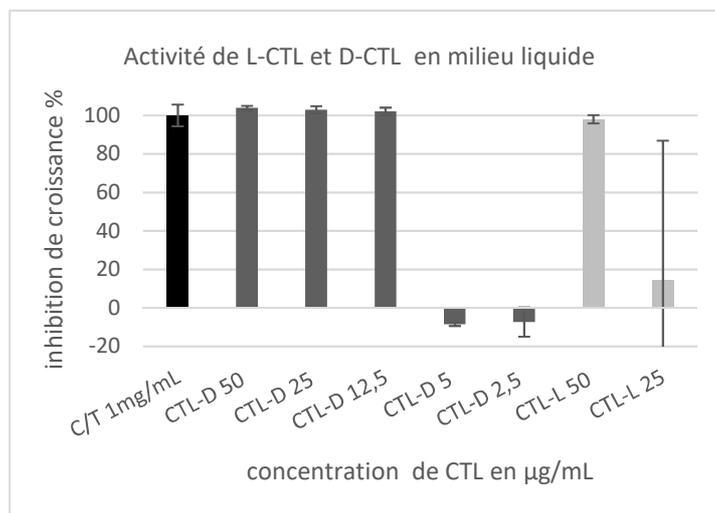


Figure 30 : pourcentage d'activité antimicrobienne des CTL sur *E. coli*

La CMI de D-CTL sur *E. coli* dans nos conditions expérimentales est de 12.5 µg/mL, et celle de L-CTL est de 50 µg/mL (test par densité optique).

La CMI de D-CTL sur *E. coli* a été calculée à 12,5 µg/mL (**figure 30**). Ainsi, le gel doit relarguer au minimum cette concentration dans le surnageant afin d'être bactéricide. Précédemment, la CMI de D-CTL en milieu aqueux a déjà été évaluée à 4 µM (8µg/mL) sur *E. coli* (Zaet et al. 2017), ce qui est du même ordre de grandeur dans ces résultats.

Gel

La concentration initiale de solution-mère à introduire dans le gel de D-CTL pour obtenir une inhibition est de 3mg/mL. Cette concentration est retenue afin de réaliser les tests antimicrobiens dans les boîtes (voir chapitre 4).

Évaluation de D-CTL sur *S. aureus*

Milieu liquide

Nos calculs de l'effet de D-DTL indiquent une CMI de 50 mg/mL.

Gel

À partir d'une concentration de solution-mère introduite dans le gel à 3mg/mL, il s'avère bactéricide sur *S. aureus* à 24 heures dans des tests conventionnels de calcul de DO (**figure 31**).

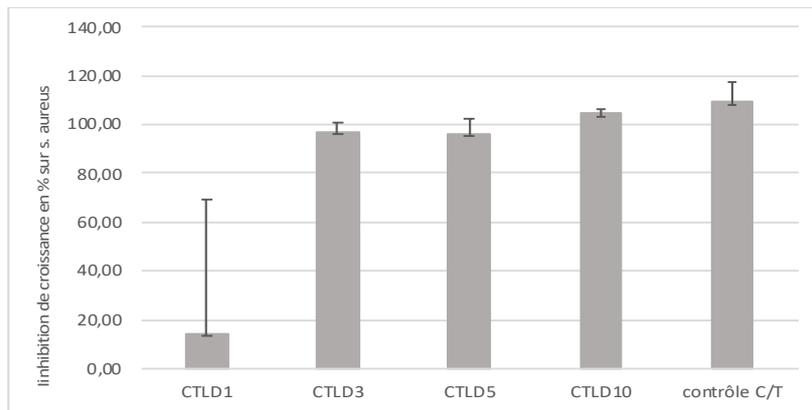


Figure 31 : concentration initiale de D-CTL (en mg/mL) introduite dans le gel

Évaluation de D-CTL sur *C. albicans*

Milieu liquide

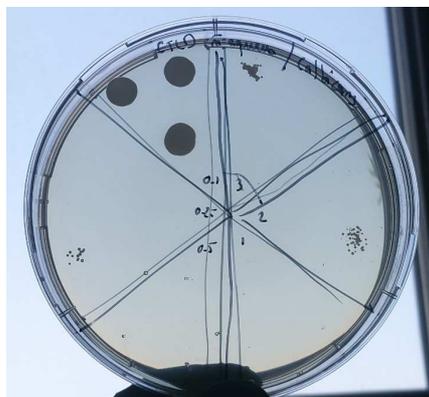


Figure 32 : évaluation de la CMI de D-CTL sur *C. albicans* à 24 heures

Les manipulations sont réalisées sur une plaque de 96 puits, puis une partie du surnageant (2 μ L) est réensemencé sur une boîte de pétri (**figure 32**). La CMI est de 10 μ g/mL sur la souche de *C. albicans* testée.

Gel

Le gel est fongicide à partir d'une concentration initiale de 3 mg/mL de D-CTL dans des tests conventionnels de calcul de DO.

Dans ces tests, la D-CTL s'est avérée plus bactéricide que la L-CTL et a été retenue par la suite pour les manipulations en tant que PAM de référence. Les associations amoxicilline/PAM semblent prometteuses et nécessitent d'être explorées.

II. Évaluation du relargage des peptides hors du gel par fluorescence

1. Matériels et méthodes

Afin d'évaluer la quantité nécessaire d'antimicrobien à mettre dans le gel et en première approche, le taux de relargage de peptide a été évalué grâce à de la CTL marquée à la rhodamine (CTL-Rh, Proteogenix, France). La pureté de la CTL rhodaminée est évaluée à l'aide d'un séquenceur automatique d'Edman (Applied Biosystem, France). L'hydrogel est chargé en CTL à partir d'une solution initiale de 500 μM de CTL-Rh préparée dans l'eau MiliQ, pour une concentration finale de 200 μM . L'hydrogel est mis à incuber 17 heures à 37°C en milieu humide afin de d'assurer de sa prise complète. Les gels « contrôle » contiennent de l'eau MiliQ sans rhodamine. À la fin de l'incubation, 150 μL de milieu MH sont versés au-dessus du gel. Aux différents moments choisis de l'évaluation, 50 μL de milieu MH sont prélevés et mis dans une plaque 96 puits pour analyse au spectrophotomètre à 570 nm (spectrofluorimètre Xenius XC, SAFAS, Monaco). Ils sont remplacés par 50 μL de milieu MH frais afin d'assurer un volume constant au-dessus du gel. L'expérience est menée sur 2 jours.

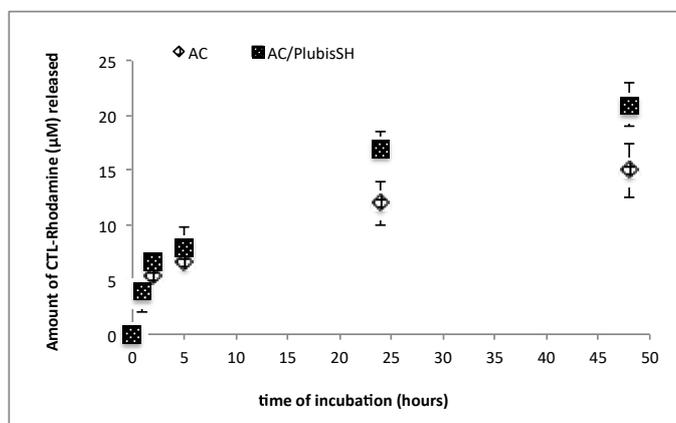


Figure 33 : relargage du CTL-rhodaminé hors des gels (peptide compound release)

La spectrométrie à fluorescence est utilisée afin d'évaluer le taux de relargage du CTL rhodaminé hors des gels AC1% et AC0,5%-PlubisSH sur 2 jours. Les résultats indiquent la valeur cumulée de relargage.

2. Résultats et discussion

Le relargage du CTL-Rh est de 15 μM pour l'AC1%, et de 20 μM pour l'AC 0,5%- PlubisSH sur 2 jours (**figure 33**). Ces taux sont de l'ordre de 10% de la quantité initialement présente dans chacun des 2 gels (Mateescu et al. 2015).

Sur du plus long terme, le reste des peptides est :

- soit prisonnier dans le gel avec des liaisons chimiques, sans pouvoir sortir,
- soit libéré avec la dégradation progressive de la matrice du gel.

Dans cette expérimentation, le peptide CTL-Rh ne possède pas exactement la même structure que le peptide natif par la présence de rhodamine, ce qui peut donner des valeurs différentes de relargage. De plus, une partie du signal fluorescent peut être perdue avec la dégradation de la rhodamine. Les résultats sont toutefois à prendre en considération en « ordre de grandeur », avant d'introduire d'autres concentrations de CTL dans le gel, et d'évaluer leur activité directement sur des bactéries.

La CTL restante peut aussi faire partie intégrante de la structure du gel et le renforcer, comme le montre la **figure 16 (chapitre 1)**. Ce phénomène ne se fait pas au détriment de l'efficacité à court terme, comme certaines études le montrent sur d'autres assemblages (Yang et al. 2018). Une évaluation de l'efficacité de CTL sur du plus long terme s'avère nécessaire.

III. Évaluation des peptides relargués par HPLC et MALDI-TOF

1. Objectifs

Il s'agit d'évaluer la nature des éléments présents dans le gel et sortis du gel lorsqu'un surnageant est mis dessus.

2. Matériels et méthodes

Les gels sont préparés avec les peptides L-CTL et D-CTL ; la solution-mère servant à les faire étant concentrée à 1 mg/mL. Ils sont laissés une nuit à 4°C et le lendemain, 180 µL de surnageant (eau miliQ) sont mis au-dessus du gel. L'ensemble est laissé entre 24 heures et 7 jours à température ambiante. Le surnageant est récupéré afin d'évaluer s'il y a une différence de relargage du peptide hors du gel avec le temps. A 7 jours, le gel est également récupéré et broyé à l'aide d'une lame de bistouri. 180 µL d'eau miliQ sont rajoutées par-dessus les fragments et l'ensemble est centrifugé 15 minutes à 13000 tours par minute. 20 µL de ce surnageant sont également récupérés pour analyse.

→ *Analyse en Chromatographie Liquide Haute Performance (High Performance Liquid Chromatography ou HPLC)*

Le prélèvement de 20 µL du surnageant est récupéré (1/9 du surnageant), et mélangé à 980 µL de mélange H₂O-TFA à 0,1%. Le témoin positif est un prélèvement de 20 µL de PAM pur, dilué dans de l'eau miliQ. Les échantillons sont analysés par HPLC en phase inverse (Dionex ultimate 3000, colonne Macherey-Nagel nucleosil 300-5 C18), en gradient d'élution A : H₂O/TFA 0,1% ; B : 70 % ACN/TFA 0,09% dans H₂O (**figure 34**).

→ *Analyse par spectrométrie de masse (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight, ou MALDI-TOF)*

Pour chaque pic récupéré, une analyse de la masse moléculaire des différents éléments retrouvés est faite (**figure 36-37**), et comparée au peptide initial (**figure 35**).

3. Résultats et discussion

Analyse par HPLC

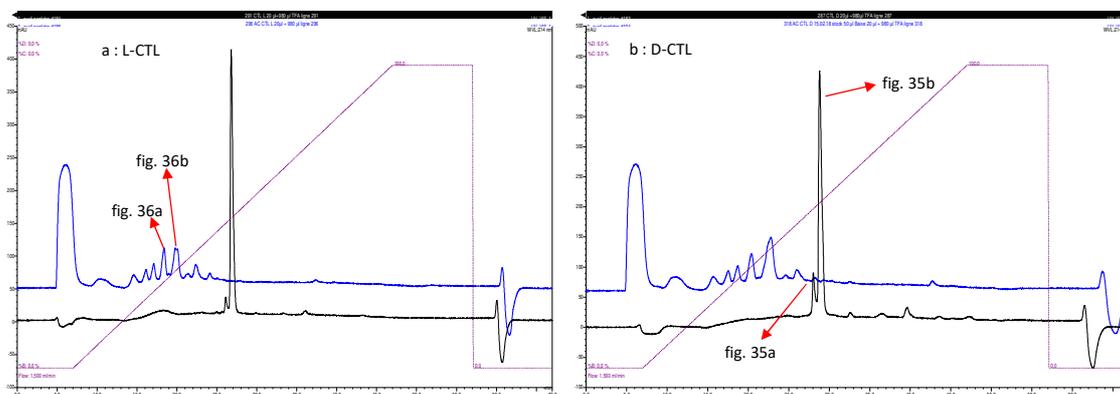


Figure 34 : analyse HPLC de L et D-CTL à 24 h - comparaison PAM pur et surnageant

Les courbes inférieures (en noir) montrent un petit pic, forme oxydée des CTL, et un pic principal, forme réduite et active des CTL. La courbe supérieure (bleue) indique un premier gros pic, suivi de plusieurs petits pics.

L'analyse des CTL pures montre bien la présence du peptide actif dans sa forme réduite (courbes inférieures en noir, **figure 34**). La concentration initiale de CTL de 1 mg/mL correspond à une valeur de 20 μg (pour 20 μL) de peptide analysé. Pour la L-CTL, le pic principal mesure 10,7 centimètres, et correspond ainsi à 19 μg de peptide, le pic secondaire faisant 0,6 μg (**figure 34a**). Les valeurs sont sensiblement identiques pour la D-CTL.

Les courbes supérieures bleues indiquent un premier pic, correspondant aux sels relargués ou présents en surface du gel (NaIO_4). En effet, lors de la prise du gel avec le mélange à la solution de gélification, il existe un léger phénomène de synérèse : le gel relargue des sels qui restent présents à sa surface et qui se diluent dans le surnageant. L'ensemble des petits pics secondaires correspond au peptide dégradé : la longueur d'onde de mesure à 214 nm est caractéristique des liaisons peptidiques (Pauling 1960). Leur somme représente environ 40% de la valeur initiale de la CTL. Les courbes d'HPLC du surnageant à 7 jours et du gel broyé présentent le même profil de courbe. Chacun de ces petits pics est ensuite analysé en spectrométrie de masse.

Analyse par spectrométrie de masse

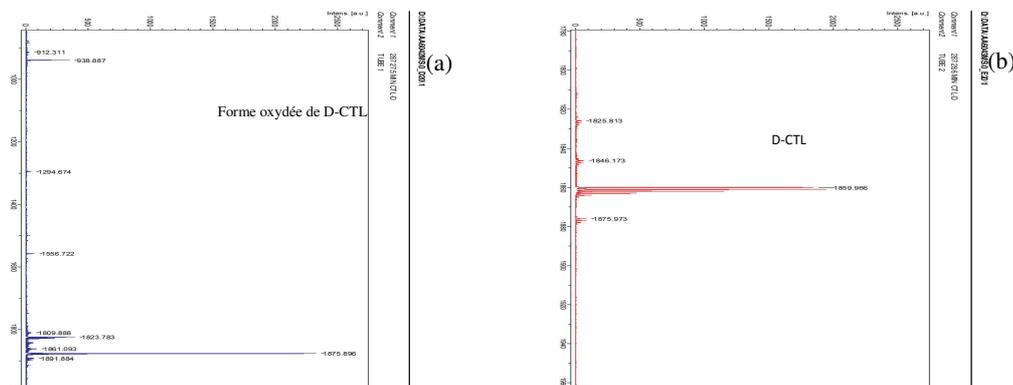


Figure 35 : analyse au spectrophotomètre de masse de D-CTL : forme oxydée (a) et réduite (b)

Les pics indiquent le PM des éléments retrouvés dans l'échantillonnage. La forme oxydée (a) possède un atome d'oxygène en plus d'où un PM à 1876 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Les L et D-CTL possèdent exactement les mêmes pics.

Les L et D-CTL préparées dans l'eau miliQ sont retrouvées intactes à la spectrométrie de masse (forme oxydée ou réduite) (**figure 35**). En revanche, lorsqu'elles sont récupérées dans le surnageant à 24 heures ou 7 jours, elles se présentent sous une forme dégradée, de poids moléculaire variable (**figures 36-37**). Il n'y a pas de lien entre l'intensité d'un petit pic d'HPLC et la nature des fragments peptidiques récupérés, même si certains fragments sont retrouvés de façon plus fréquente (768, 1051, 1448 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$). En revanche, le peptide complet n'est presque pas retrouvé dans les surnageants quel que soit le temps (24 heures ou 7 jours), ni dans les broyats du gel avec cette technique.

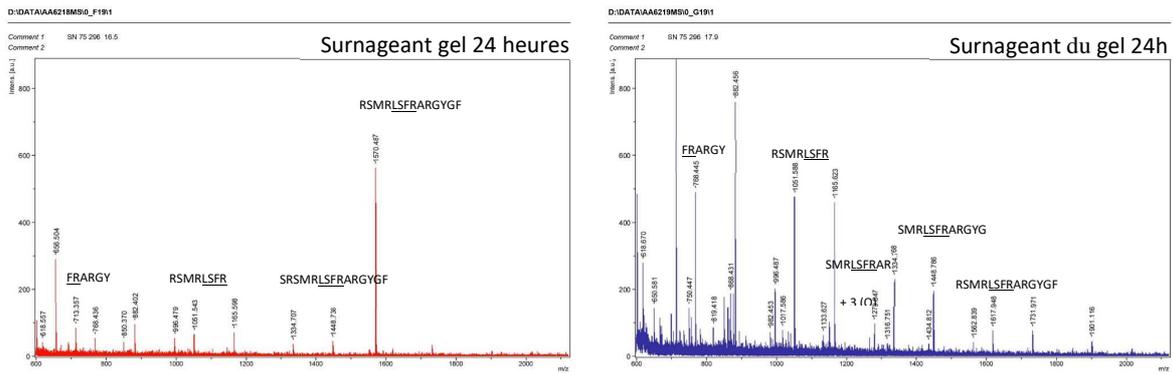


Figure 36 : analyse spectrophotométrique des surnageants du gel AC1% L-CTL

Différents pics de PM sont retrouvés dans chaque échantillon récupéré à l'HPLC. Ces PM ne correspondent pas au peptide en entier : ils sont globalement plus petits.

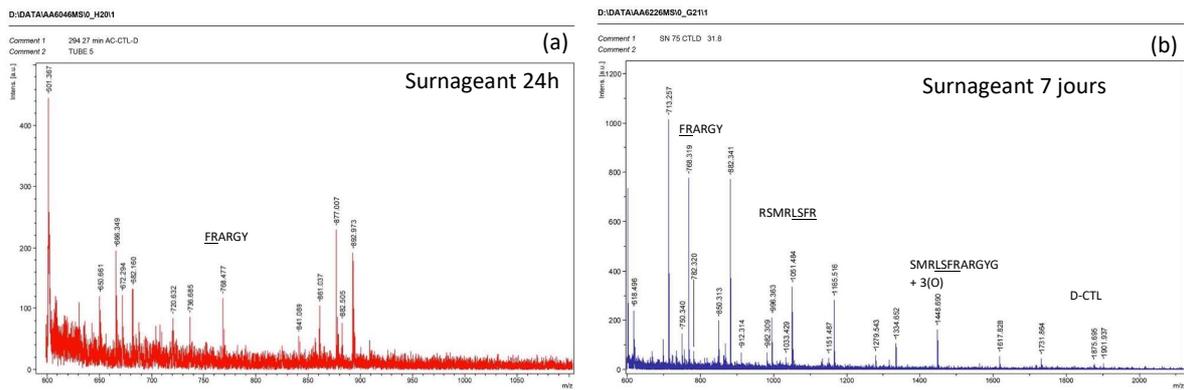


Figure 37 : analyse spectrophotométrique des surnageants du gel AC1% D-CTL

Le profil des pics est similaire à celui de la L-CTL, même si les pics ne sont pas identiques.

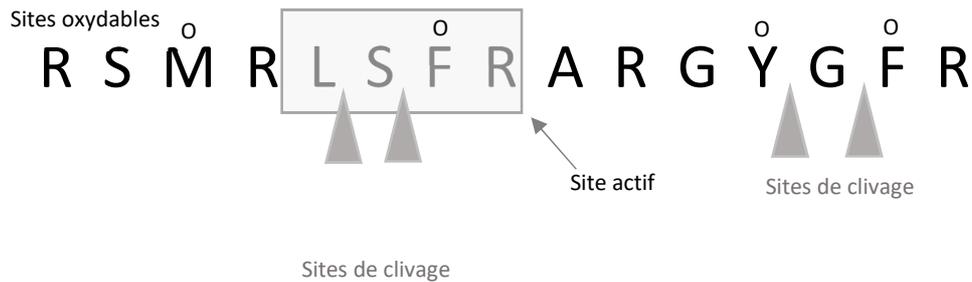


Figure 38 : sites préférentiels de clivage pour le peptide CTL

Le peptide possède des sites de clivage possibles sur des liaisons peptidiques plus fragiles entre 2 acides aminés (AA). Lorsque l'oxydation d'un AA est possible (F : phénylalanine, M : méthionine, Y : tyrosine), la masse molaire croît de 16 g/mol à chaque oxygène ajouté.

D'après le PM, différents fragments peptidiques possibles sont régulièrement retrouvés, à 24 heures et à 7 jours :

- RSMRLSFRARGYG + (4O) (PM 1617)
- RSMRLSFRARGYG + (O) (PM 1570)
- SMRLSFRARGYG + (3O) (PM 1448)
- SMRLSFRARGYGF + (O) (PM 1562)
- RSMRLSFRAR (PM 1279)
- RSMRLSFR (PM 1051)
- SFRARGY (PM 768)
- FRARGYGF + (O) (PM 990)

Certaines de ces formes sont oxydées, voire couplées avec des ions tel que Na, issu du NaIO₄. Nous retrouvons fréquemment la séquence LSFR qui est le site actif de l'hélice α (Akaddar et al. 2010). Ainsi, même si le peptide est dégradé à ses extrémités, la préservation de ce site lui confère encore une activité antimicrobienne possible. Le clivage du peptide se fait le plus souvent sur un des sites de clivage déjà connu (liaisons peptidiques faibles) (**figure 38**), et certains ont déjà été identifiés comme étant actifs

(Briolat et al. 2005). L'ensemble de ces manipulations doit être refait en changeant l'eau par de la salive humaine contenant des protéases. En effet, l'eau est connue pour dégrader le peptide (Aslam et al. 2013), qui réagit différemment dans un environnement biologique contenant des peptidases. D'autre part, le fait que D-CTL ne soit pas dégradée par les endoprotéases en fait un peptide d'intérêt.

Une autre hypothèse du non-relargage complet du peptide est que le peptide participe pleinement à la structure du gel, seule une fraction étant relarguée, dégradée ou non. En effet, la CTL chargée positivement se rigidifie au contact des membranes lipidiques biologiques chargées négativement, et solidifie ainsi l'ensemble (Jean-Francois et al. 2008). Lors des tests précédents de rhéologie, la première cinétique de gélification a montré que G' était plus important avec présence de CTL (40 Pa) que sans (34 Pa) (**chapitre 2, figure 16**). Même si cette expérience doit être répétée, ces données vont dans le sens des résultats précédents : des liaisons existent vraisemblablement entre les quinones libres ou les autres charges négatives des chaînes de l'alginate-catéchol.

Lors de la dégradation du gel, le peptide emprisonné pourrait être actif contre les bactéries rencontrées, dans la mesure où la concentration bactérienne n'est pas trop importante et si le site actif de CTL est encore disponible. Des expériences sur du plus long terme doivent ainsi être menées. D'autres poids moléculaires bien plus importants sont retrouvés dans le surnageant au-dessus du broyat de gel (PM 1380 à 7715). Ils peuvent correspondre à des agglomérats de peptides ou à des peptides liés à une chaîne d'alginate-catéchol.

IV. Évaluation de la colonisation bactérienne en surface et au sein du gel

1. Matériels et méthodes

Quatre conditions sont évaluées :

- Gel (AC 1%) sans bactérie.
- Gel (AC 1%) seul avec bactéries (*P. gingivalis*).
- Gel (AC 1% + PAM (D-CTL 3mg/mL)) avec bactéries (*P. gingivalis*).
- Gel (AC 1% + amoxicilline 1µg/mL) avec bactéries (*P. gingivalis*).

Préparation des gels

Les gels sont préparés classiquement :

- Mélange d'AC 1% pur (80 µl) à une solution d'eau ultrapure (MiliQ) (20 µl) contenant ou non les antimicrobiens.
- Rajout et mélange de la solution de gélification (NaIO₄-NaOH) (28 µl) à la solution précédente.

Pour les visualisations directes sur boîtes de pétri

100 µl d'une préculture de *P. gingivalis* à DO 0,001 sont déposés dans une boîte de pétri de milieu BHI. Les gels précédemment fabriqués sont apposés directement dessus et l'ensemble est mis à incuber 24 heures à 37°C.

Pour les visualisations sur coupes

Les gels sont fabriqués et immédiatement aspirés par la seringue à insuline. Du milieu de culture (BHI) contaminé ou non est alors versé au-dessus du gel (150 µl). L'ensemble est laissé 24h dans l'incubateur à 37°C (**figure 39**).



Figure 39 : montage du gel dans des seringues

24 heures après incubation, les milieux contaminés sont vidés et la carotte de gel est éjectée à l'aide du piston après avoir sectionné la pointe de la seringue.

Traitement des gels

Fixation

Les gels sont récupérés, mis dans une solution de cacodylate de sodium 0,05 M + glutaraldéhyde 4% ajusté à pH 7.4 pendant 48h (fixation primaire). Ils sont ensuite lavés 3 fois 10 minutes (cacodylate de sodium 0,1 M pH 7.4). Une fixation secondaire est effectuée (cacodylate de sodium 0,1M + tetroxyde d'osmium 1%) pendant 30 min à 4°C. Les gels sont à nouveau lavés 2 fois 10 min et ensuite conservés dans le tampon de lavage.

→ *Préparation pour la microscopie optique et en transmission*

Déshydratation

Les gels sont mis dans des solutions d'éthanol de concentration croissante : 3 minutes à 30°, 5 minutes à 50°, 5 minutes à 70°, 5 minutes à 95°, 3 fois 3 minutes à 100°.

Imprégnation

Les carottes sont imprégnées dans les solutions suivantes :

- Ethanol 100°/ résine Spurr (chémpolymérisable) (volume 1/1) : 10 minutes.
- Ethanol 100°/ résine Spurr (chémpolymérisable) (volume 1/2) : 30 minutes avec capuchon fermé et 30 min avec capuchon ouvert.
- Résine Spurr seule : 2 fois 60 minutes.

Inclusion et polymérisation

Les gels sont inclus dans la résine Spurr et mis à polymériser dans une étuve à 60°C pendant 48h minimum.

→ *Préparation pour la microscopie électronique à balayage (MEB)*

Les échantillons ont été préparés selon 2 méthodes :

1. Séchage à l'Hexamethyldisilazane (HMDS)

Après la fixation primaire et déshydratation, les échantillons sont placés successivement dans un mélange Ethanol absolu : HMDS 1/1 pendant 5min puis dans un bain d'HMDS pur 2 fois 5min. Après avoir aspiré l'HMDS, les échantillons sont mis à sécher sous sorbonne 24h minimum.

2. Lyophilisation

Après la fixation primaire et lavage, les échantillons sont placés dans une solution de cacodylate de sodium 0.05M + Sucrose 10% à 4° pendant 16h, puis rincés brièvement à l'eau distillée et mis au congélateur à -80°C pendant 2h. Ensuite, ils sont mis à lyophiliser pendant 24h (Christ ALPHA 1-4 LD PLUS, MARTIN CHRIST, Osterodam Harz, Allemagne).

Visualisation des gels

Microscopie photonique

Des coupes semi fines d'environ 1,25µm sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome et montées sur des lames. Ces dernières sont colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique (**figure 40**).

Microscopie électronique en transmission

Des coupes ultrafines d'environ 100nm sont réalisées et déposées sur des grilles 100 mesh coatées au formvar et carbone. Les grilles sont contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb puis observées au microscope électronique en transmission (EM208, FEI, Eidhoven, Pays-Bas) sous une tension d'accélération de 70kV. Après développement des négatifs, ces derniers sont numérisés à l'aide d'un scanner EPSON PERFECTION V750 PRO (EPSON FRANCE, Levallois Perret, France).

Microscopie électronique à balayage

Après séchage, les échantillons sont métallisés (HUMMER JR, ANATECH USA, Hayward, CA, USA) puis observés au Microscope électronique à Balayage Quanta FEG 250, FEI, (Eidhoven, Pays-Bas), en mode conventionnel.

2. Résultats et discussion

Microscopie Optique - gel sans antimicrobien

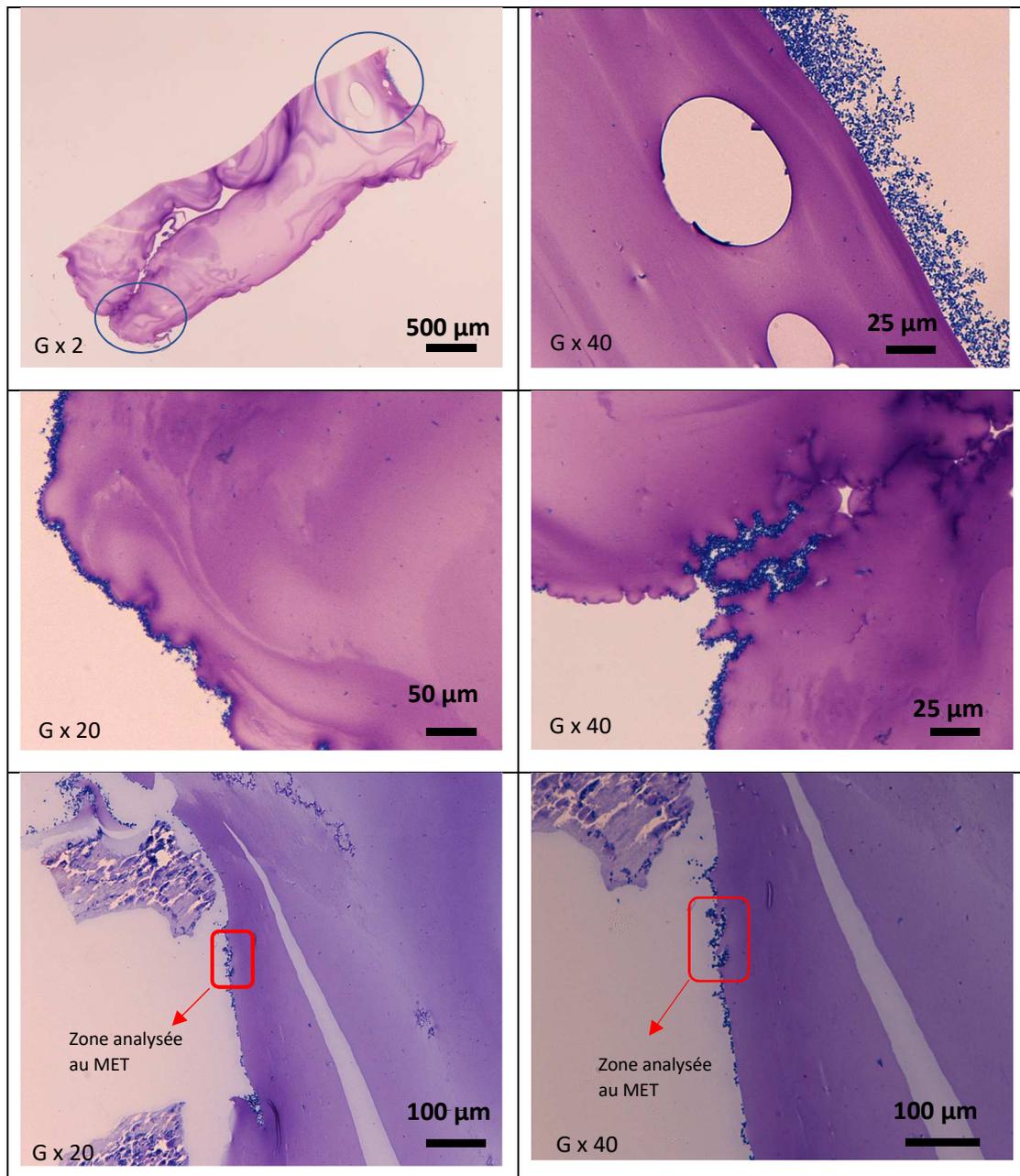


Figure 40 : gel d'ACI% sans antimicrobien + *P. gingivalis* - vues microscope optique

Les bactéries sont présentes sur tout le pourtour du gel (points bleus), et ne pénètrent pas au sein du gel.

Les premières vues en microscopie optique montrent que sans PAM, le gel n'est pas antibactérien car une couche de bactéries organisée en biofilm vient le tapisser (**figure 40**). Ces bactéries s'immiscent également dans les interstices (bulles) créées initialement lors de la formation du gel, d'où l'importance de le préparer de façon homogène. En revanche, les bactéries ne pénètrent pas à l'intérieur du gel, qui

agit de ce fait comme une barrière mécanique. Une étude sur du plus long terme doit cependant être menée afin de confirmer ces résultats.

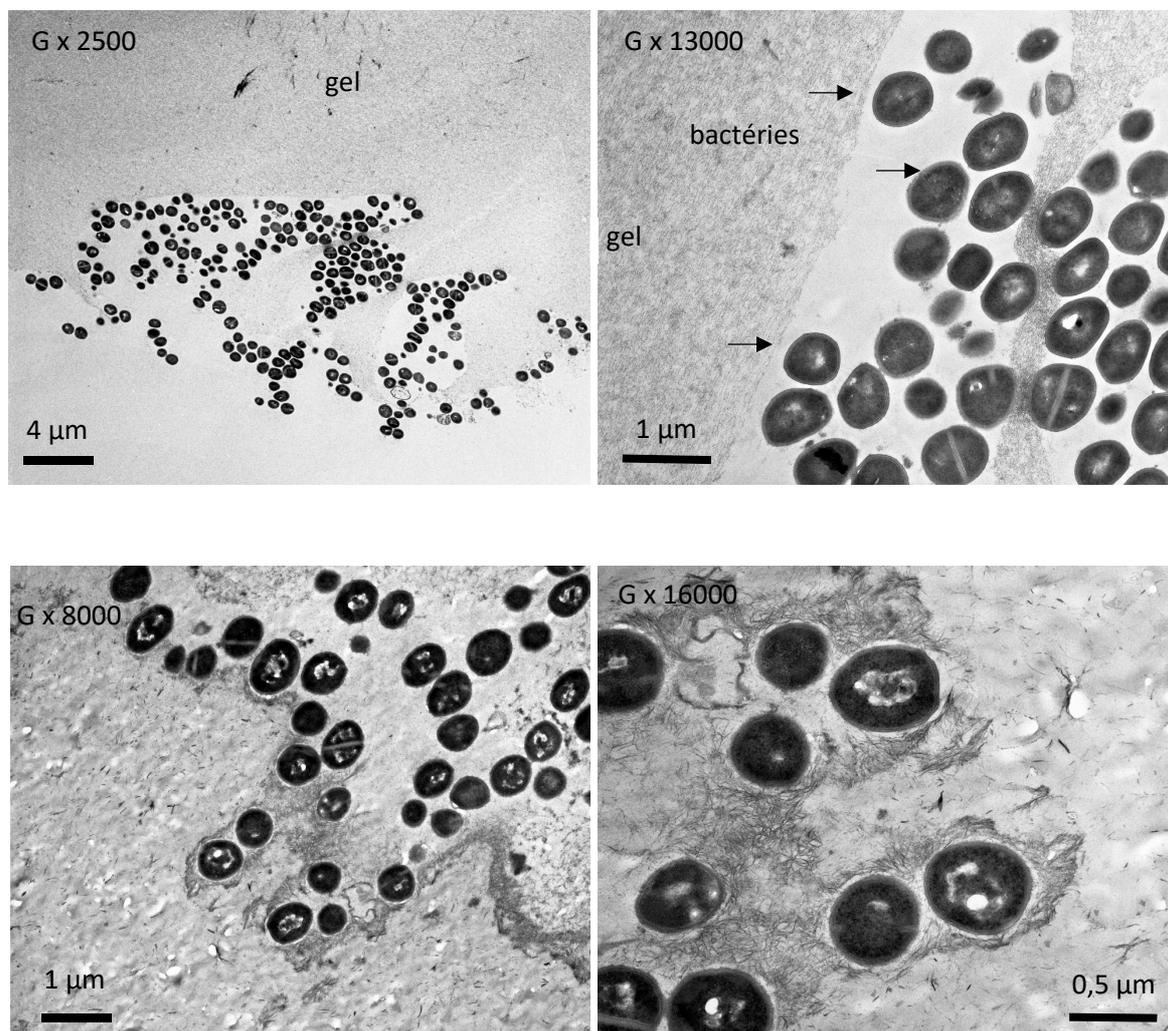
MET - gel sans antimicrobien

Figure 41 : gel d'AC1% sans antimicrobien au contact de *P. gingivalis* : vues MET

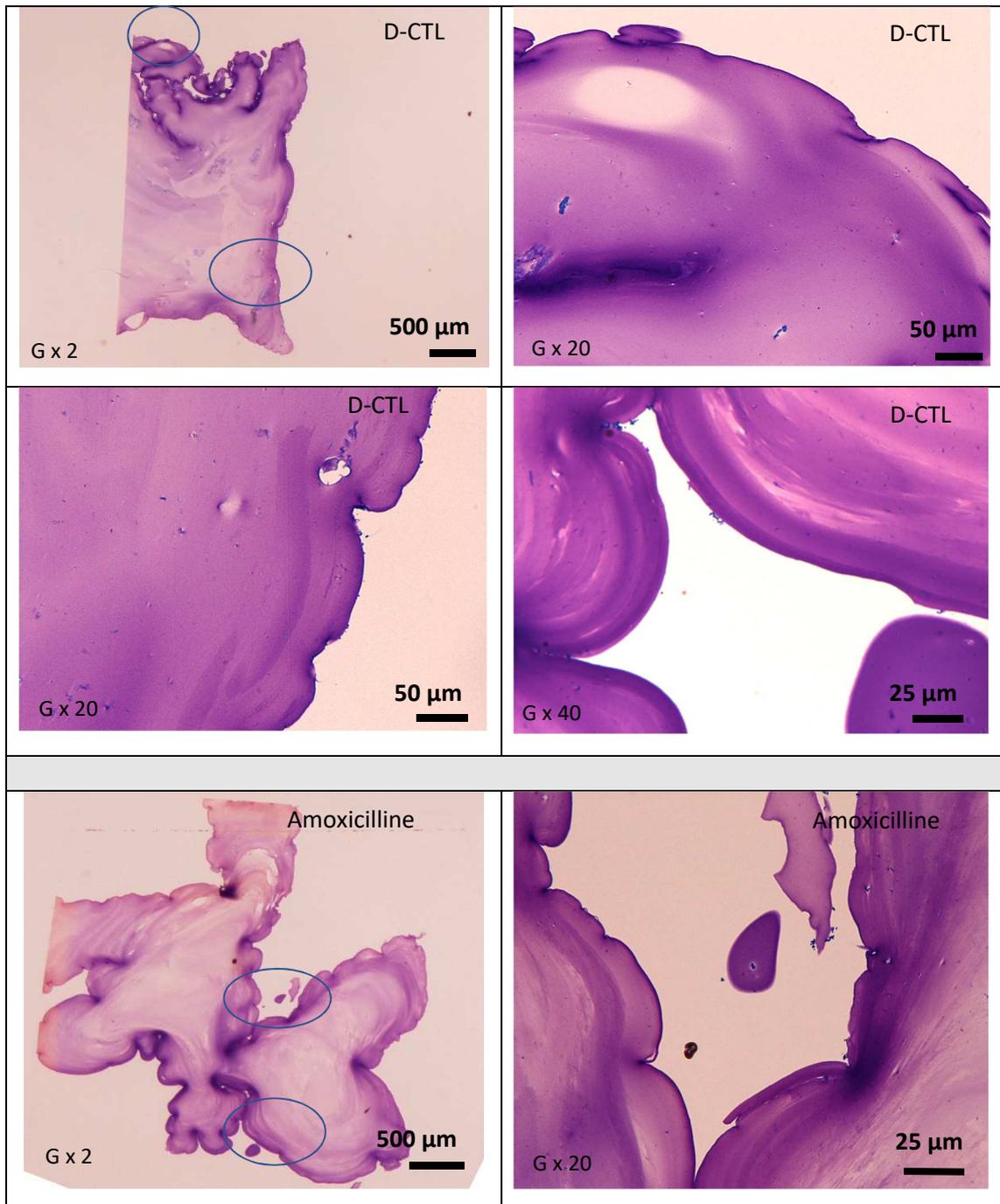
Les vues au MET confirment que les points bleus vus en microscopie optique (**figure 40**) sont bien des bactéries.

Les coupes en MET renforcent ces résultats préliminaires, et montrent l'agrégation de bactéries en amas en surface du gel. Elles sont arrondies et ne semblent pas adhérer facilement à la surface du gel (**figure 41**). Le maillage du gel d'AC du gel est bien mis en évidence à fort grossissement.

Microscopie optique - gel avec antimicrobiens (amoxicilline ou D-CTL)

Les bactéries sont quasiment absentes de la surface des gels d'AC et ne pénètrent pas dedans non plus, sauf dans les bulles en surface (**figure 42**). Plus précisément, elles n'ont pas la possibilité de croître dans le surnageant et le gel reste intact. L'effet bactéricide déjà constaté par les techniques précédentes est

confirmé par la microscopie. Une évaluation sur un plus long terme permettrait de confirmer l'absence de colonisation à l'intérieur du gel grâce à sa structure et/ou la présence d'antimicrobiens encore actifs.



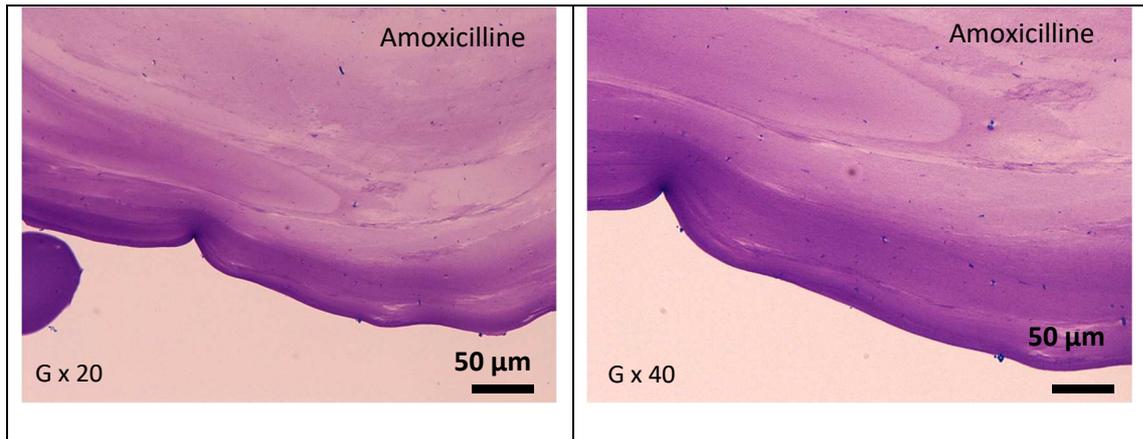


Figure 42 : gel d'AC 1% avec D-CTL et amoxicilline + *P. gingivalis* – vues microscope optique

Les bactéries sont très peu présentes en surface et dans le gel. La présence de D-CTL et d'amoxicilline dans le gel assure un effet antimicrobien à 24 heures.

Microscopie Électronique à Balayage

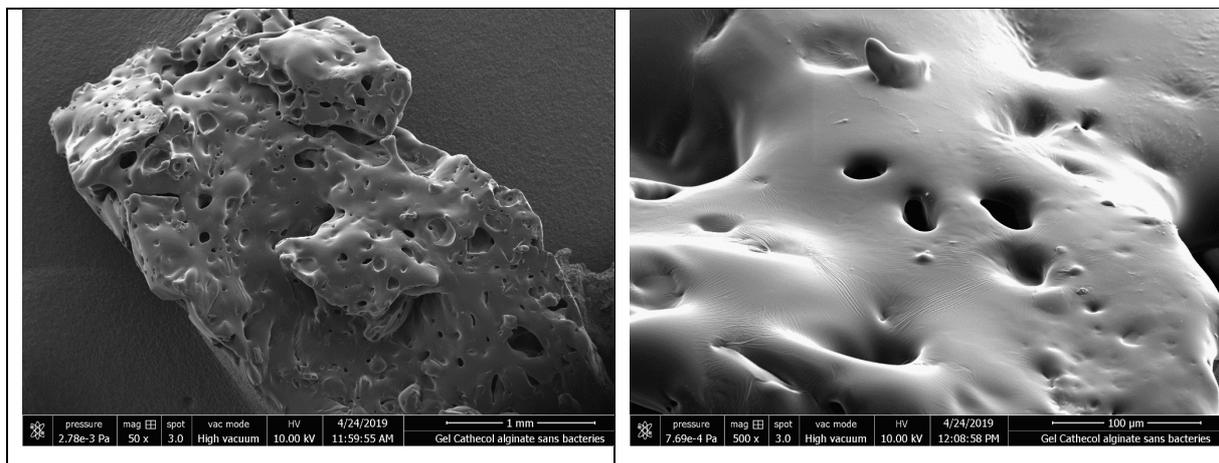


Figure 43 : gel d'AC 1% pur- vue MEB

Le gel présente une structure spongieuse (séchage par lyophilisation). Les pores participent aux propriétés viscoélastiques du gel, mais peuvent constituer des réservoirs bactériens en cas de contamination.

La méthode de lyophilisation combinée au MEB, permet de visualiser la surface sur laquelle les bactéries peuvent se développer (**figure 43**).

En l'absence d'agents antimicrobiens, *P. gingivalis* est retrouvé aussi bien sur les surface lisses que dans les anfractuosités du gel (**figure 44**). Lorsque la D-CTL (**figure 45**) ou l'amoxicilline (**figure 46**) sont rajoutées, il n'y a plus de bactérie en surface, comme le montrent précédemment les vues en microscope optique (**figure 42**). Ainsi, les gels chargés en D-CTL ou en amoxicilline empêchent la croissance bactérienne à leur surface sur 24 heures.

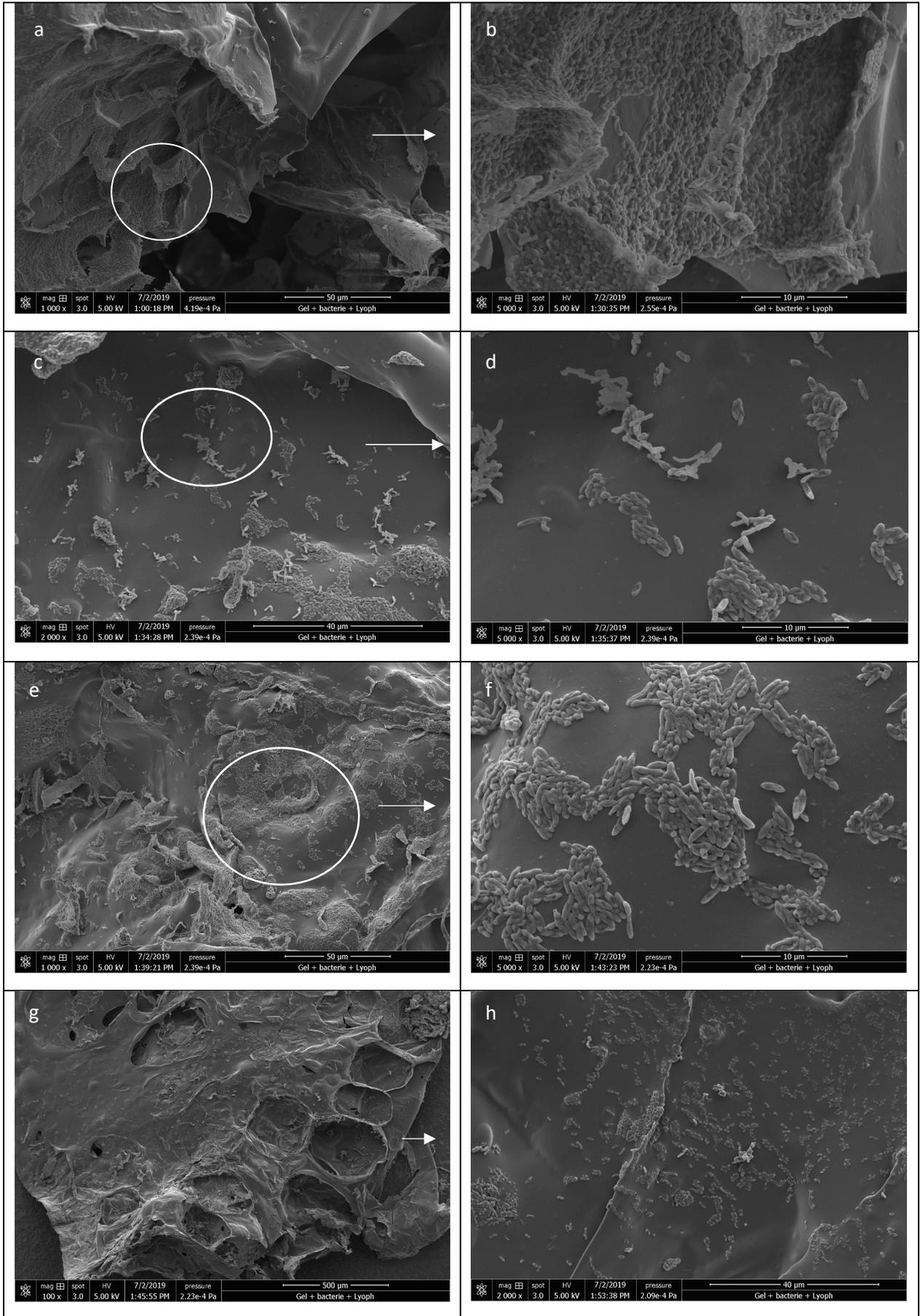


Figure 44 : gel sans antimicrobien au contact de bactéries à 24h – vues MEB G X 100 à G X 5000

A gauche (a,c,e,f), différentes zones du gel observées et à droite, la même zone à fort grossissement (b,d,g,h).

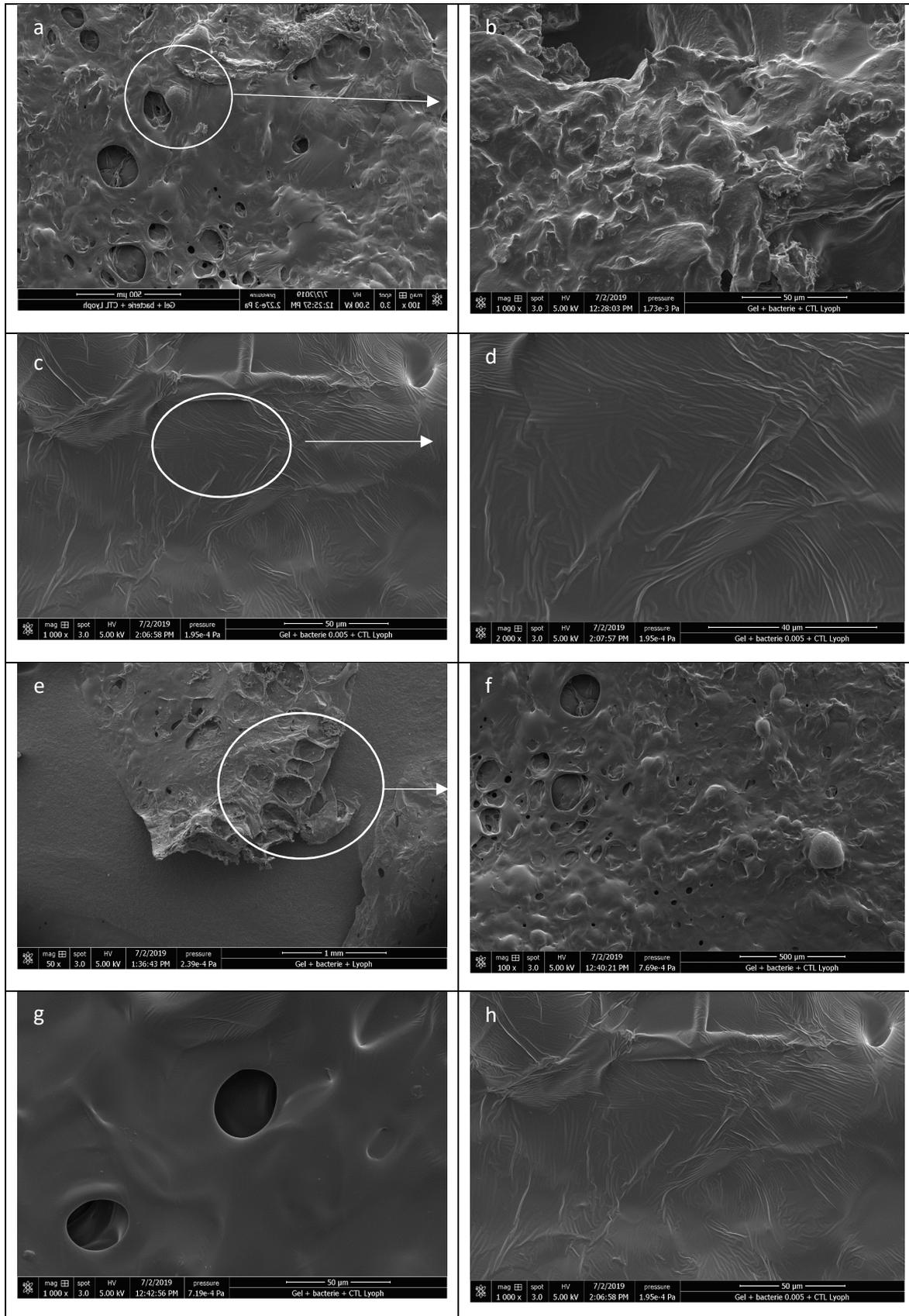


Figure 45 : gel avec D-CTL – vues MEB G X 100 à G X 5000

Les bactéries sont absentes de toute la surface du gel, y compris dans les pores. (a,c,e) : vue à faible grossissement ; (b,c,f) : la même vue à fort grossissement. (g,h) : autres vues à fort grossissement.

V. Tests de biocompatibilité

1. Objectifs

Le but de ces manipulations est de voir si ces gels sont biocompatibles avec les combinaisons « gel + antimicrobien » que nous testons. Les tests sont réalisés *in vitro* dans ce travail.

2. Matériels et Méthodes

Culture cellulaire

Des cellules de fibroblastes humains (HGF-1) (ATCC CRL 2014) sont utilisées. La lignée cellulaire est préalablement mise en culture dans des flasques T-75. Le milieu de culture est du DMEM (Sigma-Aldrich) supplémenté :

- en sérum fœtal de bovin (Fetal Bovin Serum (FBS), Gibco, France) à 10 % (v/v).
- en antibiotique (mélange pénicilline/streptomycine, Gibco, France) à 1% (v/v).

Les cellules sont mises à incuber à 37°C, à 95% d'humidité et 5% de CO₂.

Tests utilisés

1. Test live/dead

Le kit utilisé (Life Technology, France, Thermo Fisher Scientific, France) fait appel à la calcéine AM et l'homodimère-1 éthidium (EthD-1). La calcéine est un polyanion qui traverse la membrane d'une cellule vivante, puis ses groupes ester sont éliminés par les estérases intracellulaires. La molécule est alors fluorescente, et les cellules vivantes émettent un vert intense et uniforme (excitation maximum à 494 nm et émission maximum à 515 nm). L'EthD-1 pénètre dans les cellules dont la membrane est endommagée, car il est normalement imperméable à la membrane plasmique. Il se lie à l'ADN avec une forte affinité et émet une fluorescence dans le rouge (excitation maximum à 528 nm et émission maximum à 617 nm).

Le microscope à épifluorescence utilisé est un Nikon Eclipse TE200 équipé d'un objectif 63x PL APO (1.4 NA), d'un appareil photo numérique Nikon (DS-Q11MC) ; le tout étant piloté par le logiciel NIS-Elements software, Nikon, Japon.

2. Test de viabilité cellulaire Alamar Blue™

La viabilité des cellules sur les hydrogels suit les normes ISO 10993-5. Les fibroblastes humains HGF-1 sont répartis sur les puits d'une plaque 96 puits, à la densité de 1.10^4 cellules par puits, dans 100 μ L de milieu de culture.

A + 24 heures, le milieu est retiré et remplacé par un surnageant qui a été au contact d'un gel pendant 5 heures ou 24 heures, puis l'ensemble est remis à incuber.

A + 3 jours, le surnageant est ensuite retiré, pour mettre à la place 100 μ l d'un milieu contenant 10% de solution Alamar Blue pendant 4 heures à 37°C.

Comme pour les bactéries, les cellules vivantes émettent un signal rouge en fluorescence. Des contrôles positif et négatif sont effectués :

- Contrôle positif : cellules mises à incuber avec un milieu n'ayant pas été mis en contact avec le gel.

- Contrôle négatif : cellules mises en contact d'éthanol 70% pendant 24 heures.

3. Résultats et discussion

Le test Live/dead apporte une information qualitative sur la réaction des fibroblastes humains vis-à-vis du surnageant du gel en montrant la vitalité des cellules en vert (Mateescu et al. 2015). Le signal fluorescent est intense pour chacun des surnageant testés, ce qui est une situation favorable (**figure 46**).

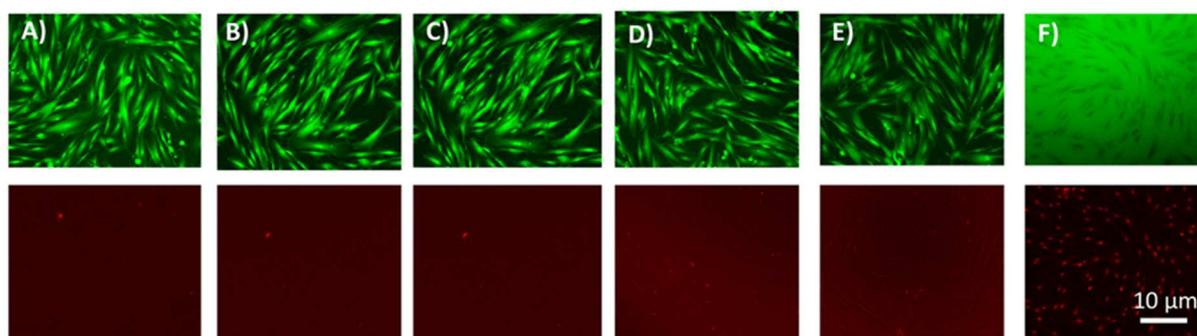


Figure 46 : test live/dead – image de microscopie à fluorescence

Les cellules vivantes émettent un signal vert intense (A à E), et les cellules mortes au contact de l'éthanol un signal rouge (F). Différents gels ont été testés : AC seul (A), AC/L-CTL (B), AC-Plubis SH seul (C), AC-Plubis SH/L-CTL (D). Le surnageant seul au contact des cellules sert de contrôle positif (E), et les cellules au contact d'éthanol sert de contrôle négatif (F).

Le test Alamar Blue donne des informations plutôt quantitatives en comparant le taux de viabilité des cellules en contact avec un milieu, ayant été lui-même en contact ou non avec les gels (**figure 47**). Les résultats sont particulièrement favorables en faveur de fibroblastes, qui sont les principales cellules retrouvées dans l'attache conjonctive qui sert le pilier implantaire.

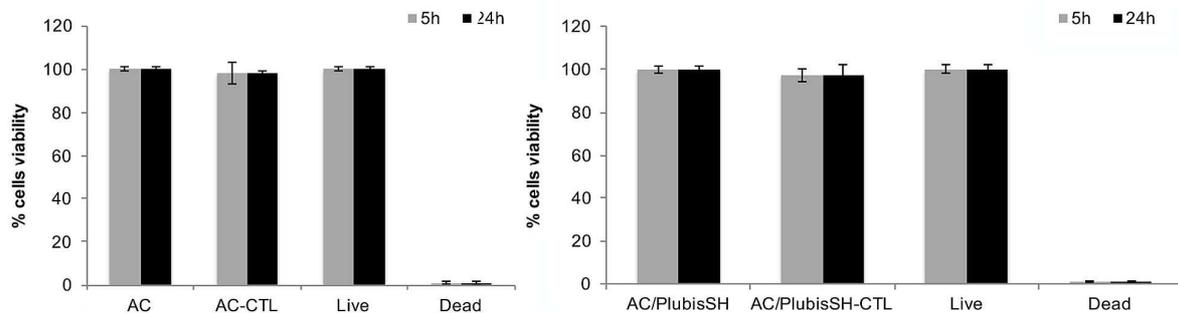


Figure 47 : test Alamar Blue sur des fibroblastes humains au contact de surnageant de gel

Quelle que soit la combinaison de gel (AC ou AC-Plubis SH), avec ou sans CTL, le surnageant ayant été au contact du gel n'est pas toxique pour les cellules.

Ces méthodes indirectes montrent ainsi que les produits de relargage du gel ne sont pas toxiques, notamment le NaIO_4 qui est complètement inclus dans le gel, ou relargué à de très faibles doses. Le gel est stable dans le temps, mais des tests complémentaires de cytotoxicité sur plus long terme vis-à-vis des produits de dégradation pourraient compléter ces résultats.

VI. Introduction au manuscrit 2 (Plos One) et au poster I

Cet article et le poster développent les possibilités d'utiliser l'AC en tant qu'hydrogel antibactérien susceptible d'être injecté dans les connectiques implantaire. L'ensemble des manipulations a été réalisé avec le premier lot d'AC. L'article et le poster reprennent certaines manipulations réalisées dans les **chapitres 2 et 3**. Pour la caractérisation physico-chimique, nous retrouvons les cinétiques de gélification, les premiers tests d'adhésion (dont l'adhésion sur des tissus mous) et le test de relargage du peptide hors du gel. Pour les propriétés biologiques, les tests de cytotoxicité sont effectués sur des fibroblastes humains. Le pouvoir bactéricide des gels est évalué sur *P. gingivalis*, bactérie impliquée dans les maladies péri-implantaires.

RESEARCH ARTICLE

Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection

Mihaela Mateescu^{1,2}, Sébastien Baixe^{1,2}, Tony Garnier³, Loic Jierry³, Vincent Ball^{1,2†}, Youssef Haikel^{1,2‡}, Marie Hélène Metz-Boutigue^{1,2‡}, Michel Nardin^{4‡}, Pierre SchAAF^{1,2,3‡}, Olivier Etienne^{1,2‡*}, Philippe Lavallo^{1,2‡}

1 Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, Unité Mixte de Recherche-S 1121, Biomatériaux et Bioingénierie, Strasbourg, France, **2** Faculté de Chirurgie Dentaire, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **3** Institut Charles Sadron, Centre National de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, **4** Institut de Science des Matériaux de Mulhouse, Centre National de la Recherche Scientifique LRC 7228, Mulhouse, France

† These authors are joint senior authors on this work.

* olivier.etienne@unistra.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Mateescu M, Baixe S, Garnier T, Jierry L, Ball V, Haikel Y, et al. (2015) Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection. PLoS ONE 10(12): e0145143. doi:10.1371/journal.pone.0145143

Editor: Chiahio Shih, Academia Sinica, TAIWAN

Received: September 19, 2015

Accepted: December 1, 2015

Published: December 14, 2015

Copyright: © 2015 Mateescu 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: This work was supported by Projet MICA Dopaglué (<http://www.instituts-carnot.eu>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

Abstract

Implanted medical devices are prone to infection. Designing new strategies to reduce infection and implant rejection are an important challenge for modern medicine. To this end, in the last few years many hydrogels have been designed as matrices for antimicrobial molecules destined to fight frequent infection found in moist environments like the oral cavity. In this study, two types of original hydrogels containing the antimicrobial peptide Cateslytin have been designed. The first hydrogel is based on alginate modified with catechol moieties (AC gel). The choice of these catechol functional groups which derive from mussel's catechol originates from their strong adhesion properties on various surfaces. The second type of gel we tested is a mixture of alginate catechol and thiol-terminated Pluronic (AC/Plu-bisSH), a polymer derived from Pluronic, a well-known biocompatible polymer. This Plu-bisSH polymer has been chosen for its capacity to enhance the cohesion of the composition. These two gels offer new clinical uses, as they can be injected and jellify in a few minutes. Moreover, we show these gels strongly adhere to implant surfaces and gingiva. Once gelled, they demonstrate a high level of rheological properties and stability. In particular, the dissipative energy of the (AC/Plu-bisSH) gel detachment reaches a high value on gingiva (10 J.m⁻²) and on titanium alloys (4 J.m⁻²), conferring a strong mechanical barrier. Moreover, the Cateslytin peptide in hydrogels exhibited potent antimicrobial activities against *P. gingivalis*, where a strong inhibition of bacterial metabolic activity and viability was observed, indicating reduced virulence. Gel biocompatibility tests indicate no signs of toxicity. In conclusion, these new hydrogels could be ideal candidates in the prevention and/or management of periimplant diseases.

Introduction

Biohydrogels have been developed in medicine for a broad scope of therapeutic applications. They are currently used for the release of biomacromolecules or drugs [1], for wound healing, or as a barrier for contact lenses or ocular surface injuries [2, 3]. Some of these gels have an intrinsic antimicrobial activity (like chitosan-based gels [4]), but more often drugs are added in the gel in order to enhance microbial activity [5]. Antibiotics are frequently introduced in the gels for prevention or treatment of infections. The properties of these gels allow release of therapeutic agents [6]. AntiMicrobial Peptides (AMPs) represent one type of antimicrobial agents that can be used to fight infections without the disadvantages of more conventional antibiotics, which may cause gastrointestinal or allergic reactions, or produce antibiotic-resistant bacterial strains. AMPs are natural molecules, which are part of the innate immune response and possess anti-inflammatory, antibacterial, antiviral and even anticancer activities [7, 8]. One such agent is human Cateslytin (CTL), the active sequence of Catestatin (CgA₃₅₂₋₃₇₂) and corresponding to the sequence CgA₃₅₂₋₃₆₆ (RSMRLSFRARGYGFR). Catestatin, is a naturally occurring potent inhibitor (IC₅₀ 200–400 nM) of catecholamine release, acting at the nicotinic cholinergic receptor [9]. This peptide also displays potent vasodepressor activity and appears to diminish early in the course of development of hypertension [10]. CTL is the active core sequence and displays highest nicotinic antagonism of catecholamine secretion [9]. CTL is also able to activate histamine release [11] and displays potent antimicrobial activities in the low micromolar range against bacteria, fungi, yeasts and Plasmodium [12, 13]. Time-lapse video microscopy showed arrest of fungal growth upon penetration of the rhodaminated peptide into a fungal filament [12]. Cateslytin was also identified in the stimulated secretions of human polymorphonuclear neutrophils [12]. All together, these properties show that CTL is a novel component of innate immunity.

In recent years, the efficiency of films functionalized with various AMPs has been tested. In particular, these coatings can be constructed using polyelectrolyte multilayer films [14–16]. Gels combining such molecules are promising solutions for coating a number of medical devices destined for human implantation [17]. A hyaluronic acid-based gel mixed with gentamycin has been assessed in rabbit and mouse models for its ability to limit postoperative infection following total joint arthroplasty [18]. Antibacterial wound gels can be applied to catheters used in peritoneal dialysis to prevent infection [19]. In oral implantology, bacteria are present in dental plaque and along with in the microgap between implant and prosthesis screws on implants. Specific pathogenic bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* (Pg) can secrete virulent factors towards marginal gingiva, leading to periimplantitis. This chronic inflammation is characterized by a gingival inflammation and associated periimplant bone destruction [20]. Local or systemic antibiotic therapies are not able to decontaminate these spaces [21] and may promote resistance and further impair treatment options. Sealing gels have been proposed to limit microleakage along the microgap of the connection, but their bioactivity is mainly based on chlorhexidine whose effects are limited in time, undergoing degradation in oral conditions [22–25].

Recently, catechol-based gels, inspired from the strong adhesive properties of mussel on mineral, metal and wood surfaces, have been developed for medical use [26], and represent compatible biohydrogels ideal for a moist environment like oral cavity. Catechol functional groups can be grafted on chitosan or alginate backbone, to form an alginate-chitosan or an alginate-catechol (AC) gel. Thiol-terminated Pluronic (PlubisSH) have been recently added to chitosan/catechol or hyaluronic acid/catechol polymers in order to enhance mechanical properties [27, 28]. However, these gels were built without any functionalization agent, like antibiotic or AMP.

Hence, we decided to develop a new injectable, adhesive and antimicrobial gel that could be employed on medical titanium surfaces, especially in area between dental implants and prosthesis. Alginate-Catechol/PlubisSH gels functionalized with the antimicrobial peptide CTL have been assessed in this study for their promising properties.

Materials and Methods

Materials

Alginate (medium viscosity), Pluronic F-127, NaIO₄, NaOH, PBS, were purchased from Sigma-Aldrich. CTL was obtained from Proteogenix (France). A 1 cm diameter biomedical Ti₆Al₄V bar was procured from ACNIS International Society (France). The bar was cut in several discs (1 cm diameter/1 cm thick), then polished using silicon carbide papers from ESCIL (France) with a decreasing grain-size (600, 800, 1200, 1600, 2000, 2400, 4000).

Syntheses of AC and PlubisSH

Catechol-modified alginate (AC) and thiol-terminated Pluronic F-127 (PlubisSH) were prepared according to recently reported procedures (S1 Fig) [27, 28]. The degree of catechol substitution for AC was 15% and the degree of thiolation for PlubisSH was 65%.

Hydrogels fabrication

We prepared two types of gels: alginate-catechol 1% (AC) and AC 0.5% / Pluronic bisSH18% (AC/PlubisSH). For the preparation of the first type of gel, we dissolved AC powder in a PBS solution at pH 7.4 at a 1% final concentration. For the preparation of the second gel, we employed two polymer stock solutions (1% AC and 36% PlubisSH) that were mixed at a 1:1 ratio, in order to obtain the final concentration of the composite mixture. Both solutions were freshly prepared before experimentations and were stored at 4°C before use.

To form the gels, AC 1% solution and AC 0.5% / PlubisSH 18% solution have to be mixed with the oxidation solution at a 4:1 ratio. This oxidation solution was freshly prepared by combining sodium periodate (NaIO₄) at 1 mg.mL⁻¹ in PBS with a solution of NaOH (0.4 M in PBS) at a 4:1 ratio. The final mixture with AC/PlubisSH solutions and oxidation solution turned light brown and gelled in 2 minutes at 37°C. The 4:1 ratio was selected because it corresponds to a NaIO₄ concentration known to be non-toxic [29].

Peptides-hydrogels preparation

Hydrogels containing a final concentration of 200 μM of CTL peptides were prepared. 20 μL of peptides stock solution (500 μM) in PBS were added to 80 μL of AC solution or to 80 μL of the AC/PlubisSH mixture solution described above (40 μL of AC and 40 μL of PlubisSH). Then, 28 μL of oxidation solution were introduced and homogenized to initiate the gelation reaction. The resulting hydrogels were incubated at 37°C for 17h in a humidified incubator. For the control gel (gel without CTL), PBS was used to replace peptides.

Sol-gel transition phase diagram. The sol-gel phase transition diagrams for AC/PlubisSH, (with and without oxidation solution) were determined using a vial-tilting method. For this, each solution of hydrogel mixture was prepared in a 2 mL test tube and the temperature was gradually increased with an increment of 1°C. The phase transition temperature was determined once no fluidity was observed after 5 minutes. At each temperature point, samples were equilibrated at least 5 minutes. Mixtures without NaIO₄ /NaOH were used as a control.

Monitoring in vitro hydrogels mass erosion and swelling. *In vitro* hydrogel stability was evaluated by monitoring the mass erosion rate under physiological conditions. 1 mL of each

hydrogel was prepared in test tubes and incubated at 37°C overnight for thermal stabilization. Then, 1 mL of PBS (pH 7.4) was added to the hydrogel and the tube was incubated at 37°C. After defined time intervals, the supernatant was removed and the weights of the remaining solid hydrogels were measured. All samples were triplicated.

Rheological evaluation

Rheological properties of hydrogels were monitored using a rotating rheometer (Thermo Haake RheoWin Rheometer RS-100, Fisher Scientific, France) equipped with a temperature controller. The solid-like behavior (elastic modulus, G') and liquid-like behavior (viscous modulus, G'') were recorded using two 30 mm parallel plates. 5 mL of hydrogel were applied on one plate to form a thickness of 5 mm.

We used a frequency 1 Hz to capture the gelation time for 15 min of experiments. The cross-over point of G' and G'' is then usually considered to be the gelation time [28, 30]. All measurements were replicated 3 times. We also determined the rheological properties of the gels as a function of frequency in the range between 1 Hz and 10 Hz for 1-day-old gels.

Peptides compound release

Peptide release from gels was estimated using rhodamine labeled CTL (Proteogenix, France). The purity of CTL-rhodamine was evaluated using an automatic Edman sequencing apparatus (Applied Biosystems, France). The hydrogels containing a final concentration of 200 μ M CTL-Rhodamine were prepared from 500 μ M CTL-Rhodamine stock solution in water. The protocol was described before in the "Peptides-hydrogels preparation" section. The resulting hydrogels were incubated at 37°C for 17h in a humidified incubator. For the control gels (gels without CTL-Rhodamine) water were used to replace peptides. After incubation, 150 μ L of MH medium were added on the gels. At a given time, 50 μ L of supernatant were transferred on 96-well plates for 570 nm fluorescence (spectrofluorimeter Xenius XC, SAFAS, Monaco). Immediately, another 50 μ L of MH medium were added to the gels to maintain a constant volume of supernatant. This step was repeated for each delay decided for an analysis. The fluorescent peptides released from the gels were quantified for 2 days (37°C, PBS).

Tissue adhesion studies

Tissue adhesion was measured using a force sensor device equipped with a hydrogel holder (MTS Systems, dynamometre, Lhomargy, DY34, France, using the Testworks software). A titanium disc was attached to a cylindrical probe (10 mm diameter) with commercial cyanoacrylate glue. The hydrogel (100 μ L) was placed on this disc. After 5 min, the gel was pressed either by another titanium disc (10 mm diameter) alone, or with a piece of attached gingiva of pig (1 cm^2) glued on a support, for 30 min at 37°C with 0.1 mN of normal force. We collected adhesion data by pulling the probe with a loading rate of 0.3 $\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$. All measurements were performed in triplicate.

Bacterial growth

Prior to each experiment, one bacterial colony of *Porphyromonas gingivalis* (ATCC strain 33277) was inoculated overnight under strict anaerobic conditions at 37°C with 10 mL of Brain Heart Infusion (BHI) medium (Sigma Aldrich), supplemented with hemin (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and menadione (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma Aldrich). The next day, this culture was used to inoculate a second preculture (10% vol. of first preculture). The final bacterial suspension used in our

experiments was a mid-logarithmic phase culture of bacteria with a starting optical density of 0.001 (at 620 nm).

Microbiological tests

Bacterial Viability. The experiment consists in the analysis of the bacterial viability in the supernatant of the gels. The Alamar Blue cell viability reagent was employed as a bacteria health indicator (using the reducing power of living bacteria). When the pathogens are alive with a metabolic activity, they maintain a reducing environment in their cytosol. Resazurin, the active ingredient of Alamar Blue assay, is a nontoxic, bacterial permeable compound that is a blue, weakly fluorescent molecule. Living bacteria are able to reduce this molecule to resorufin, a red color, a highly fluorescent molecule (570 nm). The damaged bacteria are not able to reduce the resazurin. For this test, the gels (with or without CTL) were produced in the 96-well plate as described previously. The amount of gel per well was similar for all conditions (100 μ L). Then, 100 μ L of bacteria suspension (with a OD_{620} equal to 0.001) was added on each well. After incubation, the supernatants were transferred into a 96-well plate. Then, 10 μ L of Alamar Blue reagent was added and incubated 3 hours at 37°C. The fluorescence intensity was then monitored at 570 nm.

Colony formation assay. These assays evaluate the capacity of entrapped CTL to inhibit bacterial growth in the surrounding media of gels. Each gel is placed in a 96-well plate. 100 μ L of bacterial suspension (prepared as described above) is layered on top of each gel. After 5h and 24h of incubation, the supernatant of each type of hydrogel was transferred onto an agar plate. The number of colonies obtained was counted after 24h. The inhibition of colonies number is represented as a percentage of colonies inhibition: (number of colonies formed from the peptides gels supernatant / number of colonies formed from gels control supernatant) x 100.

Cytocompatibility tests

Cell culture. A human line of gingival fibroblasts HGF-1 (ATCC CRL 2014) was used in this study. The cell line was cultured on T-75 culture flasks using culture media supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco, France) and 1% (v/v) antibiotics containing penicillin-streptomycin (Gibco). The cells were incubated at 37°C, 95% relative humidity, and 5% CO_2 .

Leachable Assay. The viability of cells on hydrogels was evaluated according to ISO 10993-5 norm. HGF fibroblasts were seeded into each well of a 96-well plate at a density of 1.10^4 cells/well. After 24h, the medium was replaced with the gel supernatant (100 μ L), and then incubated for 3 days. After the incubation period, the extract was replaced with 100 μ L of fresh medium containing 10% of Alamar Blue solution. Living cells reduce Alamar Blue reagent in a red color (570 nm). Cells incubated with pure medium (absence supernatant coming from gels) was used as a positive control (live) and cells exposed to a 70% ethanol solution were used as a negative control (dead).

Live/Dead observations. The Live Dead Kit (Life Technology, France) is based on a combination of two molecules: the calcein AM and the ethidium homodimer-1 (EthD-1). The polyanionic dye calcein AM labels living cells with an intense uniform green fluorescence. EthD-1, which enters into cells having damaged membranes, provides a bright red fluorescence. Stained cells were observed under epifluorescence microscope illumination (Nikon Eclipse TE200 with 63x PL APO (1.4 NA) objective equipped with Nikon Digital Camera (DS-Q11MC) and with NIS-Elements software, Nikon, Japan).

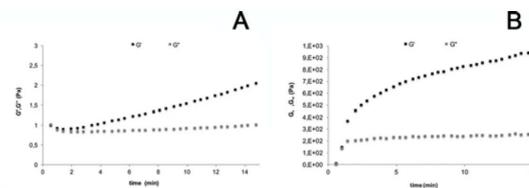


Fig 1. Gelation kinetics of the AC and AC/PlubisSH gels. Rheological properties of AC (A) and AC/PlubisSH (B) hydrogels recorded at a frequency of 1 Hz at a temperature of 37°C (elastic modulus, G' and viscous modulus, G'').

doi:10.1371/journal.pone.0145143.g001

Results

Hydrogel formation

We first investigated the influence of NaIO_4 on the gel formation of AC/PlubisSH (S2 Fig). The AC concentration was fixed at 0.5 (w/v) and the PlubisSH concentration was varied. To form a gel at 37°C, a PlubisSH concentration of at least 16% (w/v) is required both in the presence and absence of NaIO_4 . In the absence of NaIO_4 , no gel is formed below this 16% PlubisSH concentration whatever the temperature, whereas in the presence of NaIO_4 , a gel is observed but only at higher temperatures. This is due to the cross-linking actions of NaIO_4 , in both the chemical reaction and physical gelling. In the subsequent work, we will always use a PlubisSH concentration of 16% (w/v).

To determine more precisely the gelation time, we performed dynamic rheological measurements where we determined the storage and loss moduli G' and G'' (Fig 1).

Taking the equality of G' and G'' as gelation marker we found that AC (1% w/v) and AC/PlubisSH, both supplemented with an oxidation solution, form a gel within the first 2 minutes. As expected, the AC/PlubisSH appeared much more rigid than the AC gel (1000 Pa for AC/PlubisSH compared to 2 Pa for AC for G' at 1 Hz).

Hydrogel swelling

S3 Fig shows swelling and mass erosion behaviors of the hydrogels in PBS solution, at 37°C and at pH 7.4. AC and AC/PlubisSH hydrogels crosslinked with the $\text{NaIO}_4/\text{NaOH}$ are non-degradable for at least 28 days. A weak mass increase was observed for these two gels over 15 days which can be attributed to swelling. In contrast, in the absence of NaIO_4 , the AC/PlubisSH gels started to erode after 12 days. This result shows that the presence of an oxidizing solution is needed to stabilize the gels over a long period of time, as required for clinical applications.

Adhesion properties

We assessed two interfaces in contact with each side of the gel: titanium/titanium (that represents implant-abutment connection), and titanium/connective tissue (that represents abutment or implant junction to gingival soft tissues). $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$, commonly used for the fabrication of dental implants, was used in this study. Pig's attached gingiva was used to evaluate gel adhesion. As shown in Fig 2, the dissipative energy produced for AC/PlubisSH substrate during detachment is significantly higher than for AC gel, especially for Ti/gingiva interfaces ($4 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$ compared to $10 \text{ J}\cdot\text{m}^{-2}$).

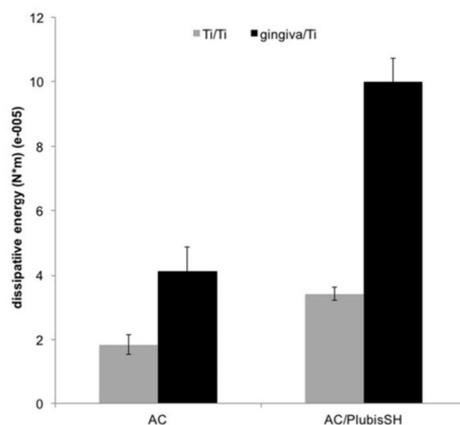


Fig 2. In vitro quantitative adhesion of hydrogels on titanium (Ti) and gingiva. Dissipative energy during detachment of AC and AC/PlubisSH hydrogels from gingiva is measured after 30 min of contact with the substrates (Ti/Ti or Ti/gingiva) at 37°C.

doi:10.1371/journal.pone.0145143.g002

Peptides released from the gels

To follow the release of the CTL, the gels were charged with 200 μ M fluorescent CTL-Rhodamine. The delivery of this molecule was monitored for 48h (Fig 3).

The results show that the release takes place at least over 48 hours and that it is greater with the AC/plubisSH gel compared to the AC one. The quantity released after 48 hours for the AC or AC/plubisSH gel is about 15 μ M and 20 μ M respectively. Thus, about 1/10 of peptides initially loaded into the gels were released after 48 hours. Moreover, we demonstrated in S3 Fig that these two gels are stable over at least 28 days which indicates that some CTL can be probably released during several weeks.

Antibacterial activity

Bacteria metabolic activity. The metabolic activity of *P. gingivalis* was determined after 24 h of incubation by using the Alamar Blue assay. Fig 4A shows that the reducing power of *P. gingivalis* cytosol appears to be affected by the peptides released in the supernatant. The bacteria are unable to transform the resazurin in resorufin, indicating that they lost most of their mitochondrial activity.

Colonies forming. We assessed the capacity of formation of bacterial colonies by displaying the 5h and 24h gel supernatants on the appropriate agar plates. After 24 h of incubation, the number of colonies was counted. 55% inhibition of colonies formation with AC-CTL and 60% inhibition with AC/PlubisSH-CTL for supernatants incubated for 5 hours are observed in comparison with controls corresponding to similar gels without CTL. For a contact time of 24h, there is a 100% inhibition of colonies formation with AC or AC/PlubisSH gels containing CTL. In contrast, *P. gingivalis* present in the supernatant of control gels without CTL are still able to form colonies (Fig 4B and 4C).

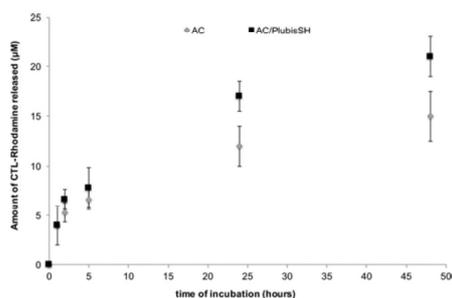


Fig 3. Monitoring of CTL released from the gels. Fluorescence spectrophotometry was used to monitor CTL-Rhodamine released out of AC and AC/PlusisSH gels over time (MH medium, 37°C).

doi:10.1371/journal.pone.0145143.g003

Cellular biocompatibility

The 5h and 24h supernatant solutions (with or without CTL) were kept in contact with the human gingival fibroblasts (HGF) during 3 days. Cell viability was first quantified using the Alamar Blue assay. The results show that the supernatants of the two types of gels (with or

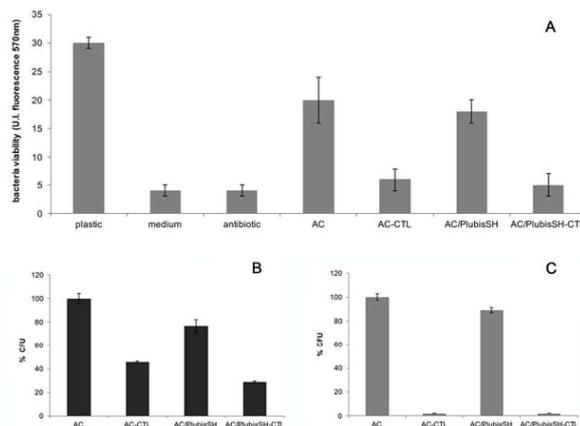


Fig 4. Antibacterial activity of gels. Metabolic activity of bacterial supernatant after 24h (A). « Plastic » corresponds to a negative control, *i.e.* bacteria in medium on the 96-well plate, without any gel. « Medium » corresponds to culture media in the 96-well plate without any bacteria or gel. « Antibiotic » corresponds to the positive control with bacteria in medium with two standard antibiotics (tetracyclin and cefotaxim) as supplements. The asterisk (*) denotes a statistical difference between the metabolic activity of *P. gingivalis* found in the supernatants of AC and AC-CTL gels, (#) indicates a statistical difference between the metabolic activity of *P. gingivalis* found in the supernatant of AC/PlusisSH and AC/PlusisSH-CTL ($p < 0.05$). Inhibition of colonies forming units (CFU) of the supernatants after 24h of seeding (B and C). These supernatants were previously removed from the gels respectively after 5h (B) and 24h (C) of seeding. The control used in these figures (corresponding to 100% CFU) corresponds to colonies on agar plates obtained from supernatant of AC gel without CTL (Tissue Culture Polystyrene was not used as control because it leads to a homogenous growth of bacteria without colonies). Error bars represent means \pm SD.

doi:10.1371/journal.pone.0145143.g004

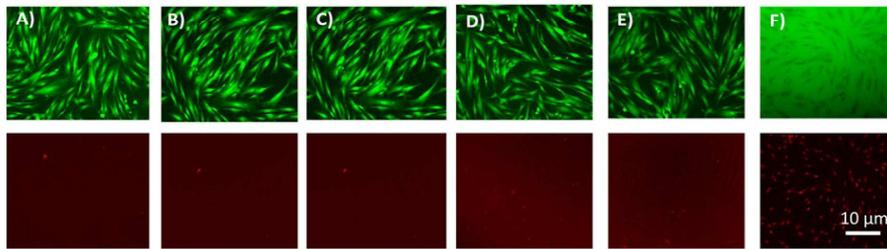


Fig 5. Evaluation of cellular biocompatibility of the gels. (A-F) The LIVE-DEAD observations of cells after 3 days of contact with the 24h gel extract solutions of gels, respectively with AC, AC-CTL, AC/PlubisSH-CTL, ACPlubisSH compared with positive and negative controls. Top pictures in green represent living cells. Images in the bottom row in red represent dead cells.

doi:10.1371/journal.pone.0145143.g005

without antimicrobial peptides) are not toxic for the human gingival fibroblasts. Their viability (100%) is similar to positive control (cells in the presence of culture media) (S4 Fig).

Then, in a second series of experiments to perform a Live Dead assay, the 24h supernatant solutions of the gels (with or without CTL) were introduced in 96-well plates containing HGF. After 3 days of contact, the cells were stained with Live Dead kit and observed under a fluorescence microscope (Fig 5).

The non-fluorescent calcein is enzymatically transformed in an intensely green fluorescent calcein for the cells that were in contact with the gels extracts, and also for the cells in the positive control experiment, where cells were only in contact with culture medium. As negative controls we brought cells in contact with an ethanol solution. In this case all cells label red. This indicates that the viability of the fibroblasts is not affected by the presence of gel extracts.

Discussion

The adhesion of mussels in water uses proteins rich in DOPA (3,4-dihydroxy-L-phenylalanine), an amino acid bearing a catechol group. In this project, we used a natural polysaccharide, sodium alginate, modified by catechol groups along the polymer chains. All the gel-forming components are liquid and can easily be injected with a mixing-syringe on the required sites. After mixing, gelation takes place rapidly (within two minutes) in the presence of oxidative reagent (NaIO_4). Subsequently, the gels can easily be delivered in a preventive way during abutment and implant connection, or later on surfaces of implant and tissues contaminated with periimplantitis bacteria. This catechol-modified alginate (AC) has already been proposed for use in medical applications like treatment of atherosclerotic plaques and has been demonstrated for its efficiency and absence of pro-inflammatory response [29]. In order to improve the mechanical robustness of the gel, we also incorporated pluronic F127 functionalized at both ends with thiol groups (S1 Fig). Pluronic is a commercially available triblock copolymers often used for medical applications related to physical hydrogel formation at 37°C and at physiological pH [31, 32]. After addition of NaIO_4 the catechol groups strongly interact with the thiol groups to form covalent bonds leading to a covalent network between alginate and pluronics. This is confirmed by demonstrating stability of the gels over more than 21 days at 37°C and increased mechanical storage modulus G' . Moreover, it appears that the addition of pluronics increases the dissipative energy of detachment of the gel from titanium alloys and even more from gingiva as it is required for dental applications. This effect originates most probably

from formation of covalent bonds between catechol moieties from gel with amines, thiols, imidazoles residues found in the extracellular matrix proteins and carbohydrates of gingiva.

For the first time, we introduced the antimicrobial peptide CTL into the gels (AC and AC/PlubisSH) with the aim to inhibit *P. gingivalis*, the most virulent pathogen of periimplantitis diseases. The CTL antimicrobial peptide was chosen because it is known to be active against a large variety of pathogens, in particular *S. aureus* and because it has non-hemolytic properties [12]. In this study, we showed that it also has activity against *P. gingivalis* when released from the gels. More precisely, the antibacterial activity of CTL-based hydrogels was evaluated after incubation with *P. gingivalis*. The supernatants of the gels with and without CTL contained a similar number of bacteria after 24h (S5 Fig). However, the metabolic activity of the pathogens in contact with the supernatants of the CTL containing gels was strongly reduced (Fig 4A). This result is in accordance with the incapacity of bacteria found in the CTL-gels supernatant to form colonies on agar plates. During these experiments, AC-CTL and AC/PlubisSH-CTL gels exhibited the same antibacterial properties against *P. gingivalis*.

Our antibacterial tests clearly demonstrate that CTL has a bacteriostatic effect on *P. gingivalis*. We hypothesize that the positively charged CTL peptides released from the gels adsorb at the surface of bacteria and block the negatively charged *P. gingivalis* membrane adhesins. It is known also that the adhesins help bacteria in obtaining essential nutrients for growth and survival [33]. In a previous paper by using Surface Plasmon Resonance Spectroscopy it was demonstrated that human beta-defensin 3 binds to hemagglutinin B, a non fimbrial adhesin from *Porphyromonas gingivalis* ($K_a = 1.80 \times 10^4$) and attenuates a pro-inflammatory cytokine response [34]. The authors report that the binding of human beta-defensin 3 to hemagglutinin B may be related to its high cationic charge. In this context, we suppose that cateslytin with its net positive charge of +5 might also interact with hemagglutinin B.

In our case, blocking the *P. gingivalis* adhesins (fimbrii or pilli) shows indirectly an inhibition of mitochondrial enzymatic activity that will block bacteria division [34]. Thus, we suggest that the mechanism used by the CTL to inhibit the metabolism of *P. gingivalis* is based on the « charged lipid clustering model », one of the AMP's mechanism proposed by Nguyen et al. [35]. In this model, AMP interacts with the lipid membrane to achieve an antimicrobial activity but without disruption of the membrane.

The biocompatibility of the gels was estimated with human gingival fibroblasts in the presence of gels supernatant. All gels demonstrate excellent fibroblast proliferation after 3 days of incubation, indicating no obvious signs of toxicity.

Conclusion

Injection of the AC or AC/PlubisSH gels between implant and abutment or other medical device would act as a physical preventive barrier, limiting the development of bacteria. Moreover, introduction of CTL in these gels inhibits *P. gingivalis* development in the surrounding living environment, controlling virulence factor seeding. The presence of PlubisSH in the gel enhances mechanical and adhesive properties, making these gels an ideal candidate to manage peri-implant sites in a preventive way. Further investigations will explore other applications of these gels and their utility in patient treatments.

Supporting Information

S1 Fig. Chemical structure of the catechol-modified Alginate (A) and the thiolated Pluronic F-127 (B).
(TIF)

S2 Fig. Sol-gel transition curve of the gels. Curve without gelling solution (A); and in presence of oxidation solution (B).

(TIF)

S3 Fig. Mass erosion of hydrogels. Assay conducted in PBS, at 37°C, monitored for 1 month.

(TIF)

S4 Fig. Viability of the human gingival fibroblasts in presence of the 5h and 24h supernatant gels solutions. (A) Percentage of cells viability for AC and AC-CTL gels; (B) Percentage of cells viability for AC/PlubisSH and AC/PlubisSH-CTL gels.

(TIF)

S5 Fig. Evaluation of total number of bacteria found in the supernatant (OD 620 nm). Bacterial supernatant is in contact with gel for 24h.

(TIF)

Acknowledgments

We wish to thank Dr. Karen Niederreither for critical reading of the manuscript, K. Benmlih and C. Bouthier for their support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM SB MN PS PL OE. Performed the experiments: MM SB MN. Analyzed the data: MM SB VB YH MHMB MN PS PL OE. Contributed reagents/materials/analysis tools: TG LJ MHMB. Wrote the paper: MM SB LJ PS PL OE.

References

1. Brandl F, Kastner F, Gschwind RM, Blunk T, Tessmar J, Gopferich A. Hydrogel-based drug delivery systems: comparison of drug diffusivity and release kinetics. *J Control Release*. 2010; 142(2):221–8. Epub 2009/11/06. doi: [10.1016/j.jconrel.2009.10.030](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.030) PMID: [19887092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19887092/).
2. Chae JJ, Mulreany DG, Guo Q, Lu Q, Choi JS, Strehin I, et al. Application of a collagen-based membrane and chondroitin sulfate-based hydrogel adhesive for the potential repair of severe ocular surface injuries. *Mil Med*. 2014; 179(6):686–94. Epub 2014/06/06. doi: [10.7205/milmed-d-13-00360](https://doi.org/10.7205/milmed-d-13-00360) PMID: [24902138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24902138/).
3. Gupta H, Aqil M, Khar RK, Ali A, Bhatnagar A, Mittal G. An alternative in situ gel-formulation of levofloxacin eye drops for prolong ocular retention. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015; 7(1):9–14. Epub 2015/02/25. doi: [10.4103/0975-7406.149810](https://doi.org/10.4103/0975-7406.149810) PMID: [25709330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25709330/); PubMed Central PMCID: [PMC4333635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4333635/).
4. Ding F, Nie Z, Deng H, Xiao L, Du Y, Shi X. Antibacterial hydrogel coating by electrophoretic co-deposition of chitosan/alkynyl chitosan. *Carbohydr Polym*. 2013; 98(2):1547–52. Epub 2013/09/24. doi: [10.1016/j.carbpol.2013.07.042](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.07.042) PMID: [24053838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24053838/).
5. Risbud MV, Hardikar AA, Bhat SV, Bhonde RR. pH-sensitive freeze-dried chitosan–polyvinyl pyrrolidone hydrogels as controlled release system for antibiotic delivery. *J Control Release*. 2000; 68(1):23–30. PMID: [10884576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10884576/)
6. Radin S, Ducheyne P, Kamplain T, Tan BH. Silica sol-gel for the controlled release of antibiotics. I. Synthesis, characterization, and in vitro release. *Journal of biomedical materials research*. 2001; 57(2):313–20. Epub 2001/08/03. PMID: [11484196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11484196/).
7. Wang G. Human antimicrobial peptides and proteins. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014; 7(5):545–94. Epub 2014/05/16. doi: [10.3390/ph7050545](https://doi.org/10.3390/ph7050545) PMID: [24828484](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24828484/); PubMed Central PMCID: [PMC4035769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4035769/).
8. Wang G, Mishra B, Lau K, Lushnikova T, Golla R, Wang X. Antimicrobial peptides in 2014. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015; 8(1):123–50. Epub 2015/03/26. doi: [10.3390/ph8010123](https://doi.org/10.3390/ph8010123) PMID: [25806720](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25806720/); PubMed Central PMCID: [PMC4381204](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4381204/).
9. Mahata SK, Mahata M, Wakade AR, O'Connor DT. Primary structure and function of the catecholamine release inhibitory peptide catestatin (chromogranin A(344–364)): Identification of amino acid residues

- crucial for activity. *Mol Endocrinol*. 2000; 14(10):1525–35. Epub 2000/10/24. doi: [10.1210/mend.14.10.0531](https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0531) PMID: [11043569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11043569/).
10. O'Connor DT, Kailasam MT, Kennedy BP, Ziegler MG, Yanaihara N, Parmer RJ. Early decline in the catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in humans at genetic risk of hypertension. *J Hypertens*. 2002; 20(7):1335–45. Epub 2002/07/20. PMID: [12131530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12131530/).
 11. Kennedy BP, Mahata SK, O'Connor DT, Ziegler MG. Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin A fragment catestatin in vivo. *Peptides*. 1998; 19(7):1241–8. Epub 1998/10/24. PMID: [9786174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9786174/).
 12. Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, Chasserot-Golaz S, et al. New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2005; 62(3):377–85. Epub 2005/02/22. doi: [10.1007/s00018-004-4461-9](https://doi.org/10.1007/s00018-004-4461-9) PMID: [15723172](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15723172/).
 13. Akaddar A, Doderer-Lang C, Marzahn MR, Delalande F, Mousli M, Helle K, et al. Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2010; 67(6):1005–15. Epub 2010/01/01. doi: [10.1007/s00018-009-0235-8](https://doi.org/10.1007/s00018-009-0235-8) PMID: [20043183](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20043183/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc2827800](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2827800/).
 14. Cado G, Kerjoudj H, Chassepot A, Lefort M, Benmlih K, Hemmerle J, et al. Polysaccharide films built by simultaneous or alternate spray: a rapid way to engineer biomaterial surfaces. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2012; 28(22):8470–8. Epub 2012/05/05. doi: [10.1021/la300563s](https://doi.org/10.1021/la300563s) PMID: [22554108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22554108/).
 15. Etienne O, Picart C, Taddei C, Keller P, Hubsch E, Schaaf P, et al. Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study. *J Dent Res*. 2006; 85(1):44–8. Epub 2005/12/24. PMID: [16373679](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16373679/).
 16. Gilnel K, Thebault P, Humblot V, Pradier CM, Jouenne T. Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomater*. 2012; 8(5):1670–84. Epub 2012/02/01. doi: [10.1016/j.actbio.2012.01.011](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.011) PMID: [22289644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22289644/).
 17. Ben-Nissan B, Choi AH. Sol-gel production of bioactive nanocoatings for medical applications. Part 1: an introduction. *Nanomedicine (London, England)*. 2006; 1(3):311–9. Epub 2007/08/25. doi: [10.2217/17435889.1.3.311](https://doi.org/10.2217/17435889.1.3.311) PMID: [17716161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17716161/).
 18. Matsuno H, Yudoh K, Hashimoto M, Himeda Y, Miyoshi T, Yoshida K, et al. A new antibacterial carrier of hyaluronic acid gel. *J Orthop Sci*. 2006; 11(5):497–504. Epub 2006/10/03. doi: [10.1007/s00776-006-1059-0](https://doi.org/10.1007/s00776-006-1059-0) PMID: [17013739](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17013739/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc2778615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC/PMC2778615/).
 19. Johnson DW, Clark C, Isabel NM, Hawley CM, Beller E, Cass A, et al. The honeypot study protocol: a randomized controlled trial of exit-site application of medihoney antibacterial wound gel for the prevention of catheter-associated infections in peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int*. 2009; 29(3):303–9. Epub 2009/05/22. PMID: [19458303](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19458303/).
 20. Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *Journal of clinical periodontology*. 2008; 35(8 Suppl):286–91. Epub 2008/09/09. doi: [10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01274.x) PMID: [18724856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18724856/).
 21. van Winkelhoff AJ. Antibiotics in the treatment of peri-implantitis. *European journal of oral implantology*. 2012; 5 Suppl:S43–50. Epub 2012/07/28. PMID: [22834393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22834393/).
 22. D'Ercole S, Tete S, Catamo G, Sammartino G, Femminella B, Tripodi D, et al. Microbiological and biochemical effectiveness of an antiseptic gel on the bacterial contamination of the inner space of dental implants: a 3-month human longitudinal study. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 2009; 22(4):1019–26. Epub 2010/01/16. PMID: [20074465](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20074465/).
 23. Besimo CE, Guindy JS, Lewetag D, Meyer J. Prevention of bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained crowns on implants in vitro. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999; 14(5):654–60. Epub 1999/10/26. PMID: [10531737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10531737/).
 24. Nayak AG, Fernandes A, Kulkarni R, Ajantha GS, Lekha K, Nadiger R. Efficacy of antibacterial sealing gel and O-ring to prevent microleakage at the implant abutment interface: an in vitro study. *The Journal of oral implantology*. 2014; 40(1):11–4. Epub 2011/05/18. doi: [10.1563/aaid-joi-d-10-00167](https://doi.org/10.1563/aaid-joi-d-10-00167) PMID: [21574837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21574837/).
 25. Paolantonio M, Perinetti G, D'Ercole S, Graziani F, Catamo G, Sammartino G, et al. Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel. *Journal of periodontology*. 2008; 79(8):1419–25. Epub 2008/08/05. doi: [10.1902/jop.2008.070660](https://doi.org/10.1902/jop.2008.070660) PMID: [18672991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18672991/).
 26. Xu J, Soliman GM, Barralet J, Cerruti M. Mollusk glue inspired mucoadhesives for biomedical applications. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. 2012; 28(39):14010–7. Epub 2012/09/07. doi: [10.1021/la3025414](https://doi.org/10.1021/la3025414) PMID: [22950962](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22950962/).

27. Lee C, Shin J, Lee JS, Byun E, Ryu JH, Um SH, et al. Bioinspired, calcium-free alginate hydrogels with tunable physical and mechanical properties and improved biocompatibility. *Biomacromolecules*. 2013; 14(6):2004–13. Epub 2013/05/04. doi: [10.1021/bm400352d](https://doi.org/10.1021/bm400352d) PMID: [23639096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23639096/).
28. Ryu JH, Lee Y, Kong WH, Kim TG, Park TG, Lee H. Catechol-functionalized chitosan/pluronic hydrogels for tissue adhesives and hemostatic materials. *Biomacromolecules*. 2011; 12(7):2653–9. Epub 2011/05/24. doi: [10.1021/bm200464x](https://doi.org/10.1021/bm200464x) PMID: [21599012](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21599012/).
29. Kastrop CJ, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Lee H, Kambhampati S, Lee T, et al. Painting blood vessels and atherosclerotic plaques with an adhesive drug depot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109(52):21444–9. Epub 2012/12/14. doi: [10.1073/pnas.1217972110](https://doi.org/10.1073/pnas.1217972110) PMID: [23236189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23236189/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc3535589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3535589/).
30. Lee Y, Chung HJ, Yeo S, Ahn C-H, Lee H, Messersmith PB, et al. Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol–gel transition hyaluronic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspired catechol-thiol reaction. *Soft Matter*. 2010; 6(5):977–83.
31. Lin HR, Sung KC, Vong WJ. In situ gelling of alginate/pluronic solutions for ophthalmic delivery of pilocarpine. *Biomacromolecules*. 2004; 5(6):2358–65. Epub 2004/11/09. doi: [10.1021/bm0496965](https://doi.org/10.1021/bm0496965) PMID: [15530052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15530052/).
32. Abdullah AI N, Lee H, Lee YS, Lee KD, Park SY. Development of disulfide core-crosslinked pluronic nanoparticles as an effective anticancer-drug-delivery system. *Macromolecular bioscience*. 2011; 11(9):1264–71. Epub 2011/07/01. doi: [10.1002/mabi.201100083](https://doi.org/10.1002/mabi.201100083) PMID: [21717576](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21717576/).
33. Bahar AA, Ren D. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013; 6(12):1543–75. Epub 2013/11/30. doi: [10.3390/ph6121543](https://doi.org/10.3390/ph6121543) PMID: [24287494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24287494/); PubMed Central PMCID: [PMCPmc3873676](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3873676/).
34. Pingel LC, Kohlgraf KG, Hansen CJ, Eastman CG, Dietrich DE, Burnell KK, et al. Human beta-defensin 3 binds to hemagglutinin B (rHagB), a non-fimbrial adhesin from *Porphyromonas gingivalis*, and attenuates a pro-inflammatory cytokine response. *Immunol Cell Biol*. 2008; 86(8):643–9. Epub 2008/08/20. doi: [10.1038/icb.2008.56](https://doi.org/10.1038/icb.2008.56) PMID: [18711400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18711400/).
35. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol*. 2011; 29(9):464–72. Epub 2011/06/18. doi: [10.1016/j.tibtech.2011.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.05.001) PMID: [21680034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21680034/).

Poster I



INSERM
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

Développement d'un gel antibactérien injectable pour la prévention des péri-implantites



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



INSTITUT Charles SADRON
CHIMIE - UE5 - STRASBOURG



S. Baixe^{1,2}, M. Mateescu^{1,2}, T. Garnier³, L. Jierry³, V. Ball^{1,2}, Y. Haikel^{1,2}, M. H. Metz-Boutigue^{1,2}, Michel Nardin⁴, P. Schaafl^{2,3}, P. Lavalie^{1,2}, O. Etienne^{1,2}

1. Faculté d'Odontologie – STRASBOURG
2. INSERM UMR 1121 – biomatériaux et Biogénéralie – STRASBOURG
3. Institut Charles Sadron – CNRS – STRASBOURG
4. Institut de Science des Matériaux – CNRS – IRC 7228, MULHOUSE

INTRODUCTION

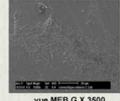
Les hydrogels sont fréquemment combinés à des molécules antimicrobiennes pour des applications thérapeutiques et pour être p sur les dispositifs médicaux sujets à des infections.

Les hydrogels à base d'alginate modifié par des fonctions catéchols, ou **Alginate-Catéchol (AC)**, ont été développés pour une utilisation en environnement humide.

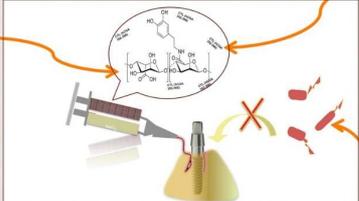
Les fonctions **Catéchol** sont inspirées de la moule marine, dont le pied peut adhérer fortement sur son rocher. Le **Pluronic bis-SH (Plu-bis SH)** est un polymère biocompatible, possédant une fonction thiol. Il améliore la cohésion de l'Alginate Catéchol.



Moule marine



vue MEB G X 3500
Colonisation bactérienne (E. Coli) entre le pilier et l'implant. Evaluation in vitro.



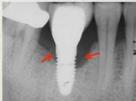
Le but de notre étude est de développer un nouveau gel antibactérien chargé en peptide antimicrobien pour la prévention des péri-implantites.

Les **Peptides Anti-Microbiens (PAM)** sont utilisés pour leur activité anti-inflammatoire et antimicrobienne, sans les inconvénients des antibiotiques.

La **Cateslytine Humaine (CTL)** est un PAM qui présente une activité contre *Porphyromonas gingivalis*, une des bactéries impliquée dans les périimplantites.

Les bactéries de la plaque dentaire colonisent le *microgap* entre le pilier et l'implant. Ce réservoir est impliqué dans les périimplantites.

Des gels destinés à être appliqués entre les pièces implantaire ont été déjà proposés, mais leur action est limitée dans le temps.



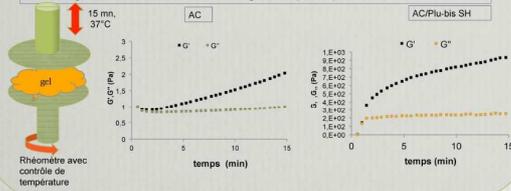
Péri-implantite
Perte osseuse marginale autour de l'implant quelques années après sa mise en place

PROPRIÉTÉS PHYSICO CHIMIQUES

PROPRIÉTÉS RHÉOLOGIQUES

Le gel se forme en 2 mn, et le Plu-bis SH rend le gel plus rigide que l'AC seul.

La cinétique de gélation est évaluée pour les gels AC et AC/Plu-bis SH. Le comportement solide (module élastique G') et liquide (module de viscosité G'') sont enregistrés avec et sans solution de gélation (NaIO4).



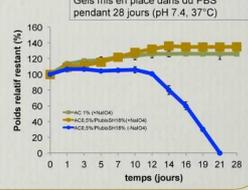
Rhéomètre avec contrôle de température

GONFLEMENT DES GELS

Les gels sont stables en environnement aqueux.

Le gel restant est pesé à différents moments. Un léger gonflement des gels survient au cours des 12 premiers jours.

La présence de NaIO4 s'avère indispensable à la stabilité des gels et évite leur érosion au delà de cette période.

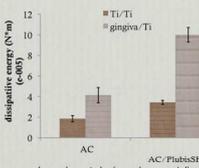


Gels mis en place dans du PBS pendant 28 jours (pH 7.4, 37°C)

PROPRIÉTÉS ADHÉSIVES

Les gels sont capables d'adhérer sur différentes surfaces. La structure de la surface a une influence sur l'adhésion.

2 interfaces sont évaluées: gel/titane et gel/ tissu conjonctif (issu de gencive de porc). L'énergie nécessaire pour décoller le gel est plus importante avec AC/Plu-bis SH, surtout entre le titane et la gencive.

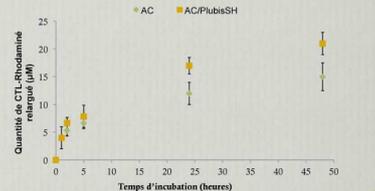


Les gels sont placés sur le support d'un appareil à capteur de force

RELARGAGE DES PEPTIDES

Les peptides sont principalement relargués dans les premières 48h.

Le relargage de CTL rhodaminé en dehors des gels AC et AC/Plu-bis SH est évalué à l'aide une technique de spectrophotométrie (SAFAS). Ce relargage est plus important pour l'AC/Plu-bis SH.

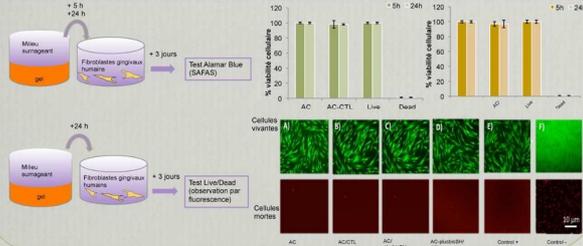


PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES

BIOCOMPATIBILITÉ CELLULAIRE

Les gels avec et sans PAM présentent une excellente biocompatibilité vis à vis des fibroblastes.

Un milieu de croissance cellulaire est versé sur des gels, puis mis au contact de fibroblastes humains. 2 techniques permettent d'évaluer ensuite leur viabilité cellulaire (tests Bleu Alamar et Live/Dead).



5h, 24h

Milieu nutritif, Fibroblastes gingivaux humains, Test Alamar Blue (SAFAS)

5h, 24h

% viabilité cellulaire

AC, AC-CTL, Live, Dead

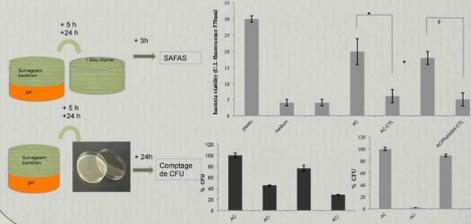
Cellules vivantes, Cellules mortes

AC, AC-CTL, AC pluronic, Anticollagène CTL, Colène +, Colène -

EFFICACITÉ ANTIBACTERIENNE

Les gels ont une activité bactériostatique sur *P.gingivalis*.

Des milieux contaminés par *P.gingivalis* sont versés au dessus de chaque gel, puis évalués à travers 2 techniques (Bleu Alamar et comptage de CFU). Les gels contenant les PAM diminuent le développement et la prolifération bactérienne (effet bactériostatique).



5h, 24h, 3h

Comptage de CTL rhodaminé (SAFAS)

5h, 24h

Comptage de CFU

SAFAS, CFU

CONCLUSION

Les gels AC et AC/Plu-bisSH agissent en tant que barrière physique, et le pluronic bis SH améliore les propriétés mécaniques et adhésives du gel. L'introduction de CTL dans ces gels inhibe le développement de *P.gingivalis* dans l'environnement vivant du gel, participant ainsi au contrôle des facteurs de virulence bactériens. Ces gels hautement biocompatibles sont donc des candidats idéaux pour être injectés entre le pilier et l'implant dentaire de façon préventive. D'autres investigations exploreront les applications de ce gel à travers des test *in vivo*.

REFERENCES

Mateescu et al. Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implants-Device Infection. PLoS One. 2015 Dec 14;10(12):e0145143.
Baixe S et al. Microbial contamination of the implant-abutment connections: Review of the literature. Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale. 2016 Feb;117(1):20-5.

Partie IV :

**Tests d'étanchéité des connectiques
sur boîtes**

I. Introduction

La prothèse supra-implantaire de type vissée est généralement constituée d'une base en titane (Ti-base) sur laquelle est associée une couronne en céramique (zircone ou disilicate de lithium). L'avantage de ces systèmes transvissés est leur simplicité de mise en œuvre clinique lorsque les axes d'insertion sont respectés. Le titane n'endommage pas la connectique, et la colle assemble de façon durable le Ti-base à la couronne. En revanche, le puits de vissage sortant sur la face occlusale de la dent constitue une voie de passage bactérien supplémentaire (**figure 48**).

L'obturation de ce puits doit alors respecter une procédure stricte qui assure un maximum d'étanchéité (voir ci-après).

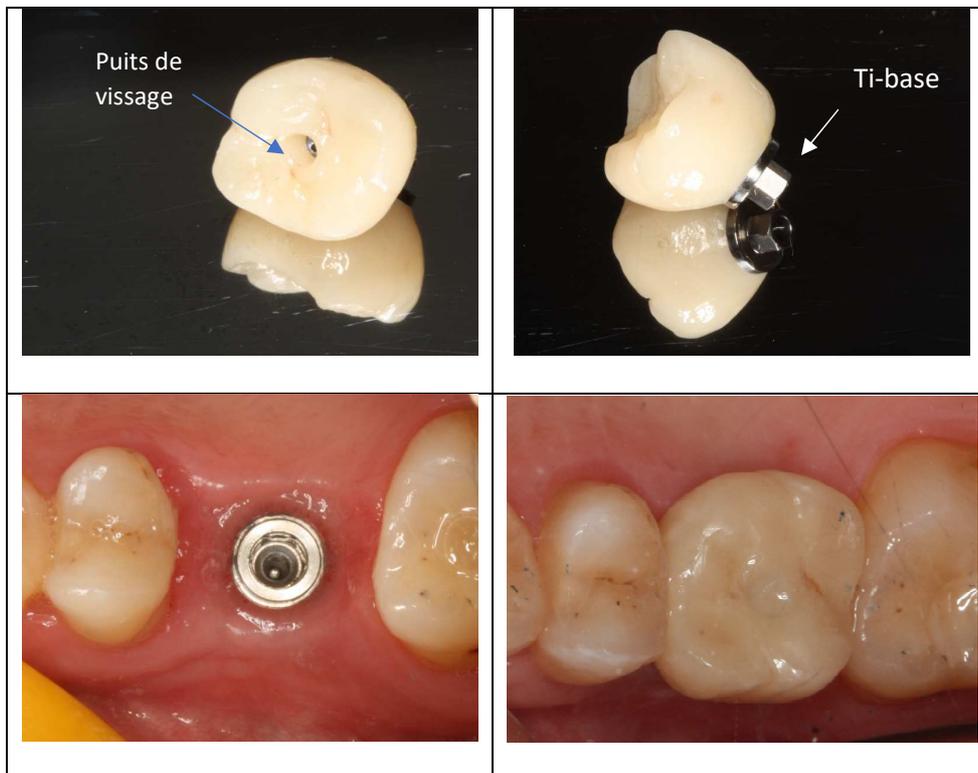


Figure 48 : couronne transvissée avec Ti-base

Lorsque l'axe de l'implant a pu être respecté, le puits de vissage émerge sur la face occlusale et peut être refermé de façon esthétique et étanche (système Thommen, données personnelles).

Certains fabricants proposent aussi un type d'assemblage avec « puits d'accès angulé » : même si la tête du tournevis n'est pas parfaitement dans l'axe de la vis, il est possible de la visser correctement. Selon

leurs données, il est possible de visser jusqu'à 25° de divergence (sources : NobelBiocare) (**figure 49**). Cette solution permet d'associer un pilier en titane à connectique interne à une couronne (ou une armature) en zircone : le pilier (ou « Ti-base ») est placé dans l'implant, la couronne sur le Ti-base et la vis vient stabiliser l'ensemble dans l'implant. Cet assemblage crée toutefois une seconde connectique externe entre le Ti-base en titane et la couronne, elle aussi susceptible d'être contaminée par les bactéries.



Figure 49 : systèmes de vissage avec puits de vissage angulé (images : NobelBiocare)

Le système avec puits de vissage angulé permet d'obtenir une sortie de puits en face palatine pour les dents maxillaires antérieures, et ainsi de concevoir une prothèse transvissée.

Plusieurs études ont étudié cette colonisation bactérienne des connectiques. La revue de littérature présentée précédemment (**chapitre 1**) décrit différentes méthodes évaluant le passage bactérien depuis l'intérieur vers l'extérieur de l'assemblage Ti-base/implant en contaminant initialement la chambre implantaire, puis en vissant la couronne secondairement. Le milieu de culture devient trouble quand les bactéries passent par l'un des hiatus entre l'intérieur de l'implant et le milieu extérieur (Steinebrunner et al. 2005; Dias et al. 2012). Le risque de ces techniques est d'obtenir des faux-positifs par contamination involontaire du milieu de culture.

Une autre option consiste à assembler de manière stérile la couronne à l'implant, puis à évaluer la contamination interne après immersion dans un milieu contaminé (do Nascimento et al. 2009; Duarte et al. 2006; Pappalardo et al. 2007). Dans ce cas, les techniques proposées peuvent faire appel à la biologie moléculaire en écouvillonnant l'intérieur de l'implant, puis en détectant les bactéries présentes par des techniques d'amplification d'ADN bactérien (do Nascimento et al. 2012; do Nascimento et al. 2011), ou par un comptage du nombre de colonies (CFU) sur boîte de pétri après réensemencement (Baggi et al. 2013). D'autres techniques utilisent la microscopie à balayage (MEB) pour visualiser les bactéries après avoir démonté les pièces (Jansen, Conrads, and Richter 1997).

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

Quelle que soit la méthode retenue, les études constatent, en moyenne, une contamination des hiatus à partir de 15 jours d'incubation (Baixe, Tenenbaum, and Etienne 2016).

II. Objectifs

Notre étude a pour objectif d'évaluer, en condition statique, l'étanchéité des *microgaps* entre les pièces prothétiques, et plus précisément entre le Ti-base et l'implant (joint Ti-base/implant (JTBI), premier *microgap*), et entre le Ti-base et la couronne (joint couronne/Ti-base (JCTB), deuxième *microgap*). Le puits d'accès est, lui, fermé de façon la plus étanche possible afin d'étudier uniquement ces deux voies de passage bactérien (**figure 50**). Des pré-tests nous ont permis de confirmer l'étanchéité de notre méthodologie de fermeture (*data non présentées ici*).

Ensuite, les composants prothétiques sont soit vissés directement sur l'implant (couronne placée sur le Ti-base et maintenue par la vis), soit associés avec un collage entre le Ti-base et la couronne. Ces échantillons constituent nos contrôles positifs.

Afin de tester l'efficacité de notre hydrogel, d'autres échantillons bénéficient de son injection dans la ou les connectiques (JCTB et/ou JTBI) afin de tester sa capacité à bloquer le passage bactérien. Le gel d'AC 1% chargé en D-CTL (3mg/mL) est retenu conformément aux conclusions du chapitre 3 (CMI du gel).

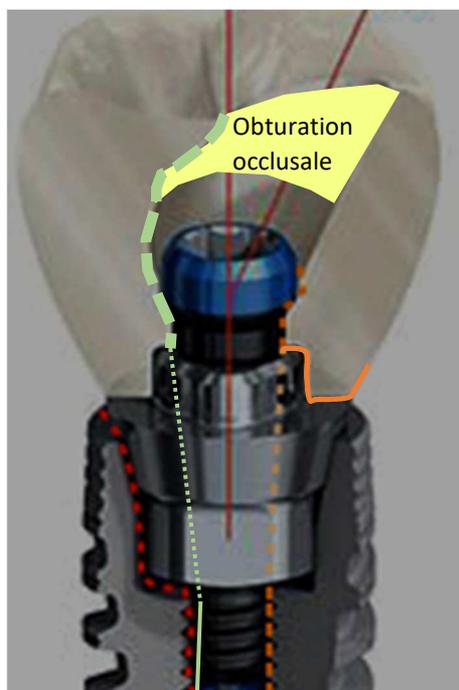


Figure 50 : montage d'une couronne transvissée : possibilités de passage bactérien

En pointillet rouge, le cheminement bactérien par le joint Ti-base/implant (JTBI).

En orange, leur passage des bactéries le long du joint Ti-base/couronne (JTBC) puis par la vis.

En tiret vert, la colonisation passe par un puits occlusal perméable, puis le long de la vis.

Quatre groupes d'échantillons ont ainsi été testés :

- **Groupe 1** : Le Ti-base et la couronne sont vissés, laissant 2 *microgaps* accessibles à la contamination ;
- **Groupe 2** : Le Ti-base et la couronne sont collés, laissant comme seul *microgap* le joint Ti-base/implant ;
- **Groupe 3** : Le Ti-base et la couronne sont vissés, les deux *microgaps* sont remplis de notre hydrogel ;
- **Groupe 4** : Le Ti-base et la couronne sont collés, laissant comme seul *microgap* le joint Ti-base/implant. L'hydrogel est injecté dans celui-ci.

III. Matériels et méthodes

1. Préparation des implants et des boîtes

Notre étude repose sur une méthode d'évaluation de la contamination depuis l'extérieur vers l'intérieur, comme ce qui se passe en milieu buccal. Afin de déterminer le délai de contamination des espaces internes, nous avons imaginé une méthodologie originale. Celle-ci consiste à positionner l'implant entre deux compartiments étanches, de couper sa partie apicale jusqu'aux espaces internes et de contaminer le compartiment en regard de la couronne. Nous pouvons dès lors déterminer le délai d'invasion des espaces internes lorsque le compartiment apical est contaminé.

Pour ce faire, une boîte en téflon (e-PTFE) est réalisée par usinage. Elle comprend 1 compartiment principal pour le milieu de culture contaminé par *E. coli*, et 2 compartiments secondaires pour les milieux de cultures stériles. Un trou est réalisé entre chacun des compartiments secondaires et le compartiment principal, centré sur le milieu des compartiments secondaires, à l'aide de forets Nobel Biocare (Twist Step Drill) de diamètre croissant : 2 - 2.4/2.8 – 3.2/3.6 – 4.2/4.6 millimètres.

Pour chaque échantillon, 1 implant dentaire (Nobelbiocare, Nobel parallel™ Conical Connection 5,5 x 15 mm) est sectionné à l'aide d'une fraise « transmétal » à son apex sur 4 mm environ afin d'accéder au fond de la chambre implantaire (**figure 51**). L'implant est enrobé de colle cyanoacrylate sur la surface

externe, puis vissé immédiatement dans son trou correspondant. L'ensemble est laissé 24 heures afin d'obtenir une polymérisation complète de la colle, puis la boîte est stérilisée sous sachet.

Nos pré-tests au bleu de méthylène ont confirmé l'étanchéité de ce collage implant/téflon.

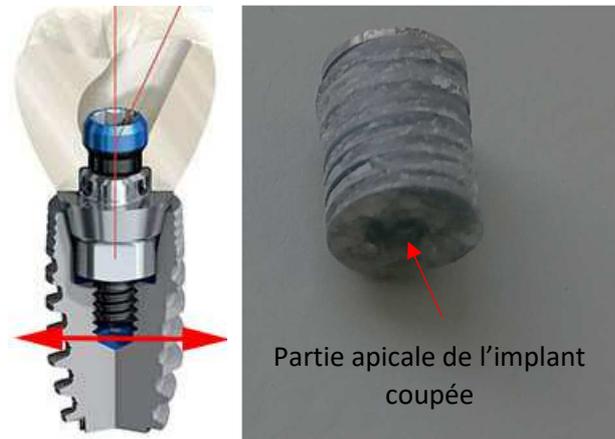


Figure 51 : assemblage FCZ, Nobelbiocare : trait de section de l'implant

L'implant est sectionné (trait rouge) afin de permettre le passage des bactéries d'un compartiment à l'autre si les joints ne sont pas étanches

2. Céramisation du puits de vissage

Pour chaque échantillon, l'ensemble Ti-base/vis/couronne est fourni par la société NobelBiocare. Toutes les couronnes sont de morphologie identique, constituée d'un monobloc de zircone FCZ® (Full Contour Zirconia). Une petite gouttière est aménagée sur la partie occlusale du puits de vissage, et une couche de céramique feldspathique (Cercon Kiss, Dentsply Sirona) y est apposée, selon une méthode traditionnelle, par un prothésiste expérimenté (**figure 52**).

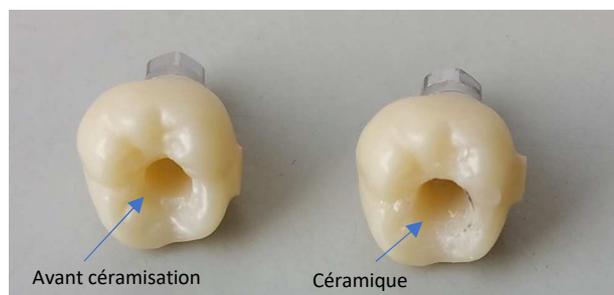


Figure 52 : céramisation du puits de vissage

La vitrocéramique est apposée dans la petite gouttière occlusale prévue à cet effet. Elle entre sur environ deux millimètres dans le puits occlusal. Elle assure l'étanchéité grâce à un protocole de collage avéré (mordançage / silanisation).

3. Préparation initiale des couronnes

La préparation varie selon les groupes d'échantillons :

- Groupes 1 à 4 : la vitrocéramique est mordancée 2 minutes à l'acide fluorhydrique (Ultradent® Porcelain Etch), puis rincée abondamment. La couronne est séchée et stérilisée sous sachet en suivant un cycle prion conventionnel à 134°C.
- Groupes 2 et 4 : en plus de ce mordançage, le collage Ti-base/Couronne est effectué avec le kit Multilink® Hybrid Abutment (Ivoclar Vivadent) par un prothésiste expérimenté. Les excès sont éliminés et le joint est poli à l'aide de polissoires de laboratoire avant stérilisation.

4. Assemblage des couronnes dans les implants

Vissage

Chaque couronne est d'abord vissée manuellement dans son implant (**figure 53**). Lorsqu'un assemblage est testé avec gel, ce dernier est injecté dans la connectique au niveau de l'implant et/ou entre la couronne et son Ti-base. Ainsi, il déborde légèrement à l'insertion de la couronne, sans empêcher la mise en place de celle-ci. 128 μ L sont préparés pour chaque assemblage. Les couronnes sont ensuite vissées à un torque d'usage, recommandé par le fabricant (35 N.cm), à l'aide d'une clef dynamométrique.

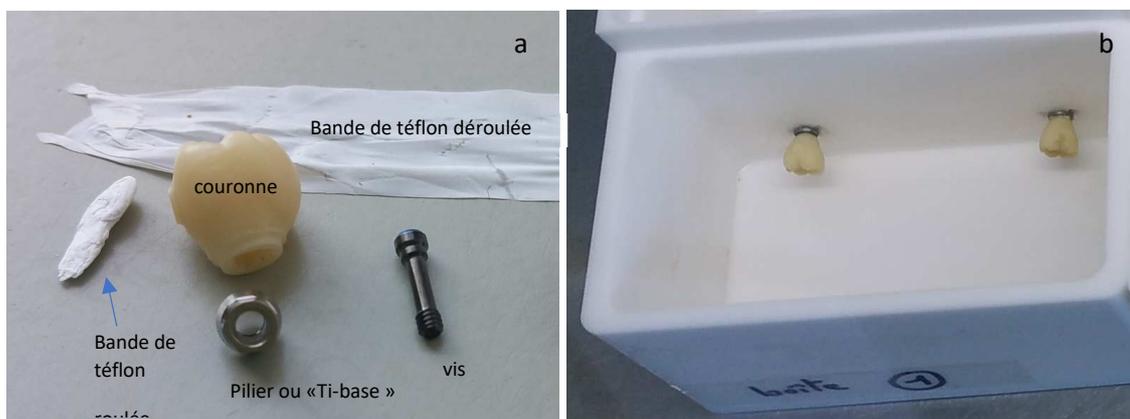


Figure 53 : assemblage prothétique démonté et vissé dans la boîte

L'assemblage prothétique (a), préalablement stérilisé, est monté dans la boîte (b) (ici assemblage vissé).

Le téflon est bien tassé contre la vis avant la fermeture du puits occlusal.

Fermeture du puits de vissage

Chaque puits est ensuite obturé de façon la plus étanche possible afin de ne pas avoir de passage bactérien à ce niveau. Un protocole conventionnel (« collage complet ») est effectué dans les manipulations présentées dans ce travail (**figure 54**) :

- Obturation du puits de vissage par une bande de téflon roulée sur elle-même (ruban PTFE 12 mm x 0,075 millimètres, GEB). La bande roulée, préalablement stérilisée, est compressée contre la vis à l'aide d'un fouloir, et laisse la céramique stratifiée libre afin de réaliser le collage.

- Silanisation au Monobond S plus (Ivoclar Vivadent) : 60 secondes.

- Mise en place d'adhésif (G-Premio Bond, GC) sur la céramique occlusale à l'aide de minibrush, polymérisation de 20 secondes.

- Mise en place d'une résine composite (Estelite Sigma Quick- Quick cure) sur la partie occlusale libre du puits (polymérisation de 20 secondes).



Figure 54 : protocole clinique de fermeture du puits de vissage

La fermeture du puits est effectuée en mettant une boulette de téflon stérile, puis respectant un protocole de collage complet.

Mise en place du milieu de culture

Le milieu LB est versé dans chacun des 3 compartiments : 150 mL pour le milieu « contaminé » au niveau des couronnes, et 75 mL pour chacun des compartiments « stériles » (**figure 55**). 100 μ L de bactéries *E. coli* issues d'une préculture sont injectées dans le bain « contaminé ». Des films transparents (Sealing tape sterile, ThermoScientific) sont collés de façon individuelle sur chacun des 3 compartiments de chaque boîte afin d'éviter les contaminations d'un compartiment à un autre. Les boîtes sont mises sur un agitateur, dans un incubateur à 37°C (300 rpm).

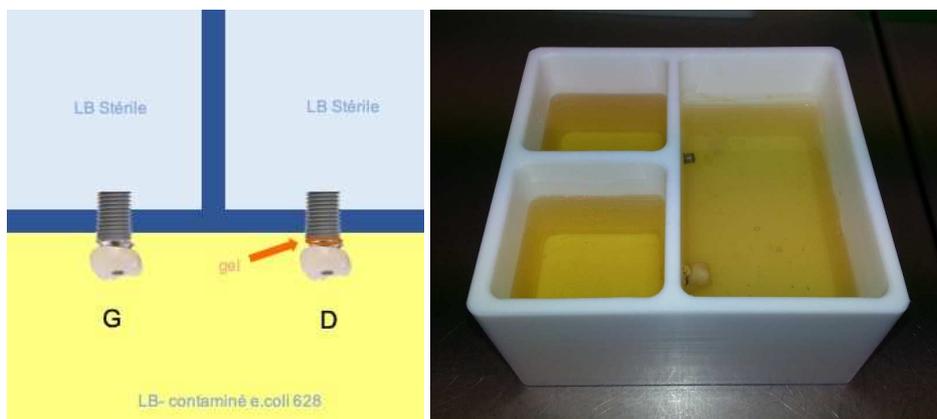


Figure 55 : mise en place du milieu de culture

Le milieu de culture est versé dans chacun des compartiments, puis chaque compartiment est recouvert d'une feuille adhésive stérile.

Incubation et suivi

Le compartiment principal est contaminé par *E. coli* (ATCC 25922 et K12), à une DO de 0,001. Cette bactérie est utilisée en tant que modèle expérimental. Les milieux sont vérifiés tous les jours, et le bain contaminé est changé tous les 2 jours. La manipulation est effectuée sur 1 mois. Dans chacune des 4 boîtes, 2 conditions différentes (G : Gauche, D : Droite) sont testées pour toutes les expériences. À ce jour, trois séries de manipulations ont été réalisées.

Un contrôle régulier de la DO est effectué pour chacun des milieux au niveau de l'apex de l'implant.

Un prélèvement de 5 µl est également effectué et remis en culture sur des boîtes de pétri de milieu LB afin de s'assurer de la non-contamination du milieu.

Visualisation au Microscope (MEB)

Les échantillons sont démontés des boîtes pour les visualiser au MEB lorsque la contamination est effective ou après un délai d'un mois pour ceux n'ayant pas subi de contamination. Selon le cas, soit la couronne est laissée assemblée à l'implant afin d'obtenir une vue d'ensemble externe, soit elle est dévissée de l'implant. Dans ce cas, le composite occlusal est fraisé et la boulette de téflon est retirée pour accéder à la vis. L'ensemble est démonté pour visualiser les différents hiatus.

Fixation

La fixation est réalisée dans un mélange de cacodylate de sodium 0,05 M + glutaraldéhyde 4% ajusté à pH 7.4 pendant 48h (**voir protocole chapitre 3**). Les différents éléments préparés sont : la boulette de téflon, la couronne zircone avec le Ti-base collé ou non, la vis et l'implant.

Déshydratation

Deux types de préparations sont effectuées (**voir protocole chapitre 3**) : déshydratation classique au HMDS et par lyophilisation.

IV. Résultats

1. Microbiologie

A ce jour, 25 assemblages ont été testés. Les résultats sont rapportés tout d'abord dans un tableau exprimant la contamination avant 1 mois (O), ou la non-contamination à 1 mois (N) (**Tableau 1**).

Échantillon #	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
1	O	O	O	N
2	O	O	O	N
3	O	O	N	N
4	N	N	N	N
5	N	O	N	/
6	O	N	O	/
7	O	N	O	/
8	N	N	O	/
9	O	N	O	/
10	O	O	O	/
11	O	/	O	/

Tableau 1 : contamination/ non-contamination à 1 mois par groupe testé

Le bain de la partie apicale des assemblages, initialement « stérile », peut être contaminé ou non à l'issue des 30 jours de manipulation. Ce tableau résume par type d'échantillon, si la contamination a eu lieu (O) ou non (N).

A titre d'illustration, pour la première série de manipulations (4 boîtes), de tous les assemblages, seul 1 échantillon « couronne collée sur Ti-base sans gel » (Groupe 2) est contaminé à partir de J +23 jours (**figure 56**).

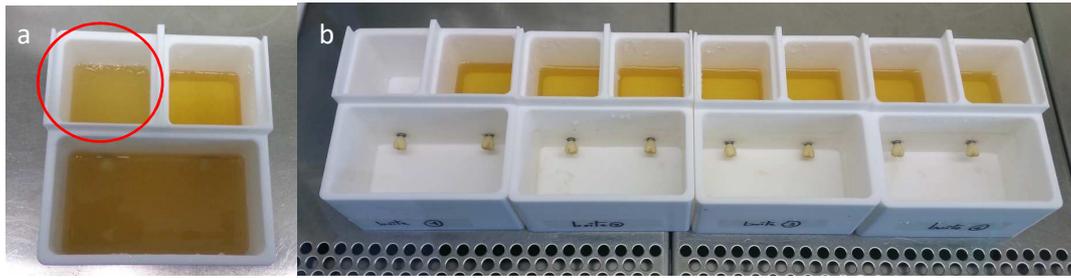


Figure 56 : contamination à 1 mois

(a) : le compartiment supérieur gauche est contaminé (boîte 1, Gauche (1G)), impliquant un passage bactérien depuis le compartiment inférieur. (b) : les compartiments contaminés sont vidés, et une mesure de DO est réalisée pour chacun des milieux propres restants (de 0,003 à 0,020).

Le réensemencement sur boîte de pétri à J +23 jours confirme la croissance bactérienne (**figure 57**). Les DO issues des milieux stériles sont comprises entre 0,001 et 0,020 pour chacun des compartiments, sauf le 1G indiquant 1,707.

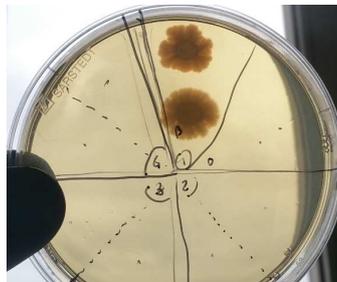


Figure 57 : réensemencement des compartiments

Seul l'échantillon 1G est contaminé.

Une autre représentation possible des résultats consiste à exprimer le délai de contamination pour chacun des groupes testés, sous la forme d'un graphique (**figure 58**).

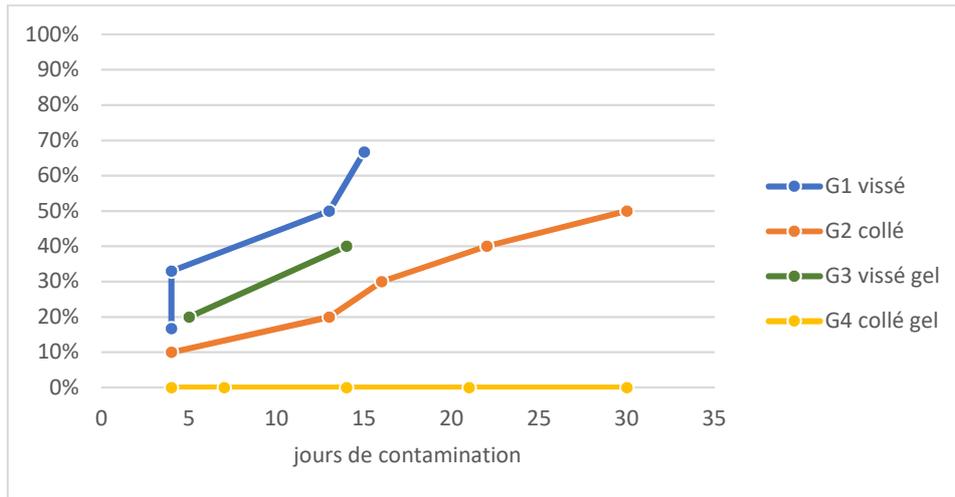


Figure 58 : taux d'échantillons contaminés par groupe (G1 à 4) en fonction du temps

Après un mois de contamination, au moins 50% des échantillons testés sans gel présentent une contamination interne. Il n'y pas d'échantillon contaminé dans le Groupe 4 (collé + gel) dans nos manipulations.

Comme attendu, les assemblages à *microgaps* ouverts (sans gel) présentent des contaminations (G1 et G2) ; d'autant plus précoces lorsque ces *microgaps* sont doubles (G1). Le groupe G4 n'a présenté aucune contamination à 1 mois. En revanche, la manipulation en cours actuellement, concernant le groupe G3 présente déjà 40% de contamination à 15 jours. L'imagerie devrait permettre de préciser l'origine de celle-ci. Parmi les hypothèses envisagées, la contamination accidentelle doit être vérifiée en premier lieu. Ensuite, la présence de deux *microgaps* étanchéifiés à l'aide du gel (contrairement au groupe G4) augmente logiquement le risque d'application incomplète et de voies de percolation possible. Le contrôle en MEB devrait nous permettre de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses. Une autre hypothèse est une perte d'activité de la D-CTL, ce qui pourrait être vérifié par HPLC.

2. Visualisation MEB

Assemblage représentatif du Groupe 2 (collé sans gel)

1. Couronne et implant assemblés, sans passage bactérien

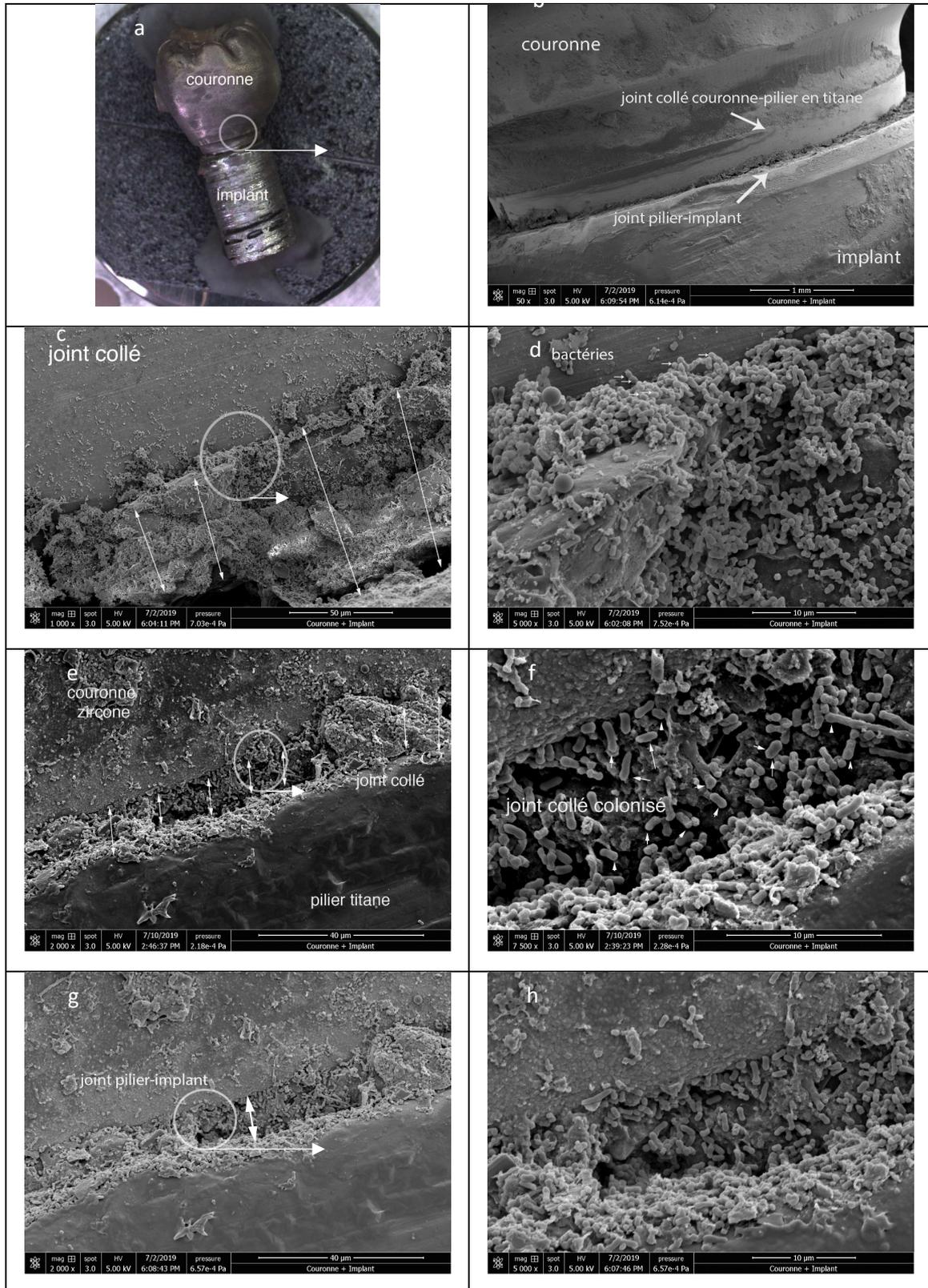


Figure 59 : assemblage Ti-base/couronne non contaminé, vue MEB

Les bactéries contaminent toutes les surfaces exposées. Le joint de colle entre le Ti-base et la couronne zircon est particulièrement colonisé (c-f), ainsi que le joint Ti-base/implant (g-h) qui comporte des anfractuosités dans lesquelles se nichent les bactéries. À gauche, le plan d'ensemble (a,c,e,g) et à droite, la vue grossie (b,d,f,h).

2. Éléments séparés sans passage bactérien

La couronne et l'implant sont dévissés avant de visualiser séparément la couronne, la vis, le téflon et l'implant.

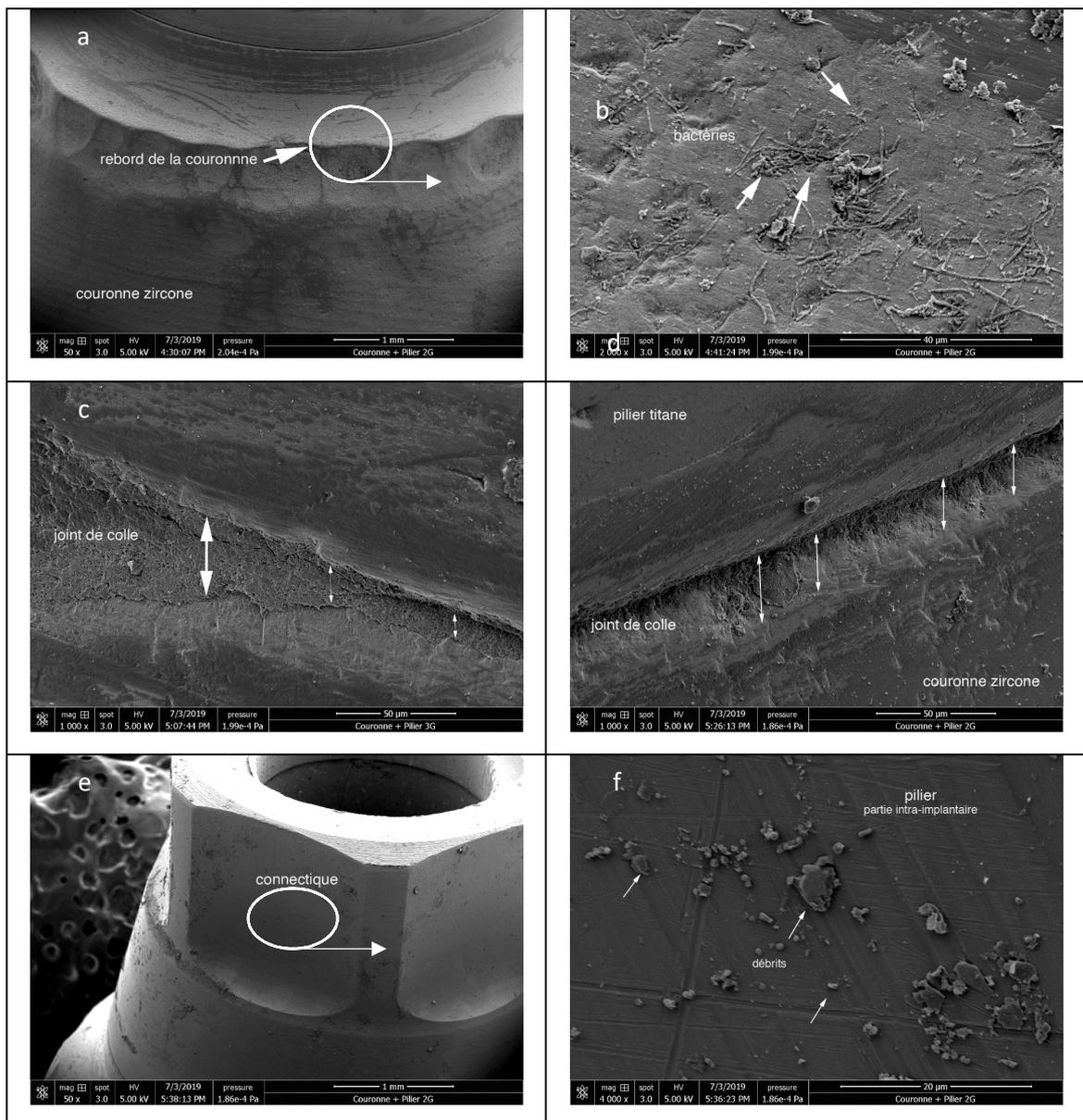


Figure 60 : couronne collée avec connectique non contaminée, vue MEB

Au niveau de la couronne, les bactéries sont présentes en plus grande quantité sur le rebord qui est à proximité de Ti-base en titane (a,b). Le joint de colle Ti-base/implant apparaît inégal selon l'endroit de l'observation :

il est soit débordant, soit légèrement manquant (c,d). La connectique n'est pas contaminée, malgré la présence de quelques impuretés (e,f). a,e : vue d'ensemble et respectivement b,f : vue agrandie.

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

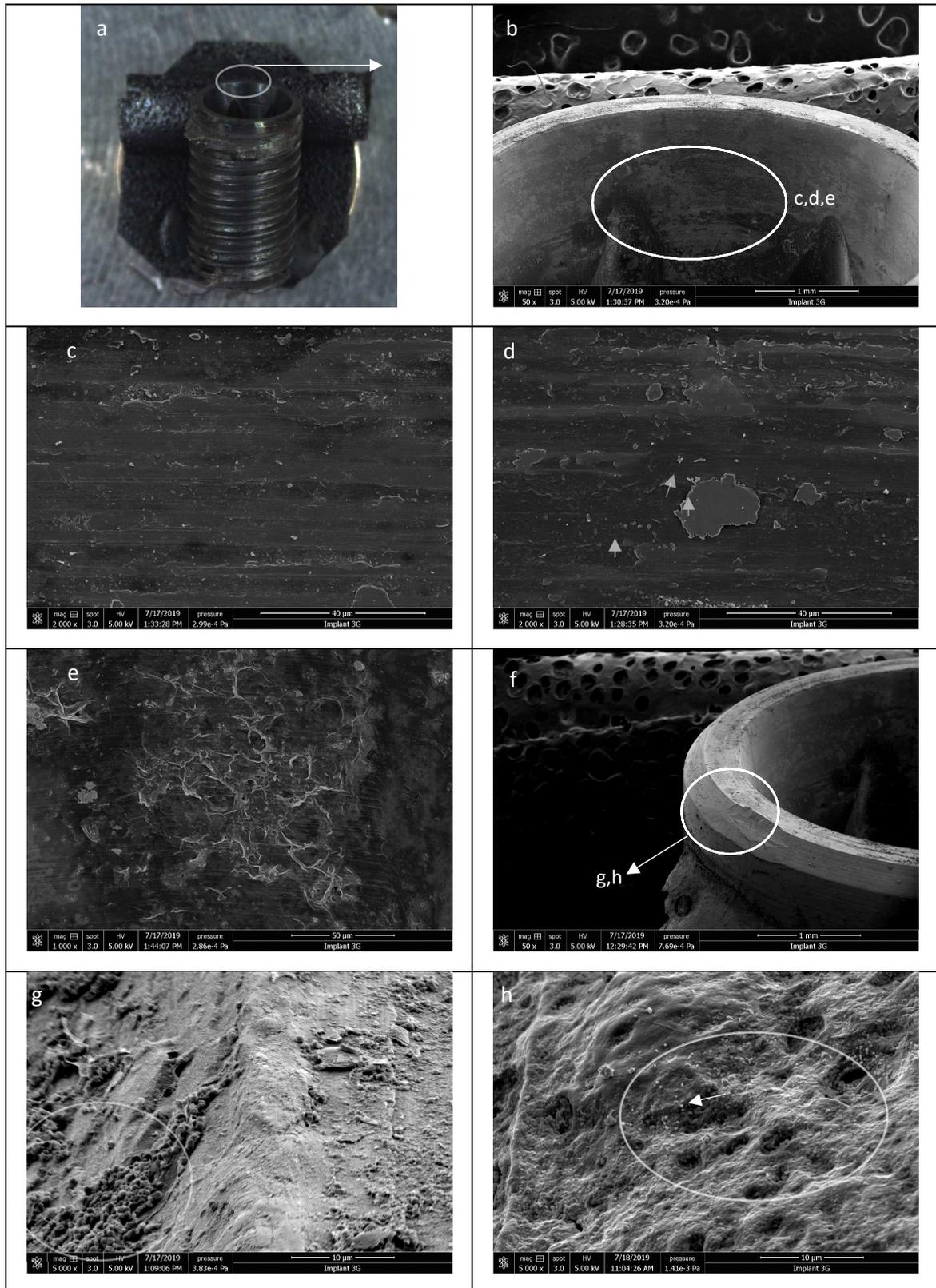


Figure 61 : implant avec connectique non contaminée (groupe 2), vue MEB

L'implant est globalement « propre » à l'intérieur de la connectique malgré quelques bactéries isolées (a-e). Les rebords et le tout début de la connectique sont toujours complètement contaminés par des colonies de bactéries (g-h).

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

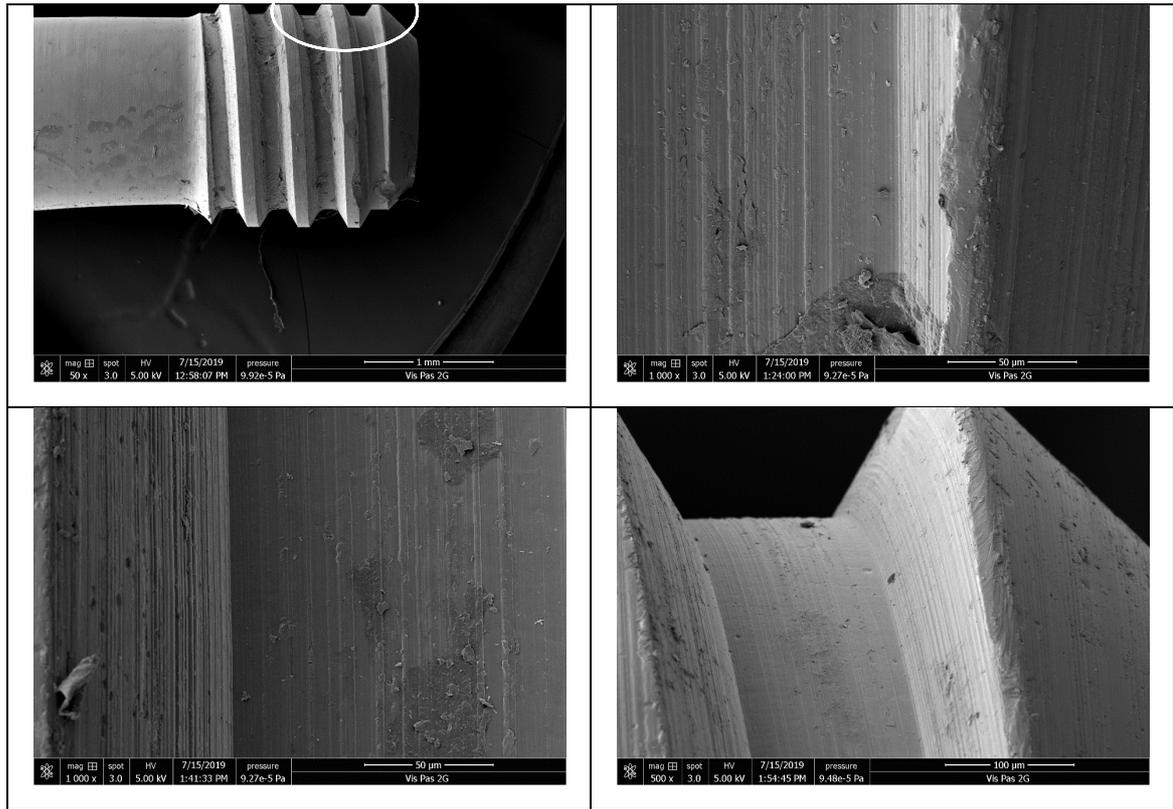
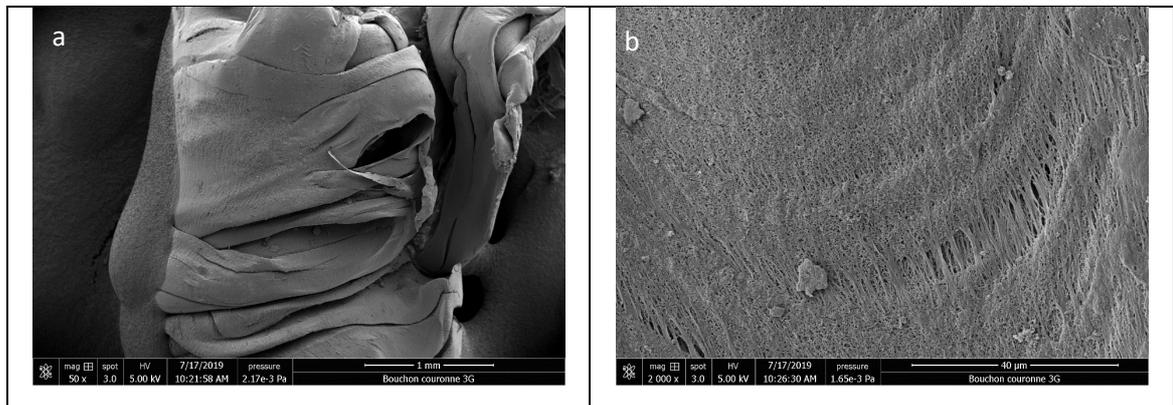


Figure 62 : vis avec connectique non contaminée, vue MEB

Il n'y a pas de bactéries sur et entre les spires.



4. Tests d'étanchéité sur boîtes

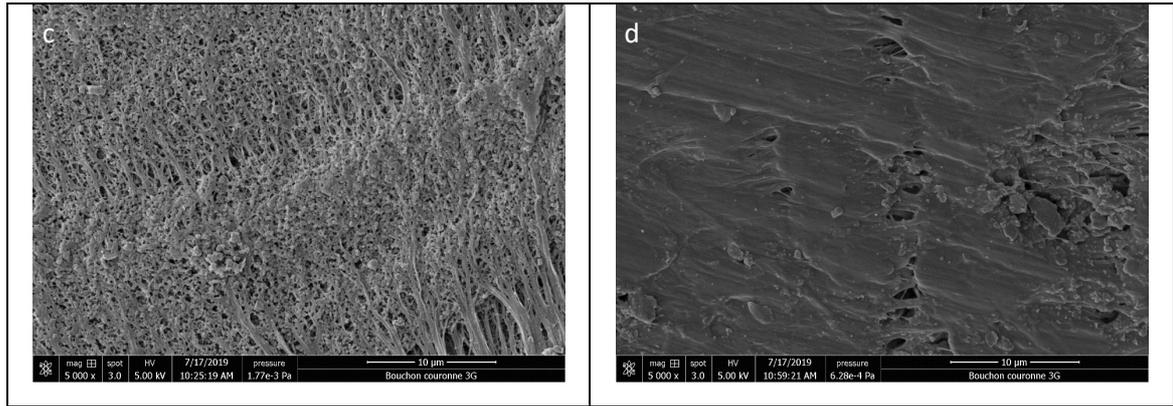


Figure 63 : téflon avec connectique non contaminée, vue MEB

Le téflon n'est pas contaminé par les bactéries, qui ne passent pas au-dessus de la vis.

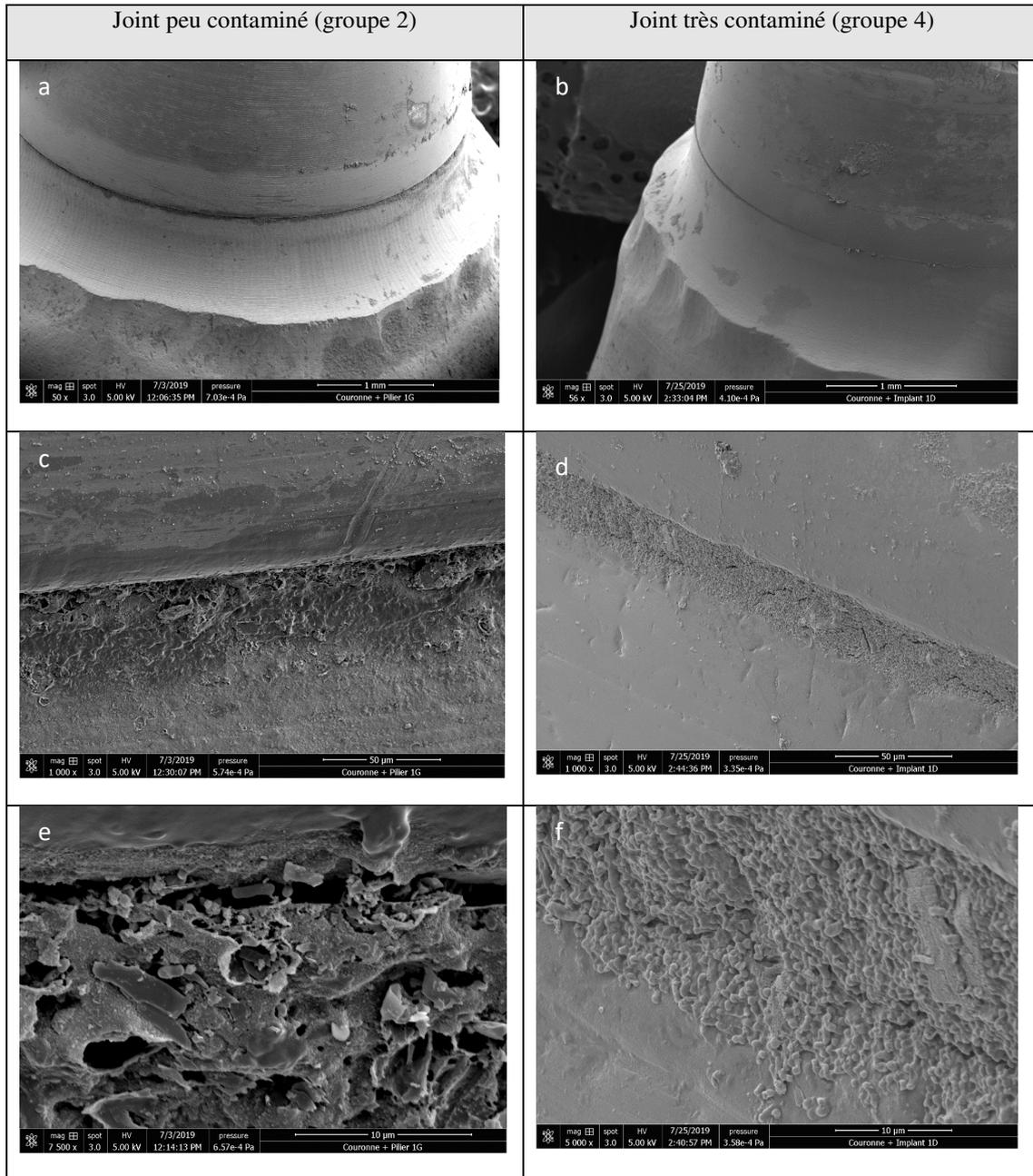
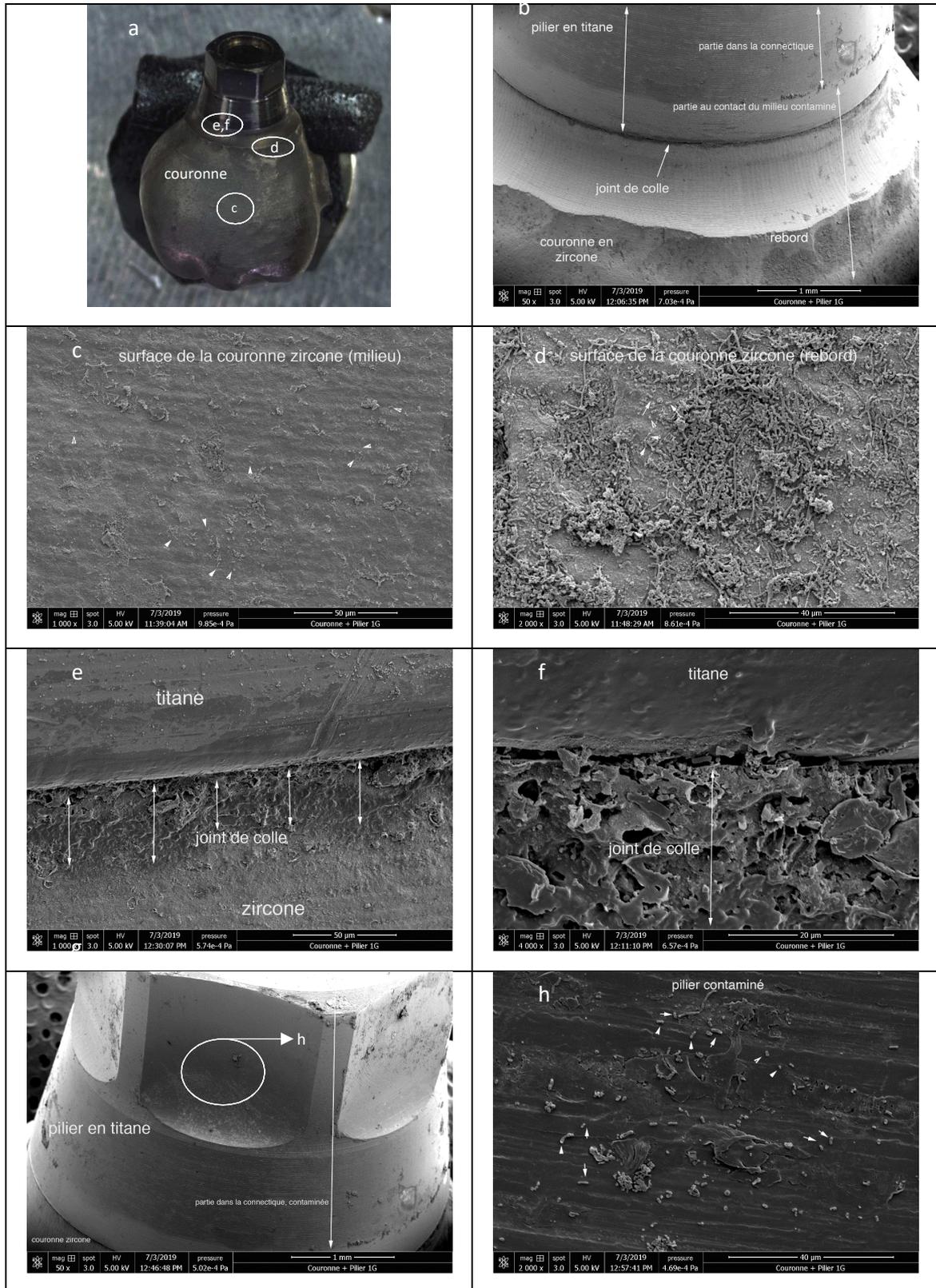


Figure 64 : comparaison des joints de collage des assemblages collés

En fonction du polissage du joint de collage, les bactéries adhèrent facilement (D : b,d,f) ou dans une moindre mesure (G : a,c,e) au joint de collage. Dans la majorité des manipulations effectuées, l'aspect du joint est celui d'un joint très contaminé (D). Les bactéries adhèrent à la résine du joint et aux bavures de résine laissées en place.

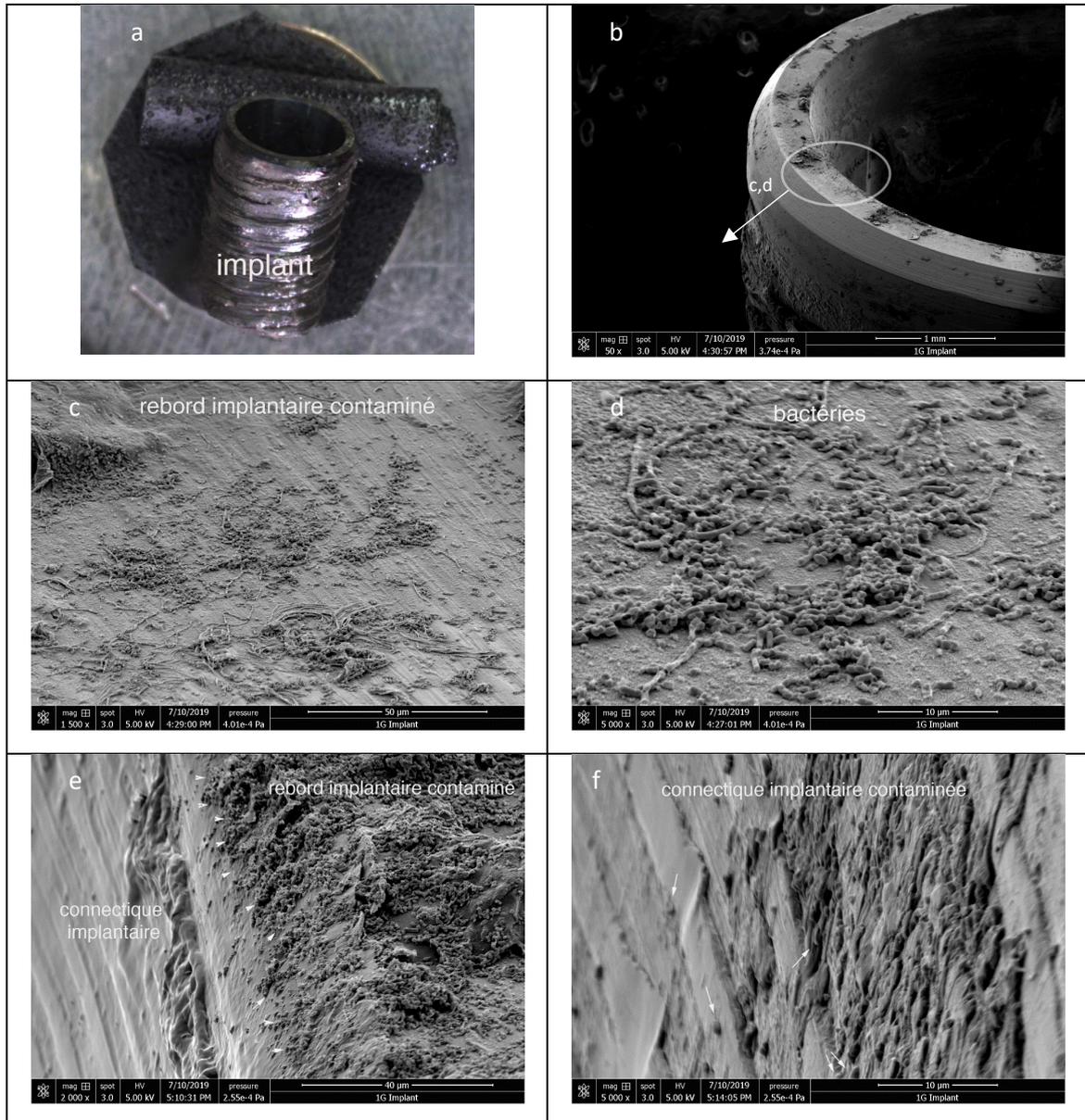
3. Éléments séparés avec passage bactérien



4. Tests d'étanchéité sur boîtes

Figure 65 : couronne collée avec connectique contaminée, vue MEB

Les bactéries sont présentes sur la surface coronaire de la zircone, en quantité plus importante au niveau du rebord que sur le reste de la surface coronaire (c,d). Peu de bactéries sont présentes au niveau du joint de colle (e,f). La connectique Ti-base/implant est complètement contaminée, ce qui montre que les bactéries sont bien passées par ce hiatus (g,h).



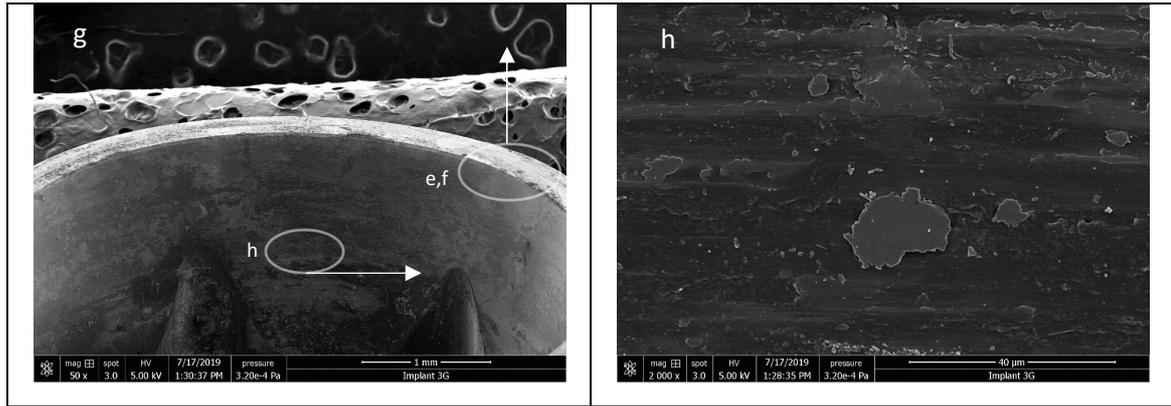


Figure 66 : implant avec connectique contaminée, vue MEB

L'implant est observé individuellement au niveau de la connectique (a,b). Un grossissement à partir de 1500 permet de bien mettre en évidence un tapis bactérien présent sur le col lisse implantaire (c-e). Quelques bactéries sont observées au niveau de la connectique (f-h).

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

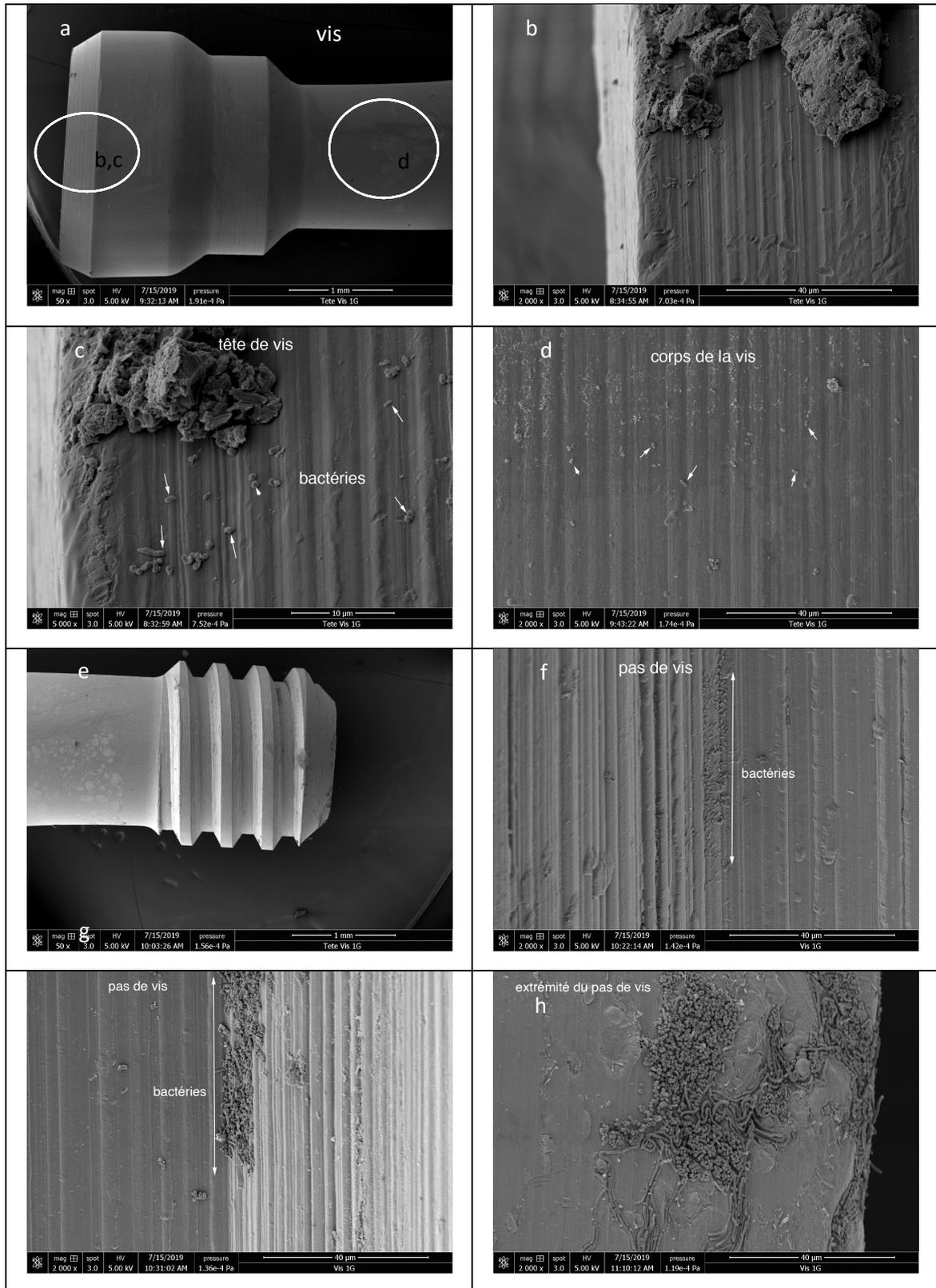


Figure 67 : vis avec connectique contaminée, vue MEB

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

La vis est légèrement contaminée, sur la tête de vis et le long du corps de vis (a-d). À l'extrémité, les bactéries sont plus présentes, en amas, et concentrées dans les anfractuosités avant chaque spire (g,h).

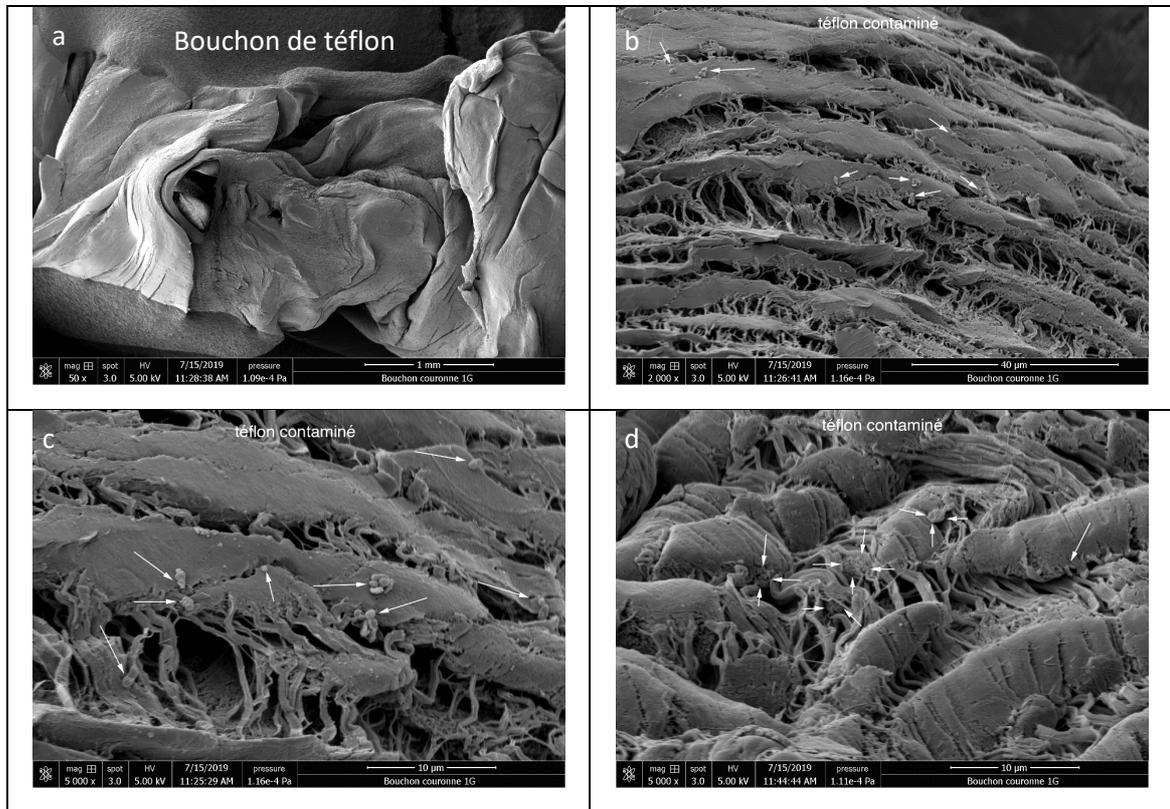


Figure 68 : téflon avec connectique contaminée, vue MEB

Le téflon est contaminé dans de nombreux interstices, où les bactéries sont concentrées.

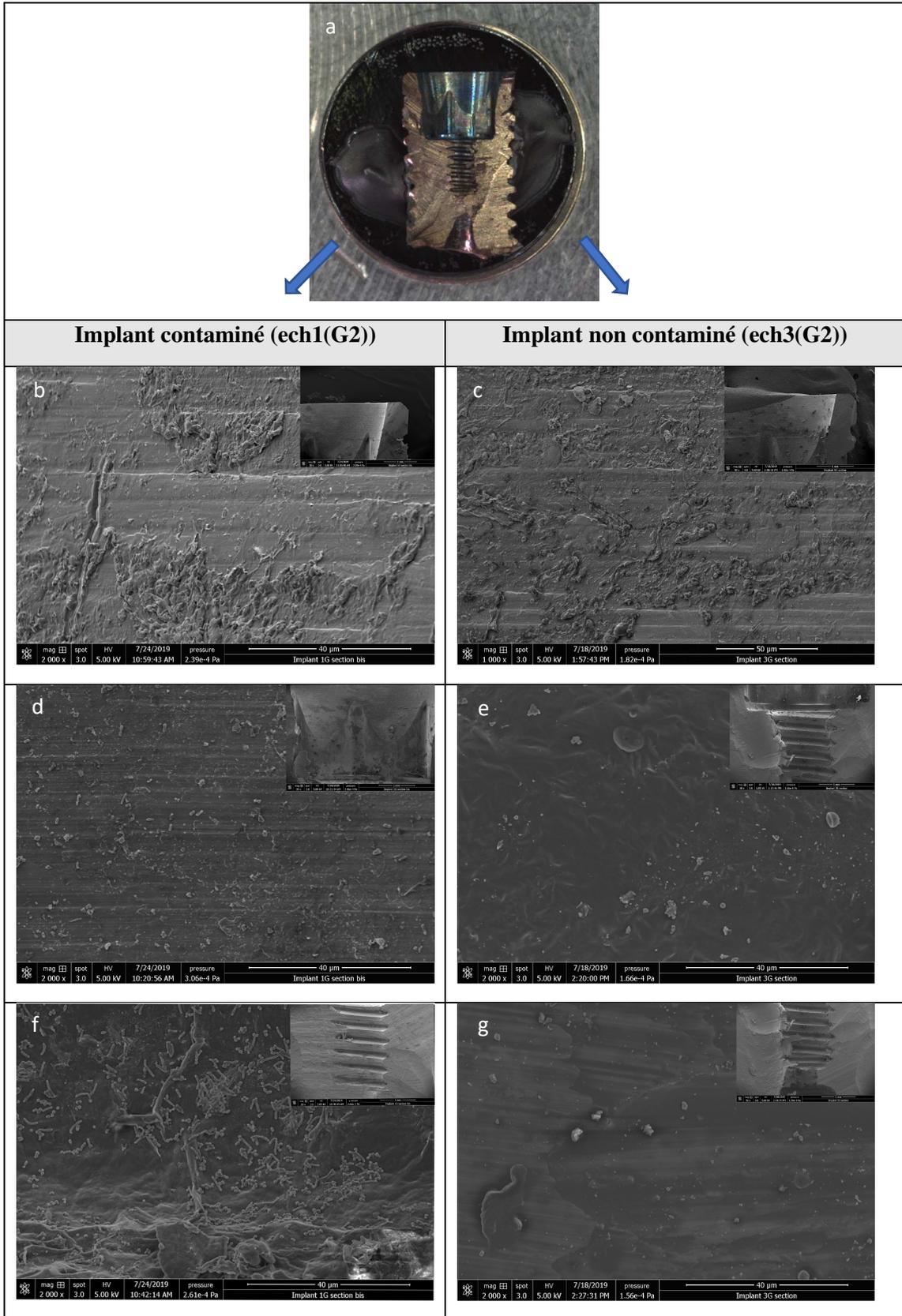


Figure 69 : comparaison de la connectique implant contaminé/implant non contaminé

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

Coupe de l'implant (a). Sur chaque photo en haut à droite, la zone étudiée correspondante. La connectique de l'implant contaminé (b,d,f) est envahie par les bactéries, notamment au niveau du pas de vis où leur présence est plus importante. Seuls quelques résidus sont présents dans l'implant non contaminé (c,e,g).

Assemblage représentatif du Groupe 4 (collé avec gel)

1. Éléments séparés, sans passage bactérien

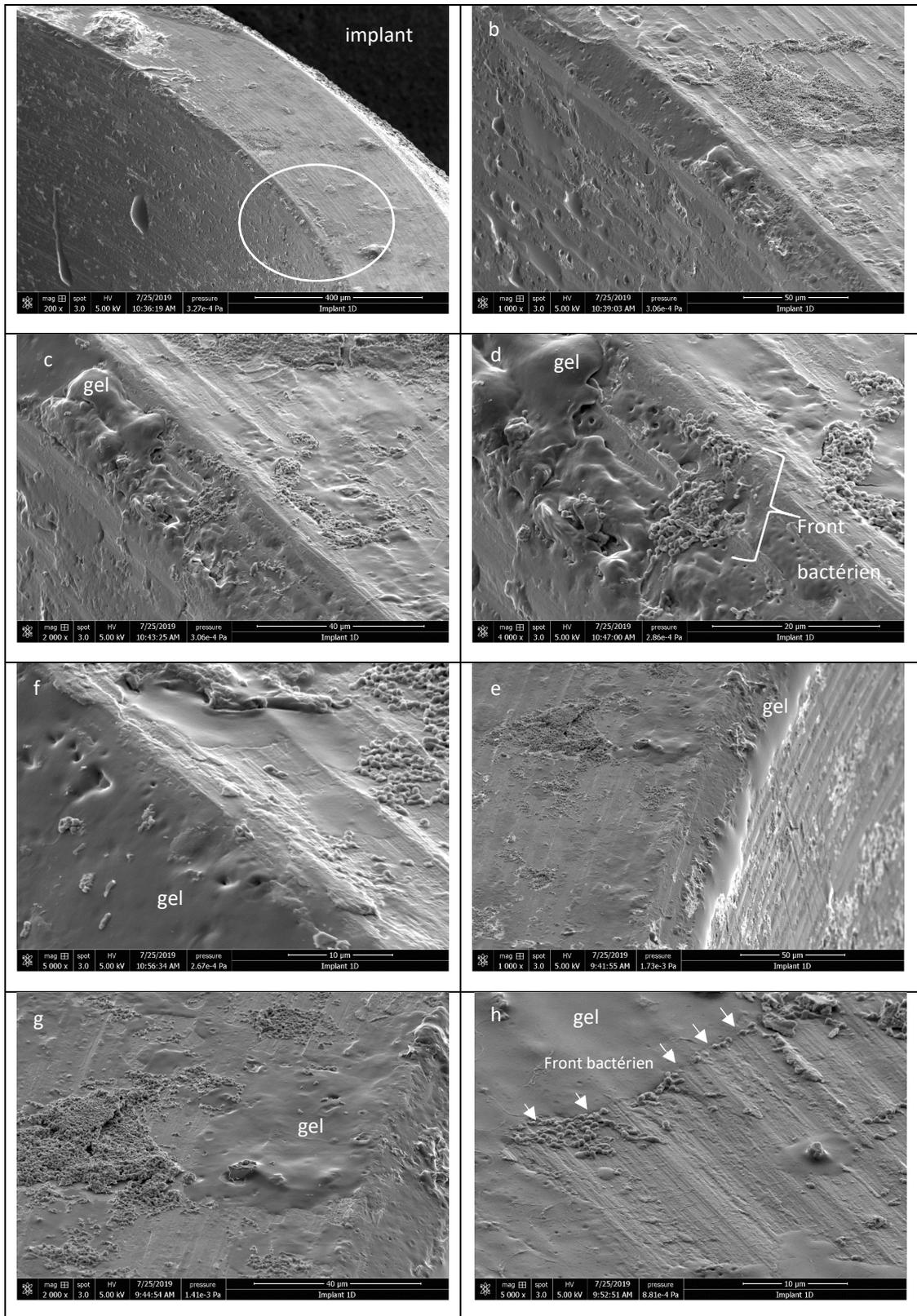


Figure 70 : implant « non contaminé », vue MEB

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

La technique de lyophilisation permet de conserver au maximum le gel afin de l'observer au MEB et lui donner un aspect en forme de gouttes (a). L'intérieur de la connectique, remplie de gel, est peu contaminée à + 30 jours (a-h). Les rebords de l'implant, en contact avec le milieu contaminé sont colonisés, mais les colonies bactériennes s'arrêtent fréquemment en front de gel (h).

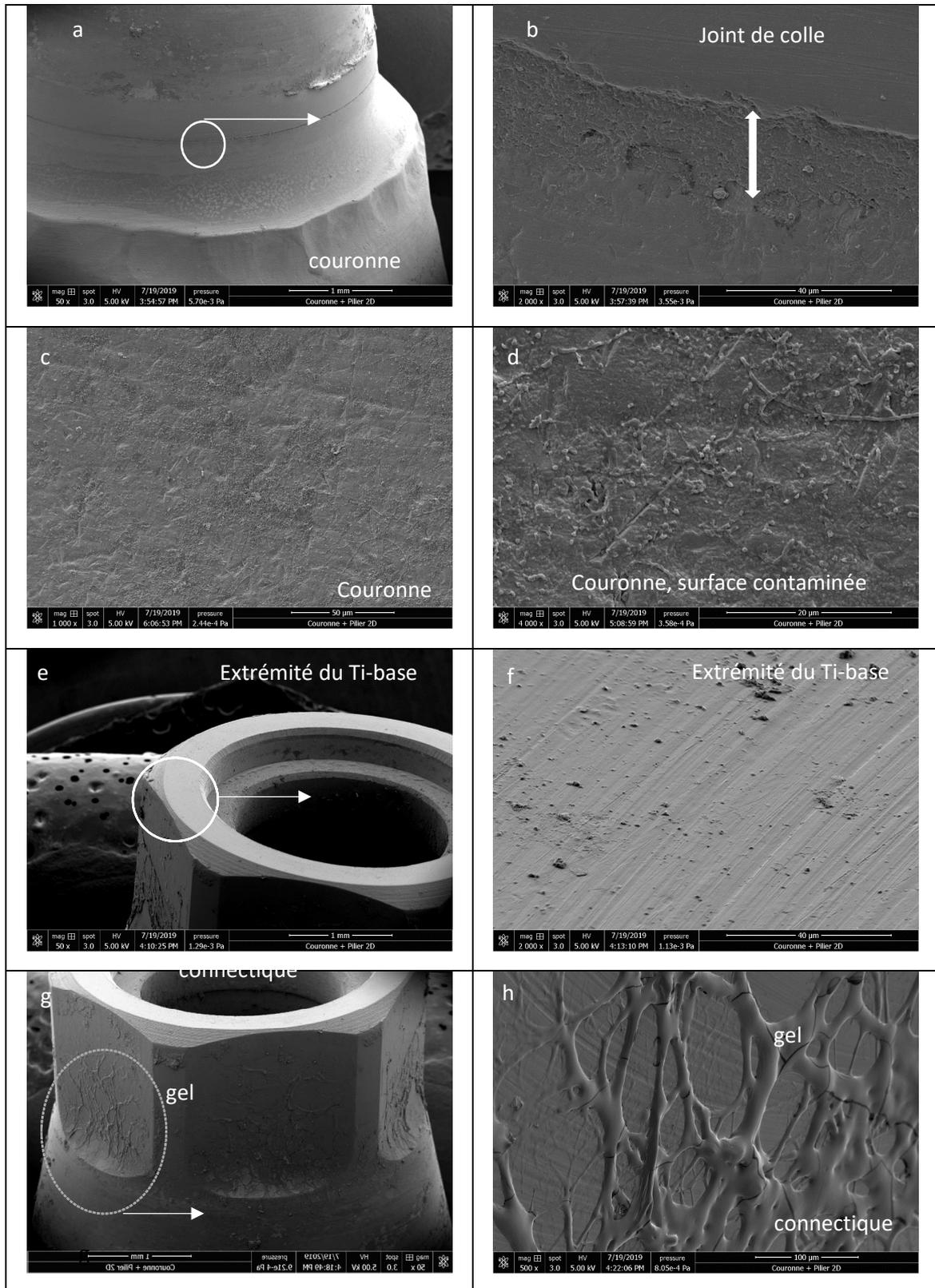


Figure 71 : couronne « non contaminée » avec gel, vue MEB

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

Le joint de collage couronne zircone/Ti-base est plus régulier et mieux préservé par lyophilisation. Il y a peu de bactéries présentes dessus (b), contrairement au reste de la couronne en contact avec le milieu contaminé (c-d). L'extrémité du Ti-base est également propre et n'a pas été contaminée (e,f). Les surfaces du Ti-base en contact avec l'implant présentent encore des traces de gel non contaminé (g-h).

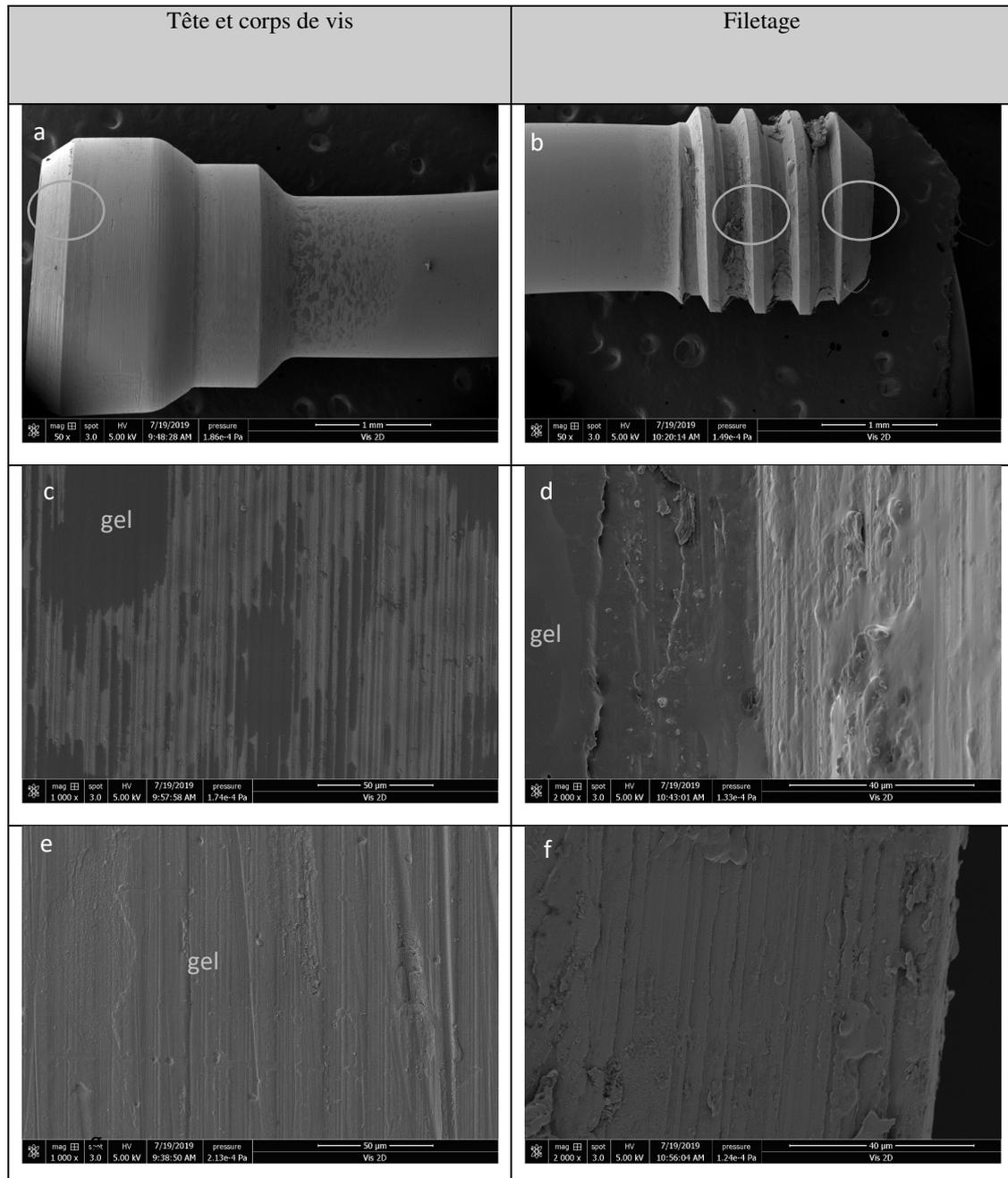


Figure 72 : vis « non contaminée » avec gel, vue MEB

La vis ne présente pas de contamination (a-f). Il y a des traces de gel au centre de la vis (c-e) et sur son filetage (d,f), liées à l'insertion de la couronne dans l'implant au moment de sa mise en place.

4. Tests d'étanchéité sur boîtes

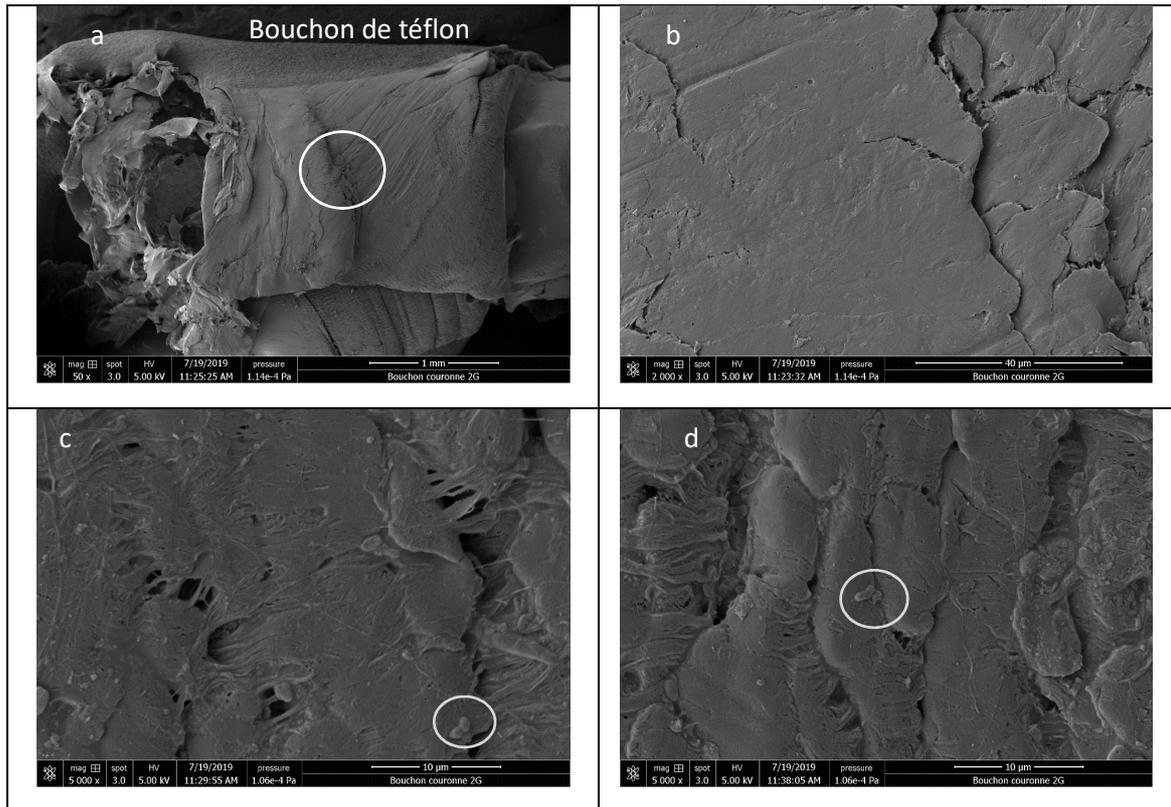


Figure 73 : bouchon de téflon, échantillon « non contaminé » avec gel, vue MEB

Le téflon n'est à aucun moment au contact du gel. Il existe de rares bactéries présentes en surface (c-d)

Assemblage représentatif du Groupe 1 (vissé sans gel)

1. Éléments séparés avec passage bactérien (échantillon 1 (G1))

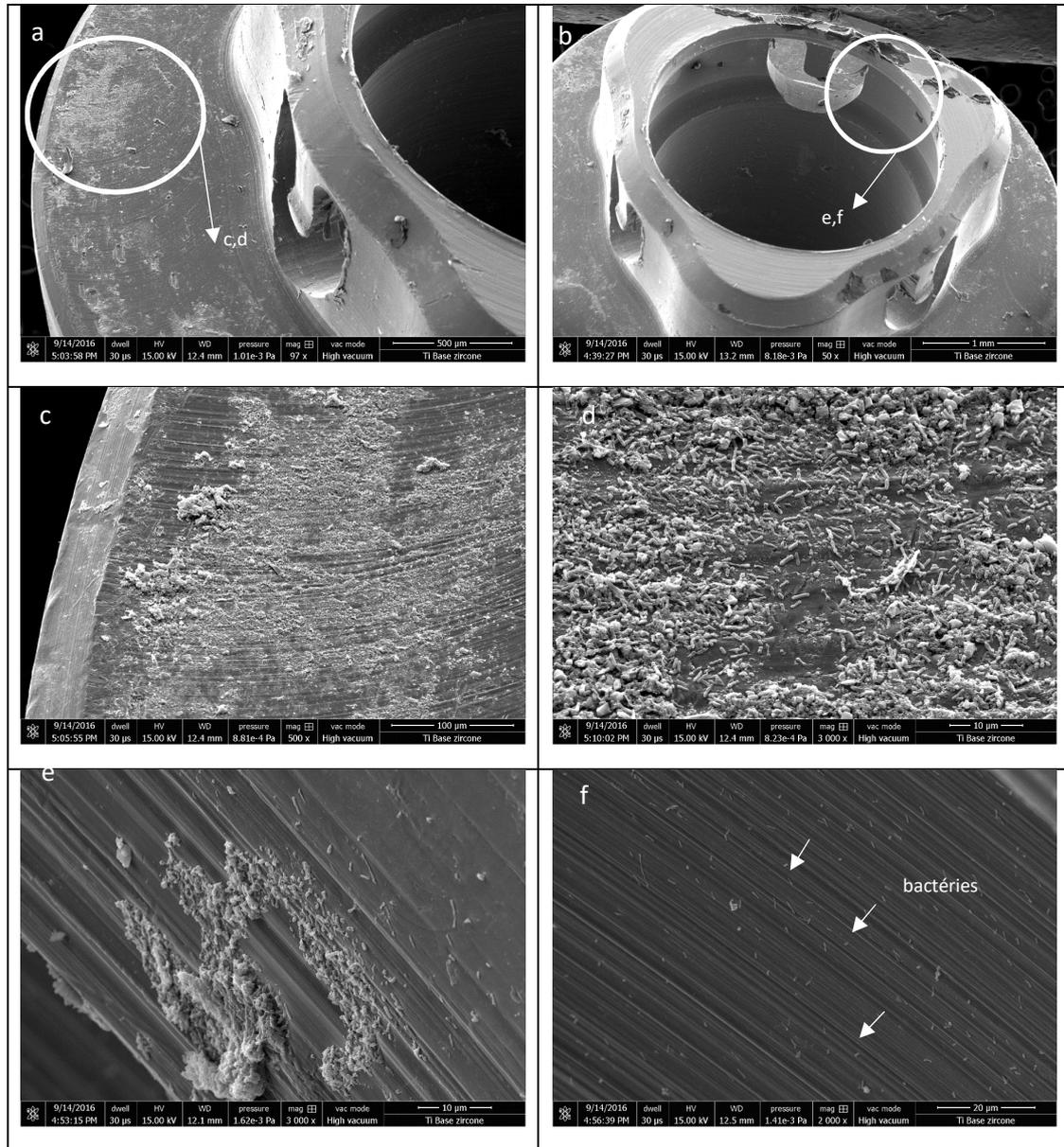


Figure 74 : visualisation joint Ti-base/ couronne : vue du Ti-base contaminé

Les bactéries sont particulièrement présentes sur le Ti-base contaminé. Les surfaces du plateau implantaire en regard de la couronne attirent particulièrement les bactéries (c,d), qui plongent ensuite dans le puits de vissage (e,f).

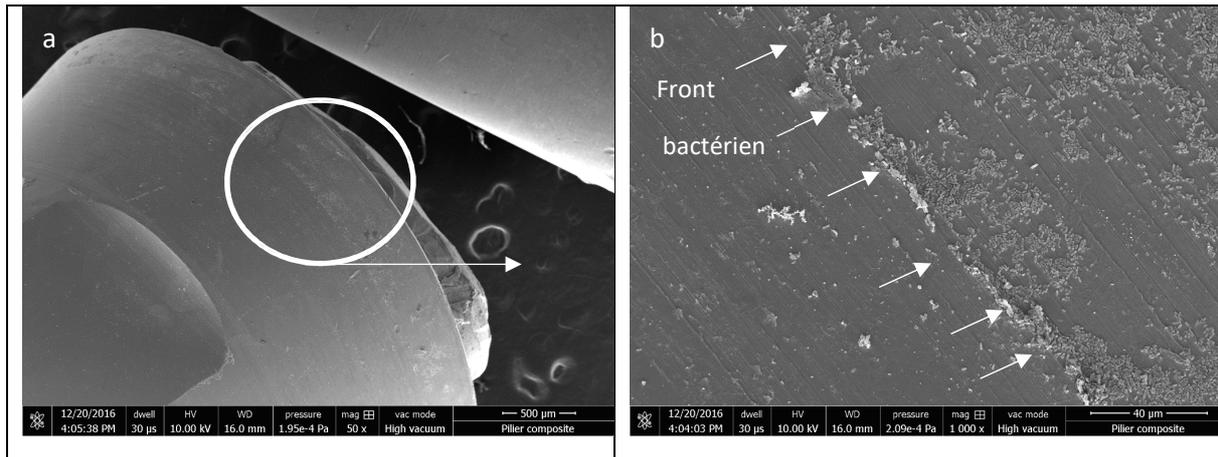


Figure 75 : vue de la connectique d'un Ti-base non contaminé (Groupe 1)

Les bactéries sont particulièrement présentes sur le pourtour du Ti-base en contact avec le milieu contaminé, et ne rentrent pas dans le joint Ti-base/implant

V. Discussion

Pour les échantillons sans gel et sans passage bactérien (**figure 59-63**), les bactéries sont retrouvées sur les zones rugueuses telles que le joint de collage (au niveau du JTBC) (**figure 64**), la partie de la couronne en zircone à proximité du JTBC et tout le long du JTBI.

Le joint de collage étant au contact des tissus mous, sa colonisation par des bactéries peut entretenir une inflammation localisée (mucosite péri-implantaire), qui peut s'étendre au tissu osseux (péri-implantite). Les systèmes implantaires développant de plus en plus des solutions transvissées avec collage d'un élément céramique sur un Ti-base, ce problème peut s'avérer inquiétant d'un point de vue épidémiologique. Il n'y a pour l'instant pas d'étude montrant un lien de causalité entre ce joint de colle contaminé et la présence de maladie péri-implantaire, mais en tant qu'élément favorisant la croissance bactérienne, il peut s'avérer être un facteur de risque indirect des MPIs (Jepsen et al. 2015).

De toute façon, le JTBI doit être poli au maximum par le laboratoire de prothèse car il existe un lien entre la rugosité de surface et la croissance bactérienne : plus la surface est lisse et moins les bactéries adhèrent et se développent (Subramani et al. 2009). Elles sont également moins adhérentes à la zircone ou au titane qu'à la résine (Lee, Jung, et al. 2011). Ce joint doit être ainsi le plus fin possible.

La présence importante de bactéries sur la partie en zircone juste après le joint de collage peut être liée à un état de surface plus rugueux (Yu et al. 2016), cette zone étant moins accessible aux fraises d'usinage. Il s'agit de la polir scrupuleusement avant de coller le Ti-base.

Il n'y a pas de bactéries le long de la vis et sur le bouchon de téflon, ce qui témoigne de l'étanchéité des assemblages ainsi que du puits de vissage, dans les conditions testées. Le joint de colle présente parfois un mauvais état de surface qui peut être lié au protocole expérimental (préparation HMDS) qui l'endommage, d'où l'utilisation de la lyophilisation dans la suite des manipulations. Dans tous les cas, le joint de collage s'avère étanche en profondeur sur la période de 30 jours.

La manipulation est menée de façon statique, et sur un mois seulement. Des études dynamiques à plus long terme (forces régulières appliquées sur la couronne) permettraient d'ouvrir le joint (avec ou sans gel) afin de voir le trajet des bactéries dans la connectique.

Pour un échantillon contaminé du groupe 2 (ech1(G2)), les bactéries sont retrouvées dans le JTBI (**figures 65 et 66**), réparties dans toute la connectique. De plus, la vis (**figure 67**) et la boulette de téflon (**figure 68**) sont contaminées, ce qui montre que les bactéries remontent bien le long de la vis par le JTBI pour contaminer les espaces internes avec un torque à 35 N.cm et en statique. Les coupes d'implant 'contaminé' et 'non contaminé' viennent confirmer que lors d'une contamination, il existe bien un cheminement bactérien dans le JTBI (**figure 69**). Le téflon agit ainsi comme un véritable réservoir dans lequel les bactéries peuvent proliférer.

Les échantillons avec gel (Groupe 4) restent stériles à 30 jours. La présence des bactéries est plus développée sur le rebord implantaire (**figure 70**) et sur les parties plus rugueuses de la couronne (**figure 71**). Il n'y a pas de bactéries dans la connectique (**figure 72, g-h**), sur la vis (**figure 72**) ou sur la boulette de téflon (**figure 73**).

Les surfaces exposées du gel à l'extérieur présentent parfois des tapis bactériens, suggérant que les propriétés antibactériennes du gel s'estompent avec le temps face à un renouvellement constant de bactéries.

Lorsque les bactéries colonisent la connectique, leur quantité est initialement assez faible contrairement à la surface de la couronne. Le gel pourrait ainsi agir efficacement car le *ratio* quantité de gel/nombre de colonies bactériennes est en faveur du gel. Il existe d'ailleurs un front de bactéries assez caractéristique qui s'arrête exactement au niveau du gel, même 30 jours après sa mise en place (**figure 70**).

Les échantillons vissés sans gel (Groupe 1), lorsqu'ils sont contaminés, montrent la présence de vastes colonies, surtout concentrées sur le plateau du Ti-base (**figure 74**), mais aussi sur tout le pourtour du Ti-base, même en l'absence de contamination interne (**figure 75**). Ce développement bactérien est inquiétant d'un point de vue clinique, car ce pilier est en regard des tissus mous.

La mise en place d'un gel dans les deux *microgaps* permettrait de limiter cette croissance bactérienne. Les manipulations en cours (Groupe 3 : vissé avec gel) permettront vraisemblablement de confirmer la nécessité d'obturer ce hiatus grâce à l'absence de bactéries dans les connectiques avec gel.

Dans une revue de littérature, Bumgardner et coll. évoque les différentes stratégies de biomatériaux mises en œuvre pour la prévention des MPIs (Bumgardner et al. 2011). Certaines pourraient alors être développées pour rendre les surfaces externes des pièces implantaires antibactériennes : revêtement d'ions (Ca⁺, N⁺, F⁺, Ag⁺), nanostructure à base de ZnO, gel relarguant un agent antimicrobien ou polymère antibactérien comme le chitosan. Un peptide relié à un antibiotique, et clivable en présence d'une réaction inflammatoire a même été développé : le peptide relargue l'antibiotique en présence de l'exsudat inflammatoire des bactéries (Suzuki et al. 1998). Toutefois, l'agent antibactérien, parfois retenu dans le polymère, peut présenter une baisse d'activité antimicrobienne. (Woo, Mittelman, and Santerre 2000). De plus, toutes ces solutions ont un potentiel limité sur le long terme (Norowski and Bumgardner 2009). L'intérêt d'un gel est de pouvoir être remplacé, tout en présentant des activités similaires.

VI. Introduction au poster II

Ce poster (non présenté) expose une des prémanipulations avec les boîtes qui évalue une vis de cicatrisation dans l'implant, et un assemblage du Groupe 1 (vissé sans gel). La vis est restée stérile sur un mois, tandis que l'assemblage a été contaminé en 15 jours. Les vues de MEB permettent de confirmer la présence (ou l'absence) des bactéries dans les *microgaps*.

Poster II

Evaluation de la colonisation bactérienne dans la connectique pilier – implant : étude préliminaire *in vitro*



S. Baixe^{1,2}, M. Mateescu^{1,2}, L. Jerry¹, E. Mathieu^{1,2}, S. Hellé^{1,2}, Y. Haikel^{1,2}, M. H. Metz-Boutigue^{1,2}, P. Schaaf^{1,2,3}, P. Lavalle^{1,2}, O. Etienne^{1,2}

1. Faculté d'Odontologie – STRASBOURG
 2. INSERM UMR 1121 – Biomatériaux et Bioingénierie – STRASBOURG
 3. Institut Charles Sadron – CNRS – STRASBOURG





Les connexions prothèse-implant sont constituées d'espaces vides colonisés par les bactéries de la plaque dentaire. Ces dernières peuvent diffuser dans les tissus biologiques environnants, et donner lieu à une maladie péri-implantaire (mucoite ou péri-implantite). L'objet de cette étude préliminaire est d'évaluer la pénétration bactérienne au sein de ces assemblages.



Assemblage implant-couronne FCZ.
 Un premier pilier en titane est assemblé à l'implant. La couronne transvisée en zirconium repose dessus. L'ensemble est maintenu par une vis unique.

MATERIEL ET METHODES

Sur l'implant 1 est mis en place un pilier de cicatrisation plein.
 Sur l'implant 2 est vissé une couronne transvisée type FCZ (Nobel Biocare). Son puits de vissage est obturé (téflon puis composite).

Une boîte en téflon est usinée en 3 compartiments étanches.

2 implants (Nobel Biocare) sont coupés à leur base jusqu'à la chambre implantaire.

Vissage + collages de chacun des 2 implants entre les compartiments

Des milieux de culture LB sont mis dans chacun des 3 compartiments. Le milieu du compartiment A est contaminé avec *E. Coli*, puis changé tous les 2 jours jusqu'à obtenir une turbidité des milieux B ou C.

Milieux LB stériles à T0

Compartiment C contaminé à + 21 jours

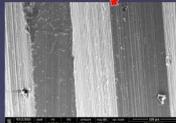
MEB

Les assemblages sont ensuite séchés, démontés, fixés et évalués au MEB

RESULTATS



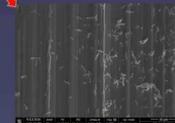
Vis



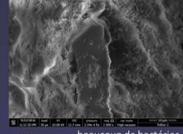
Filetage de la vis



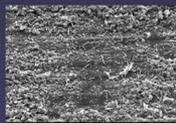
corps de la vis



tête de la vis



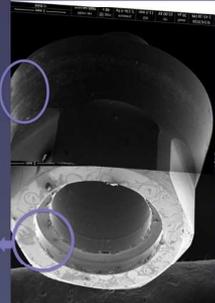
Téflon beaucoup de bactéries



Pilier implantaire



Frontière entre la partie du pilier exposée au milieu contaminé et la partie insérée dans l'implant (non contaminée)



Zones peu contaminées

A 21 jours, le milieu C est contaminé par les bactéries. Une fois les pièces désassemblées, les bactéries sont visibles. Elles sont beaucoup plus présentes sur la connectique couronne/pilier que sur la connectique pilier/implant.

Le milieu B correspondant au pilier de cicatrisation n'est pas contaminé. Il n'existe pas de bactéries visibles sur la connectique.

DISCUSSION

La connectique pilier de cicatrisation/implant est étanche à 21 jours. La connectique prothèse/implant est essentiellement contaminée entre la couronne et le pilier. Les bactéries cheminent par la suite vers le téflon recouvrant la vis, puis le long de la vis. Ces pièces assemblées agissent véritables réservoirs microbiens vis à vis des tissus vivants environnants.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ces essais peuvent être reproduits, de façon statique et dynamique, en introduisant des gels anti-microbiens entre les pièces afin de retarder, voire empêcher la contamination des connectiques. Les gels à base d'alginate catéchol sont des candidats prometteurs à cet usage. L'étanchéité du puits de vissage nécessite aussi d'être évaluée en testant différents matériaux et différents modes d'assemblage.

REFERENCES

Mateescu et al. Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0145143.

Dibart S et al. In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005 Sep-Oct;20(5):732-7.

Jansen et al. Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997 Jul-Aug;12(4):527-40.

Partie V :
Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

Les maladies péri-implantaires sont des pathologies d'actualité, touchant entre 10% et 20% des implants posés dans le monde. Elles sont directement liées aux bactéries contenues dans la plaque dentaire, organisées en biofilm, et qui infiltrent les surfaces implantaires pour ensuite détruire l'os péri-implantaire sous-jacent. La prévention passant par une hygiène buccodentaire adaptée, et la gestion des facteurs de risque modifiables est un prérequis qui diminue le risque de développer ou d'aggraver une maladie péri-implantaire. Lorsque la péri-implantite est installée, de nombreux traitements sont proposés, visant à éliminer de façon mécanique la plaque dentaire et à reconstruire les tissus endommagés si nécessaire par de la chirurgie. Afin d'améliorer l'efficacité des traitements, une antibiothérapie est administrée le plus souvent par voie orale. Le traitement de référence est une combinaison d'amoxicilline associée à du métronidazole, qui améliore l'efficacité du traitement mécanique, en ciblant principalement *P. gingivalis*, une bactérie à Gram négatif parodontopathogène. Celle-ci est particulièrement impliquée dans les maladies parodontales et les péri-implantites à cause de son facteur de virulence, le lipopolysaccharide (LPS). S'il n'y a pas encore de consensus précis vis-à-vis de l'antibiothérapie, il est important de constater le nombre croissant d'allergies, d'intolérances ou de résistances bactériennes face aux antibiotiques, ce qui pousse à limiter leur utilisation et à les prendre sur une courte durée. Il existe toutefois des échecs dans la prise en charge des péri-implantites, la décontamination attendue n'étant certainement pas à la hauteur des moyens thérapeutiques mis en œuvre. En particulier, l'ensemble de ces traitements ne prend pas en considération la décontamination de la connectique, ce qui est inquiétant compte tenu de sa proximité avec les tissus atteints et de son rôle de réservoir bactérien.

La première partie de ce travail de thèse a consisté à établir une revue de littérature sur le degré de précision de la connectique implantaire et des possibilités de contamination bactérienne. Résumée dans un premier article indexé, elle explique les façons d'évaluer les dimensions du hiatus et sa colonisation bactérienne, ses relations avec les tissus vivants et les possibilités de désinfection de la connectique. Les résultats de notre investigation ont montré qu'il existe un espace entre l'implant et le pilier ou le Ti-base de la prothèse vissée par-dessus (*microgap*). L'importance de ce hiatus est liée à l'imprécision des pièces prothétiques : il est estimé en moyenne à 5 µm, mais il existe de grandes variations dans les études allant jusqu'à 50 µm. Il est plus large à l'extérieur du joint Ti-base/implant et se réduit vers l'intérieur. Dans des conditions physiologiques, le *microgap* s'ouvre et se ferme en fonction des forces qui s'appliquent sur la couronne supraimplantaire (jusqu'à 64 µm) (Zipprich et al. 2007), créant un mouvement de pompage des bactéries qui peuvent circuler vers l'intérieur de la connectique. Les autres espaces vides

intra-implantaires (chambre implantaire sous le pas de vis, espace vacant au-dessus de la tête de vis) constituent de véritables réservoirs bactériens, situés à proximité des tissus péri-implantaires fragiles. Quelques études ont évalué l'efficacité de gels colloïdaux injectés dans la connectique, mais leur efficacité clinique n'est valable que sur une courte période (3 mois).

Dans ce contexte, nous avons cherché à développer un hydrogel qui puisse être injecté dans la connectique pour faire tout d'abord office de barrière physique contre les bactéries. Les hydrogels récemment développés en médecine ont attiré notre attention : ils possèdent une matrice tridimensionnelle qui leur confère une résistance accrue vis-à-vis de la dégradation par rapport aux suspensions colloïdales. Constitués principalement d'eau, leur viscoélasticité leur permet une déformation en relation avec l'application souhaitée.

Nous avons retenu l'alginate-catéchol (AC) dans ce travail de thèse : inspiré du système d'adhésion de la moule marine sous forme de poly(DOPA), cet hydrogel s'est avéré adhérent sur les oxydes métalliques (titane et acier inox) ainsi que sur les tissus mous (gencive de porc) dans nos tests de rhéologie. Injecté dans une connectique, il peut coller aux pièces implantaires et au tissu conjonctif environnant (pour les excès), créant un obstacle pour le développement du biofilm bactérien. De plus, en l'associant à de l'acide pluronique bisSH dans la première partie de la thèse, nous avons pu renforcer ses propriétés mécaniques. Nous pourrions encore tester son potentiel adhésif sur la zircone, oxyde métallique qui est un matériau répandu en implantologie pour la reconstruction des suprastructures prothétiques.

L'intérêt d'un hydrogel par rapport à une colle biologique, et en particulier pour l'AC, est de pouvoir se déformer en traction et compression au gré des mouvements physiologiques de la couronne supraimplantaire ou du pilier dans l'implant, tout en restant collé aux parois de la connectique, et cela en milieu humide. Dans ce travail de thèse, les propriétés adhésives démontrées au rhéomètre sont comprises entre 1 et 10 J.m⁻², ce qui est largement suffisant pour l'application que nous souhaitons.

Le gel a une structure chimique qui se stabilise dans les 24 premières heures. Il perd légèrement ses propriétés adhésives s'il est sollicité une deuxième fois (*tacking test*). Cliniquement, il serait important d'injecter le gel une seule fois dans la connectique avant de mettre en place définitivement le pilier ou la couronne transviscée pour bénéficier du maximum de son potentiel adhésif. En clinique, le gel serait présent en milieu humide mais confiné dans la connectique, exposé au « lavage » salivaire seulement à sa surface. Dans notre travail, nous avons démontré sa stabilité en milieu aqueux (PBS) sur un mois, et l'expérience pourrait être renouvelée dans de la salive artificielle.

La cinétique de gélification de ces gels est très rapide (moins d'une minute), ce qui est largement compatible avec un usage clinique. L'idéal serait de mettre en place les produits dans une seringue avec embout automélangeur afin de simplifier sa manipulation. Le gel n'est pas soluble à des températures « physiologiques » (de 25 à 50°C), et reste ainsi compatible avec la prise de boissons chaudes.

Préalablement aux tests antimicrobiens, nos études de biocompatibilité ont montré l'absence de cytotoxicité du gel vis-à-vis de fibroblastes humains. Une confirmation de ces premiers résultats vis-à-vis de kératinocytes (présents dans l'épithélium de jonction péri-implantaire) serait complémentaire. L'étape suivante de nos tests de biocompatibilité consisterait à les essayer chez l'animal dans un modèle type *minipig*, voire directement chez l'homme.

Les peptides antimicrobiens (PAMs) de la défense immunitaire de l'hôte sont une alternative aux antibiotiques à cause de leurs nombreux effets indésirables. Nous avons choisi d'incorporer la CTL comme agent antimicrobien : ce PAM d'origine naturelle ne présente pas de résistance bactérienne. Il agit sur certaines levures responsables de candidoses buccales (*C. albicans*) (Dartevelle et al. 2018) et contre de nombreuses bactéries buccales parodontopathogènes (*F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*) (Zaet et al. 2017). La configuration énantiomérique dextrogyre de ses acides aminés (D-CTL) lui permet, selon les souches bactériennes, d'être entre 1,7 et 17,9 fois plus efficace qu'avec leur configuration naturelle lévogyre (L-CTL) (Zaet et al. 2017). Il améliore la qualité et la spécificité de la liaison protéique, apportant ainsi une demi-vie plasmatique plus élevée que la configuration (L), et une meilleure résistance à la protéolyse enzymatique (Liu et al. 2016). De plus, ce peptide est biocompatible et présente un faible coût de production par rapport à d'autres PAMs comme la LL-37 (Oudhoff et al. 2010; Dartevelle et al. 2018).

Dans nos manipulations, nous avons trouvé des CMI de CTL dans le gel de 500 µM (L-CTL) et 250 µM (D-CTL) vis-à-vis de *P. gingivalis*. Ces valeurs sont 10 à 50 fois supérieures aux CMI de la CTL en milieu liquide (Zaet et al. 2017). Selon nos estimations, environ 1 à 10 % de CTL est relarguée initialement par le gel, ce que confirme notre évaluation par fluorimétrie. En revanche, le peptide relargué dès 24 heures semble dégradé d'après notre analyse à l'HPLC combinée à la spectrométrie de masse : nous retrouvons moins de peptide qu'introduit initialement, mais les fragments récupérés conservent le domaine responsable de l'activité antibactérienne (LSFR), ce qui expliquerait la persistance de leur activité.

Les résultats de rhéologie montrent des valeurs du module de conservation plus élevées dans la cinétique de gélification avec D-CTL que sans D-CTL. Le peptide semble donc contribuer aux propriétés mécaniques du gel. La contamination de la surface du gel chargé en D-CTL ou en amoxicilline survient

après 48 heures de contact avec un milieu contaminé par *P. gingivalis*. Des manipulations menées sur une durée plus longue permettraient de savoir si le gel reste recouvert d'un tapis bactérien, ou s'il est contaminé en profondeur. Le potentiel bactéricide du D-CTL inclus dans le gel pourrait ainsi être mis en évidence. Une étude préliminaire dans la thèse a combiné l'amoxicilline à la D-CTL. En effet, Zaet et coll. ont montré que ces agents agissent de façon synergique sur les bactéries en milieu liquide, et que D-CTL permet de diminuer la CMI de l'amoxicilline.

Enfin, les articles référencés dans notre revue de littérature (voir annexe) nous ont permis de faire le point sur les différentes méthodes *in vitro* évaluant la colonisation bactérienne à travers les connectiques. Les techniques de contamination de la chambre interne vers l'extérieur sont simples à mettre en place, mais il existe un risque élevé de colonisation du milieu externe lors des manipulations (faux-positifs). Les méthodes évaluant la colonisation interne ne permettent pas de savoir au bout de combien de temps la connectique est contaminée. S'inspirant de ces nombreux protocoles, l'originalité de notre étude a été de couper la partie apicale des implants et de les coller à travers un mur étanche séparant deux compartiments : un stérile (partie apicale de l'implant) et un contaminé (partie coronaire de l'implant). En obturant hermétiquement le puits de vissage, seule la connectique est évaluée, avec ou sans gel antibactérien sur 30 jours, et en vissant ou collant la couronne sur une base en titane (Ti-base). D'après nos premiers résultats, il n'y a pas de contamination dans les assemblages avec gel dans la connectique implantaire (couronne collée). Les bactéries sont retrouvées sur les zones rugueuses de la couronne (zircone et joint de colle couronne/implant), ainsi que dans les connectiques contaminées (Ti-base/implant et Ti-base/couronne vissées). Que le système soit vissé ou collé, les connectiques sont perméables aux bactéries dans de nombreux échantillons.

Ces manipulations devront être reproduites afin de tirer des conclusions significatives du point de vue statistique. De plus, l'étape suivante consisterait à utiliser une machine simulant les forces occlusales appliquées sur la couronne afin d'ouvrir et de fermer le joint pilier/implant, comme cela se produit en conditions cliniques. Pour l'instant, nous n'avons pas ce type d'appareillage au sein du laboratoire et notre travail de thèse s'inscrit comme une première approche statique de la colonisation bactérienne, ralentie ou bloquée grâce aux gels adhésifs et antibactériens. La situation idéale serait de les utiliser directement chez l'homme en prévention des péri-implantites, et de suivre la survenue des MPIs chez les patients avec gel.

Une stratégie complémentaire serait de faire appel à des matériaux prothétiques bénéficiant d'un revêtement antibactérien. Ces derniers pourraient interagir avec les hydrogels de façon chimique et biologique par synergie.

Les hydrogels à base d'AC et de D-CTL s'avèrent donc prometteurs pour la prévention des maladies péri-implantaires. Leurs propriétés physicochimiques constituent une barrière mécanique vis-à-vis des bactéries dans la connectique implantaire. Ils bénéficieraient pleinement de l'incorporation de PAMs en leur sein. En tant qu'alternative aux antibiotiques, la D-CTL agit comme un agent antibactérien efficace contre *P. gingivalis*. Ces gels bioactifs s'inscrivent ainsi dans une approche globale de la prévention et prise en charge des péri-implantites, faisant appel à des traitements mécaniques, antibiotiques par voie générale des traitements locaux, l'un ne pouvant remplacer l'autre. L'association de ces traitements potentialise les résultats, et pourrait faire diminuer l'importance de chacun d'entre eux.

PARTIE VI :
Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aardal, S., and K. B. Helle. 1992. 'The vasoinhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels', *Regul Pept*, 41: 9-18.
- Abdelhamed, M. I., J. D. Galley, M. T. Bailey, W. M. Johnston, J. Holloway, E. McGlumphy, and B. Leblebicioglu. 2015. 'A Comparison of Zirconia and Titanium Abutments for Microleakage', *Clin Implant Dent Relat Res*.
- Aberg, C. H., P. Kelk, and A. Johansson. 2015. 'Aggregatibacter actinomycetemcomitans: virulence of its leukotoxin and association with aggressive periodontitis', *Virulence*, 6: 188-95.
- Ahsan, S. M., M. Thomas, K. K. Reddy, S. G. Sooraparaju, A. Asthana, and I. Bhatnagar. 2018. 'Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering', *International Journal of Biological Macromolecules*, 110: 97-109.
- Akaddar, A., C. Doderer-Lang, M. R. Marzahn, F. Delalande, M. Mousli, K. Helle, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, B. M. Dunn, M. H. Metz-Boutigue, and E. Candolfi. 2010. 'Catestatin, an endogenous chromogranin A-derived peptide, inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum', *Cell Mol Life Sci*, 67: 1005-15.
- Albandar, J. M., J. A. Brunelle, and A. Kingman. 1999. 'Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994', *J Periodontol*, 70: 13-29.
- Angeletti, R. H., T. D'Amico, and J. Russell. 2000. 'Regulation of parathyroid secretion. Chromogranins, chemokines, and calcium', *Adv Exp Med Biol*, 482: 217-23.
- Aslam, R., M. Atindehou, T. Lavaux, Y. Haikel, F. Schneider, and M. H. Metz-Boutigue. 2012. 'Chromogranin A-derived peptides are involved in innate immunity', *Curr Med Chem*, 19: 4115-23.
- Aslam, R., C. Marban, C. Corazzol, F. Jehl, F. Delalande, A. Van Dorsselaer, G. Prevost, Y. Haikel, C. Taddei, F. Schneider, and M. H. Metz-Boutigue. 2013. 'Cateslytin, a chromogranin A derived peptide is active against Staphylococcus aureus and resistant to degradation by its proteases', *PLoS One*, 8: e68993.
- Assem, N. Z., M. L. F. Alves, A. B. Lopes, E. C. Junior Gualberto, V. G. Garcia, and L. H. Theodoro. 2017. 'Antibiotic therapy as an adjunct to scaling and root planing in smokers: a systematic review and meta-analysis', *Braz Oral Res*, 31: e67.
- Baggi, L., M. Di Girolamo, C. Mirisola, and R. Calcaterra. 2013. 'Microbiological evaluation of bacterial and mycotic seal in implant systems with different implant-abutment interfaces and closing torque values', *Implant Dent*, 22: 344-50.
- Baixé, S., G. Fauxpoint, Y. Arntz, and O. Etienne. 2010. 'Microgap between zirconia abutments and titanium implants', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 25: 455-60.
- Baixé, S., H. Tenenbaum, and O. Etienne. 2016. '[Microbial contamination of the implant-abutment connections: Review of the literature]', *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*, 117: 20-5.

- Bauer, S. H., X. Y. Zhang, W. Van Dongen, M. Claeys, and M. Przybylski. 1999. 'Chromogranin A from bovine adrenal medulla: molecular characterization of glycosylations, phosphorylations, and sequence heterogeneities by mass spectrometry', *Anal Biochem*, 274: 69-80.
- Benedum, U. M., A. Lamouroux, D. S. Konecki, P. Rosa, A. Hille, P. A. Baeuerle, R. Frank, F. Lottspeich, J. Mallet, and W. B. Huttner. 1987. 'The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region', *Embo j*, 6: 1203-11.
- Benjdia, A., A. Guillot, P. Ruffie, J. Leprince, and O. Berteau. 2017. 'Post-translational modification of ribosomally synthesized peptides by a radical SAM epimerase in *Bacillus subtilis*', *Nat Chem*, 9: 698-707.
- Berglundh, T., G. Armitage, M. G. Araujo, G. Avila-Ortiz, J. Blanco, P. M. Camargo, S. Chen, D. Cochran, J. Derks, E. Figuero, C. H. F. Hammerle, L. J. A. Heitz-Mayfield, G. Huynh-Ba, V. Iacono, K. T. Koo, F. Lambert, L. McCauley, M. Quirynen, S. Renvert, G. E. Salvi, F. Schwarz, D. Tarnow, C. Tomasi, H. L. Wang, and N. Zitzmann. 2018. 'Peri-implant diseases and conditions: Consensus report of workgroup 4 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions', *J Periodontol*, 89 Suppl 1: S313-s18.
- Bhowmick, S., S. Mohanty, and V. Koul. 2016. 'Fabrication of transparent quaternized PVA/silver nanocomposite hydrogel and its evaluation as an antimicrobial patch for wound care systems', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27: 160.
- Biswas, N., J. L. Rodriguez-Flores, M. Courel, J. R. Gayen, S. M. Vaingankar, M. Mahata, J. W. Torpey, L. Taupenot, D. T. O'Connor, and S. K. Mahata. 2009. 'Cathepsin L colocalizes with chromogranin a in chromaffin vesicles to generate active peptides', *Endocrinology*, 150: 3547-57.
- Borghetti, A., and V. Monnet-Corti. 2017. *Chirurgie plastique parodontale et pér-implantaire - 3e édition*.
- Bosshardt, D. D., V. Chappuis, and D. Buser. 2017. 'Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions', *Periodontol 2000*, 73: 22-40.
- Brandl, F., F. Kastner, R. M. Gschwind, T. Blunk, J. Tessmar, and A. Gopferich. 2010. 'Hydrogel-based drug delivery systems: comparison of drug diffusivity and release kinetics', *J Control Release*, 142: 221-8.
- Briolat, J., S. D. Wu, S. K. Mahata, B. Gonthier, D. Bagnard, S. Chasserot-Golaz, K. B. Helle, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2005. 'New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A', *Cell Mol Life Sci*, 62: 377-85.
- Broedbaek, K., and L. Hilsted. 2016. 'Chromogranin A as biomarker in diabetes', *Biomark Med*, 10: 1181-89.
- Brown, A. N., K. Smith, T. A. Samuels, J. Lu, S. O. Obare, and M. E. Scott. 2012. 'Nanoparticles functionalized with ampicillin destroy multiple-antibiotic-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter aerogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 2768-74.
- Brubaker, C. E., H. Kissler, L. J. Wang, D. B. Kaufman, and P. B. Messersmith. 2010. 'Biological performance of mussel-inspired adhesive in extrahepatic islet transplantation', *Biomaterials*, 31: 420-7.

- Brunot-Gohin, C., J. L. Duval, S. Verbeke, K. Belanger, I. Pezron, G. Kugel, D. Laurent-Maquin, S. Gangloff, and C. Egles. 2016. 'Biocompatibility study of lithium disilicate and zirconium oxide ceramics for esthetic dental abutments', *J Periodontal Implant Sci*, 46: 362-71.
- Bumgardner, J. D., P. Adatrow, W. O. Haggard, and P. A. Norowski. 2011. 'Emerging antibacterial biomaterial strategies for the prevention of peri-implant inflammatory diseases', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 26: 553-60.
- Cabane, B, and S Hénon. 2003. 'Liquides, Solutions, Dispersions, Emulsions et gels.' in Belin (ed.).
- Cado, G., R. Aslam, L. Séon, T. Garnier, R. Fabre, A. Parat, A. Chassepot, J.C Voegel, B. Senger, F. Schneider, Y. Frère, L. Jierry, P. Schaaf, H. Kerdjoudj, M. H. Metz-Boutigue, and F. Boulmedais. 2013. 'Self-Defensive Biomaterial Coating Against Bacteria and Yeasts: Polysaccharide Multilayer Film with Embedded Antimicrobial Peptide.', *Advanced Functional Materials*, 23: 4801-09.
- 'CADTH Rapid Response Reports.' in. 2016. *Dental Scaling and Root Planing for Periodontal Health: A Review of the Clinical Effectiveness, Cost-effectiveness, and Guidelines* (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health
- Copyright (c) 2016 Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health.: Ottawa (ON)).
- Campos, D. M., B. Toury, M. D'Almeida, G. N. Attik, A. Ferrand, P. Renoud, and B. Grosogeat. 2015. 'Acidic pH resistance of grafted chitosan on dental implant', *Odontology*, 103: 210-7.
- Cavalieri, F., M. Tortora, A. Stringaro, M. Colone, and L. Baldassarri. 2014. 'Nanomedicines for antimicrobial interventions', *Journal of Hospital Infection*, 88: 183-90.
- Chae, J. J., D. G. Mulreany, Q. Guo, Q. Lu, J. S. Choi, I. Strehin, F. A. Espinoza, O. Schein, M. M. Trexler, K. S. Bower, and J. H. Elisseeff. 2014. 'Application of a collagen-based membrane and chondroitin sulfate-based hydrogel adhesive for the potential repair of severe ocular surface injuries', *Mil Med*, 179: 686-94.
- Chalas, R., I. Wojcik-Checincka, M. J. Wozniak, J. Grzonka, W. Swieszkowski, and K. J. Kurzydowski. 2015. '[Dental plaque as a biofilm - a risk in oral cavity and methods to prevent]', *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 69: 1140-8.
- Chan, Y. R., and R. L. Gallo. 1998. 'PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas)', *J Biol Chem*, 273: 28978-85.
- Chen, Y. W., J. Moussi, J. L. Drury, and J. C. Wataha. 2016. 'Zirconia in biomedical applications', *Expert Rev Med Devices*, 13: 945-63.
- Chertov, O., D. F. Michiel, L. Xu, J. M. Wang, K. Tani, W. J. Murphy, D. L. Longo, D. D. Taub, and J. J. Oppenheim. 1996. 'Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils', *J Biol Chem*, 271: 2935-40.
- Ciantar, M. 2014. 'Time to shift: from scaling and root planing to root surface debridement', *Prim Dent J*, 3: 38-42.
- Corti, A., and E. Ferrero. 2012. 'Chromogranin A and the endothelial barrier function', *Curr Med Chem*, 19: 4051-8.
- Couarraze, G., and J.L. Grossiord. 1991. *Initiation à la rhéologie* (Lavoisier. Tec et Doc.: Paris).

- Cunliffe, R. N., and Y. R. Mahida. 2004. 'Expression and regulation of antimicrobial peptides in the gastrointestinal tract', *J Leukoc Biol*, 75: 49-58.
- D'Almeida, M., N. Attik, J. Amalric, C. Brunon, F. Renaud, H. Abouelleil, B. Toury, and B. Grosogeat. 2017. 'Chitosan coating as an antibacterial surface for biomedical applications', *PLoS One*, 12: e0189537.
- Da Rocha, H. A., C. F. Silva, F. L. Santiago, L. G. Martins, P. C. Dias, and D. De Magalhaes. 2015. 'Local Drug Delivery Systems in the Treatment of Periodontitis: A Literature Review', *J Int Acad Periodontol*, 17: 82-90.
- Danner, E. W., Y. Kan, M. U. Hammer, J. N. Israelachvili, and J. H. Waite. 2012. 'Adhesion of mussel foot protein Mefp-5 to mica: an underwater superglue', *Biochemistry*, 51: 6511-8.
- Dartevelle, P., C. Ehlinger, A. Zaet, C. Boehler, M. Rabineau, B. Westermann, J. M. Strub, S. Cianferani, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue, and C. Marban. 2018. 'D-Cateslytin: a new antifungal agent for the treatment of oral *Candida albicans* associated infections', *Scientific Reports*, 8: 9235.
- Davarpanah, M., S. Szmukler-Moncler, P.M. Khoury, B. Jakubowicz-Kohen, and H. Martinez. 2009. *Manuel d'implantologie clinique. Concepts, protocoles et innovations récentes. 2e édition.*
- Davidson, D. J., A. J. Currie, G. S. Reid, D. M. Bowdish, K. L. MacDonald, R. C. Ma, R. E. Hancock, and D. P. Speert. 2004. 'The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization', *J Immunol*, 172: 1146-56.
- De Giglio, E., S. Cometa, M. A. Ricci, D. Cafagna, A. M. Savino, L. Sabbatini, M. Orciani, E. Ceci, L. Novello, G. M. Tantillo, and M. Mattioli-Belmonte. 2011. 'Ciprofloxacin-modified electrosynthesized hydrogel coatings to prevent titanium-implant-associated infections', *Acta Biomaterialia*, 7: 882-91.
- Diamond, G., N. Beckloff, A. Weinberg, and K. O. Kisich. 2009. 'The roles of antimicrobial peptides in innate host defense', *Curr Pharm Des*, 15: 2377-92.
- Dias, E. C., E. D. Bisognin, N. D. Harari, S. J. Machado, C. P. da Silva, G. D. Soares, and G. M. Vidigal, Jr. 2012. 'Evaluation of implant-abutment microgap and bacterial leakage in five external-hex implant systems: an in vitro study', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 27: 346-51.
- do Nascimento, C., P. K. Miani, V. Pedrazzi, K. Muller, and R. F. de Albuquerque, Jr. 2012. 'Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses', *Clin Oral Implants Res*, 23: 1168-72.
- do Nascimento, C., P. K. Miani, E. Watanabe, V. Pedrazzi, and R. F. de Albuquerque, Jr. 2011. 'In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of an external-hex implant after saliva incubation', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 26: 782-7.
- do Nascimento, C., V. Pedrazzi, P. K. Miani, L. D. Moreira, and R. F. de Albuquerque, Jr. 2009. 'Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface', *Clin Oral Implants Res*, 20: 1394-7.
- Dorati, R., A. De Trizio, I. Genta, A. Merelli, T. Modena, and B. Conti. 2017. 'Gentamicin-Loaded Thermosetting Hydrogel and Moldable Composite Scaffold: Formulation Study and Biologic Evaluation', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106: 1596-607.

- Dreyer, H., J. Grischke, C. Tiede, J. Eberhard, A. Schweitzer, S. E. Toikkanen, S. Glockner, G. Krause, and M. Stiesch. 2018. 'Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review', *Journal of Periodontal Research*, 53: 657-81.
- Duarte, A. R., P. H. Rossetti, L. M. Rossetti, S. A. Torres, and W. C. Bonachela. 2006. 'In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces', *J Periodontol*, 77: 1828-32.
- Dubos, R.J., and C. Cattaneo. 1939. 'Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus : preparation and activity of a protein-free fraction. ', *J Exp Med*, 70: 249-56.
- Dufourc, E. J., S. Buchoux, J. Toupe, M. A. Sani, F. Jean-Francois, L. Khemtemourian, A. Grelard, C. Loudet-Courreges, M. Laguerre, J. Elezgaray, B. Desbat, and B. Odaert. 2012. 'Membrane interacting peptides: from killers to helpers', *Curr Protein Pept Sci*, 13: 620-31.
- Egger, M., A. G. Beer, M. Theurl, W. Schgoer, B. Hotter, T. Tatarczyk, D. Vasiljevic, S. Frauscher, J. Marksteiner, J. R. Patsch, P. Schratzberger, A. M. Djanani, S. K. Mahata, and R. Kirchmair. 2008. 'Monocyte migration: a novel effect and signaling pathways of catestatin', *Eur J Pharmacol*, 598: 104-11.
- Elsbach, P. 2003. 'What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses?', *J Clin Invest*, 111: 1643-5.
- Ercan, E., B. C. Uzun, and G. Ustaoglu. 2015. 'Effects of azithromycin versus metronidazole-amoxicillin combination as an adjunct to nonsurgical periodontal therapy of generalized aggressive periodontitis', *Niger J Clin Pract*, 18: 506-10.
- Esposito, M., M. G. Grusovin, and H. V. Worthington. 2012. 'Treatment of peri-implantitis: what interventions are effective? A Cochrane systematic review', *Eur J Oral Implantol*, 5 Suppl: S21-41.
- Etienne, O., C. Gasnier, C. Taddei, J. C. Voegel, D. Aunis, P. Schaaf, M. H. Metz-Boutigue, A. L. Bolcato-Bellemin, and C. Egles. 2005. 'Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films', *Biomaterials*, 26: 6704-12.
- Etienne, O., C. Picart, C. Taddei, Y. Haikel, J. L. Dimarcq, P. Schaaf, J. C. Voegel, J. A. Ogier, and C. Egles. 2004. 'Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization', *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 3662-9.
- Etienne, O., C. Picart, C. Taddei, P. Keller, E. Hubsch, P. Schaaf, J. C. Voegel, Y. Haikel, J. A. Ogier, and C. Egles. 2006. 'Polyelectrolyte multilayer film coating and stability at the surfaces of oral prosthesis base polymers: an in vitro and in vivo study', *J Dent Res*, 85: 44-8.
- Fan, L., J. Yang, H. Wu, Z. Hu, J. Yi, J. Tong, and X. Zhu. 2015. 'Preparation and characterization of quaternary ammonium chitosan hydrogel with significant antibacterial activity', *International Journal of Biological Macromolecules*, 79: 830-6.
- Fasciotto, B. H., C. A. Trauss, G. H. Greeley, and D. V. Cohn. 1993. 'Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion', *Endocrinology*, 133: 461-6.
- Feng, J., X. A. Ton, S. Zhao, J. I. Paez, and A. Del Campo. 2017. 'Mechanically Reinforced Catechol-Containing Hydrogels with Improved Tissue Gluing Performance', *Biomimetics (Basel)*, 2.

- Feres, M. 2008. 'Antibiotics in the treatment of periodontal diseases: microbiological basis and clinical applications', *Ann R Australas Coll Dent Surg*, 19: 37-44.
- Fielding, G., and S. Bose. 2013. 'SiO₂ and ZnO dopants in three-dimensionally printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds enhance osteogenesis and angiogenesis in vivo', *Acta Biomaterialia*, 9: 9137-48.
- Figuro, E., F. Graziani, I. Sanz, D. Herrera, and M. Sanz. 2014. 'Management of peri-implant mucositis and peri-implantitis', *Periodontol 2000*, 66: 255-73.
- Fleming, A., and V.D. Allison. 1922. 'Observation on a bacteriolytic substance (« lysozyme ») found in secretions and tissues.', *Br J Exp Pathol*, 3: 252-60.
- Frohm, M., B. Agerberth, G. Ahangari, M. Stahle-Backdahl, S. Liden, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson. 1997. 'The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders', *J Biol Chem*, 272: 15258-63.
- Ghasemzadeh, H., and F. Ghanaat. 2014. 'Antimicrobial alginate/PVA silver nanocomposite hydrogel, synthesis and characterization', *J Polym Res*, 21: 355.
- Ghia, J. E., F. Crenner, M. H. Metz-Boutigue, D. Aunis, and F. Angel. 2004. 'The effect of a chromogranin A-derived peptide (CgA4-16) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats', *Life Sci*, 75: 1787-99.
- Ghobril, C., and M. W. Grinstaff. 2015. 'The chemistry and engineering of polymeric hydrogel adhesives for wound closure: a tutorial', *Chemical Society Reviews*, 44: 1820-35.
- Giltrap, A. M., L. J. Dowman, G. Nagalingam, J. L. Ochoa, R. G. Linington, W. J. Britton, and R. J. Payne. 2016. 'Total Synthesis of Teixobactin', *Organic Letters*, 18: 2788-91.
- Giovannoli, J. L., and S. Renvert. 2012. *Péri-implantites*.
- Giri, T. K., D. Thakur, A. Alexander, Ajazuddin, H. Badwaik, and D. K. Tripathi. 2012. 'Alginate based hydrogel as a potential biopolymeric carrier for drug delivery and cell delivery systems: present status and applications', *Curr Drug Deliv*, 9: 539-55.
- Gulrez, S., S. Al-Assaf, and G. O. Philips. 2011. 'Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications.' in, *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications*.
- Guo, X., C. Zhou, and N. Sun. 2011. 'The neuropeptide catestatin promotes vascular smooth muscle cell proliferation through the Ca²⁺-calcineurin-NFAT signaling pathway', *Biochem Biophys Res Commun*, 407: 807-12.
- Gupta, H., M. Aqil, R. K. Khar, A. Ali, A. Bhatnagar, and G. Mittal. 2015. 'An alternative in situ gel-formulation of levofloxacin eye drops for prolong ocular retention', *J Pharm Bioallied Sci*, 7: 9-14.
- Haffajee, A. D., S. S. Socransky, M. R. Patel, and X. Song. 2008. 'Microbial complexes in supragingival plaque', *Oral Microbiol Immunol*, 23: 196-205.
- Hall, J., N. G. Pehrson, A. Ekestubbe, T. Jemt, and B. Friberg. 2015. 'A controlled, cross-sectional exploratory study on markers for the plasminogen system and inflammation in crevicular fluid samples from healthy, mucositis and peri-implantitis sites', *Eur J Oral Implantol*, 8: 153-66.

- Hancock, R. E. 2001. 'Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials', *Lancet Infect Dis*, 1: 156-64.
- Hancock, R. E., and G. Diamond. 2000. 'The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences', *Trends in Microbiology*, 8: 402-10.
- Hancock, R. E., and R. Lehrer. 1998. 'Cationic peptides: a new source of antibiotics', *Trends Biotechnol*, 16: 82-8.
- Hancock, R. E., and A. Rozek. 2002. 'Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides', *FEMS Microbiol Lett*, 206: 143-9.
- Hashem, M., S. Sharaf, M. M. Abd El-Hady, and A. Hebeish. 2013. 'Synthesis and characterization of novel carboxymethylcellulose hydrogels and carboxymethylcellulose-hydrogel-ZnO-nanocomposites', *Carbohydrate Polymers*, 95: 421-7.
- Hebeish, A., M. Hashem, M. M. El-Hady, and S. Sharaf. 2013. 'Development of CMC hydrogels loaded with silver nano-particles for medical applications', *Carbohydrate Polymers*, 92: 407-13.
- Heitz-Mayfield, L. J., G. E. Salvi, D. Botticelli, A. Mombelli, M. Faddy, and N. P. Lang. 2011. 'Anti-infective treatment of peri-implant mucositis: a randomised controlled clinical trial', *Clin Oral Implants Res*, 22: 237-41.
- Helle, K. B. 2004. 'The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects', *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79: 769-94.
- Hermann, J. S., D. Buser, R. K. Schenk, J. D. Schoolfield, and D. L. Cochran. 2001. 'Biologic Width around one- and two-piece titanium implants', *Clin Oral Implants Res*, 12: 559-71.
- Hetrick, E. M., and M. H. Schoenfisch. 2006. 'Reducing implant-related infections: active release strategies', *Chemical Society Reviews*, 35: 780-9.
- Hoq, M. I., F. Niyonsaba, H. Ushio, G. Aung, K. Okumura, and H. Ogawa. 2011. 'Human catesstatin enhances migration and proliferation of normal human epidermal keratinocytes', *J Dermatol Sci*, 64: 108-18.
- Jamil, B., and M. Imran. 2018. 'Factors pivotal for designing of nanoantimicrobials: an exposition', *Critical Reviews in Microbiology*, 44: 79-94.
- Jansen, V. K., G. Conrads, and E. J. Richter. 1997. 'Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12: 527-40.
- Jean-Francois, F., S. Castano, B. Desbat, B. Odaert, M. Roux, M. H. Metz-Boutigue, and E. J. Dufourc. 2008. 'Aggregation of cateslytin beta-sheets on negatively charged lipids promotes rigid membrane domains. A new mode of action for antimicrobial peptides?', *Biochemistry*, 47: 6394-402.
- Jean-Francois, F., L. Khemtémourian, B. Odaert, S. Castano, A. Grelard, C. Manigand, K. Bathany, M. H. Metz-Boutigue, and E. J. Dufourc. 2007. 'Variability in secondary structure of the antimicrobial peptide Cateslytin in powder, solution, DPC micelles and at the air-water interface', *Eur Biophys J*, 36: 1019-27.
- Jenssen, H., P. Hamill, and R. E. Hancock. 2006. 'Peptide antimicrobial agents', *Clin Microbiol Rev*, 19: 491-511.

- Jeon, O., K. H. Bouhadir, J. M. Mansour, and E. Alsberg. 2009. 'Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties', *Biomaterials*, 30: 2724-34.
- Jepsen, K., and S. Jepsen. 2016. 'Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis', *Periodontol 2000*, 71: 82-112.
- Jepsen, S., T. Berglundh, R. Genco, A. M. Aass, K. Demirel, J. Derks, E. Figuero, J. L. Giovannoli, M. Goldstein, F. Lambert, A. Ortiz-Vigon, I. Polyzois, G. E. Salvi, F. Schwarz, G. Serino, C. Tomasi, and N. U. Zitzmann. 2015. 'Primary prevention of peri-implantitis: managing peri-implant mucositis', *J Clin Periodontol*, 42 Suppl 16: S152-7.
- Kang, H. K., C. Kim, C. H. Seo, and Y. Park. 2017. 'The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review', *Journal of Microbiology*, 55: 1-12.
- Kang, S. M., I. You, W. K. Cho, H. K. Shon, T. G. Lee, I. S. Choi, J. M. Karp, and H. Lee. 2010. 'One-step modification of superhydrophobic surfaces by a mussel-inspired polymer coating', *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, 49: 9401-4.
- Kinane, D. F., P. G. Stathopoulou, and P. N. Papapanou. 2017. 'Periodontal diseases', *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17038.
- Kjeldsen, M., P. Holmstrup, and K. Bendtzen. 1993. 'Marginal periodontitis and cytokines: a review of the literature', *J Periodontol*, 64: 1013-22.
- Klaenhammer, T. R. 1988. 'Bacteriocins of lactic acid bacteria', *Biochimie*, 70: 337-49.
- Koczulla, R., G. von Degenfeld, C. Kupatt, F. Krotz, S. Zahler, T. Gloe, K. Issbrucker, P. Unterberger, M. Zaiou, C. Leberherz, A. Karl, P. Raake, A. Pfosser, P. Boekstegers, U. Welsch, P. S. Hiemstra, C. Vogelmeier, R. L. Gallo, M. Clauss, and R. Bals. 2003. 'An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18', *J Clin Invest*, 111: 1665-72.
- Konecki, D. S., U. M. Benedum, H. H. Gerdes, and W. B. Huttner. 1987. 'The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin', *J Biol Chem*, 262: 17026-30.
- Kong, M., X. G. Chen, K. Xing, and H. J. Park. 2010. 'Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review', *International Journal of Food Microbiology*, 144: 51-63.
- Konstantinidis, I. K., G. A. Kotsakis, S. Gerdes, and M. H. Walter. 2015. 'Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases', *Eur J Oral Implantol*, 8: 75-88.
- Lai, Y., and R. L. Gallo. 2009. 'AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense', *Trends in Immunology*, 30: 131-41.
- Lederberg, J., and A.T. MacCray. 2001. 'Ome sweet 'omics : a genealogical treasury of Words', *Scientist*, 15: 8.
- Lee, B. C., G. Y. Jung, D. J. Kim, and J. S. Han. 2011. 'Initial bacterial adhesion on resin, titanium and zirconia in vitro', *J Adv Prosthodont*, 3: 81-4.
- Lee, B. P., P. B. Messersmith, J. N. Israelachvili, and J. H. Waite. 2011. 'Mussel-Inspired Adhesives and Coatings', *Annu Rev Mater Res*, 41: 99-132.
- Lee, C., J. Shin, J. S. Lee, E. Byun, J. H. Ryu, S. H. Um, D. I. Kim, H. Lee, and S. W. Cho. 2013. 'Bioinspired, calcium-free alginate hydrogels with tunable physical and mechanical properties and improved biocompatibility', *Biomacromolecules*, 14: 2004-13.

- Lee, C. T., Y. W. Huang, L. Zhu, and R. Weltman. 2017. 'Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis', *Journal of Dentistry*, 62: 1-12.
- Lee, H., S. M. Dellatore, W. M. Miller, and P. B. Messersmith. 2007. 'Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings', *Science*, 318: 426-30.
- Lee, K. Y., and D. J. Mooney. 2001. 'Hydrogels for tissue engineering', *Chemical Reviews*, 101: 1869-79.
- Lee, Y., J.H. Chung, S. Yeo, C.H. Ahn, H. Lee, P.B. Messersmith, and G.T Park. 2010. 'Thermo-sensitive, injectable, and tissue adhesive sol-gel transition hyalurocnic acid/pluronic composite hydrogels prepared from bio-inspred catechol-thiol reaction ', *Soft Matter*: 977-83.
- Li, J., J. J. Koh, S. Liu, R. Lakshminarayanan, C. S. Verma, and R. W. Beuerman. 2017. 'Membrane Active Antimicrobial Peptides: Translating Mechanistic Insights to Design', *Front Neurosci*, 11: 73.
- Lin, N. J. 2017. 'Biofilm over teeth and restorations: What do we need to know?', *Dental Materials*, 33: 667-80.
- Lindhe, J., and J. Meyle. 2008. 'Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology', *J Clin Periodontol*, 35: 282-5.
- Liu, M., X. Li, Z. Xie, C. Xie, C. Zhan, X. Hu, Q. Shen, X. Wei, B. Su, J. Wang, and W. Lu. 2016. 'D-Peptides as Recognition Molecules and Therapeutic Agents', *Chemical Record (New York, N.Y.)*, 16: 1772-86.
- Liu, Y., Y. Yang, C. Wang, and X. Zhao. 2013. 'Stimuli-responsive self-assembling peptides made from antibacterial peptides', *Nanoscale*, 5: 6413-21.
- Lugardon, K., S. Chasserot-Golaz, A. E. Kieffer, R. Maget-Dana, G. Nullans, B. Kieffer, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2001. 'Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide', *J Biol Chem*, 276: 35875-82.
- Lugardon, K., R. Raffner, Y. Goumon, A. Corti, A. Delmas, P. Bulet, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2000. 'Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A', *J Biol Chem*, 275: 10745-53.
- Mahata, S. K., D. T. O'Connor, M. Mahata, S. H. Yoo, L. Taupenot, H. Wu, B. M. Gill, and R. J. Parmer. 1997. 'Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist', *J Clin Invest*, 100: 1623-33.
- Marotta, V., M. C. Zatelli, C. Sciammarella, M. R. Ambrosio, M. Bondanelli, A. Colao, and A. Faggiano. 2018. 'Chromogranin A as circulating marker for diagnosis and management of neuroendocrine neoplasms: more flaws than fame', *Endocr Relat Cancer*, 25: R11-r29.
- Marsh, P. D. 2005. 'Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style', *J Clin Periodontol*, 32 Suppl 6: 7-15.
- Mateescu, M., S. Baixe, T. Garnier, L. Jierry, V. Ball, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue, M. Nardin, P. Schaaf, O. Etienne, and P. Laval. 2015. 'Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection', *PLoS One*, 10: e0145143.
- Mattick, A. T., and A. Hirsch. 1947. 'Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci', *Lancet*, 2: 5-8.

- Metz-Boutigue, M. H., P. Garcia-Sablone, R. Hogue-Angeletti, and D. Aunis. 1993. 'Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites', *Eur J Biochem*, 217: 247-57.
- Metz-Boutigue, M. H., Y. Goumon, K. Lugardon, J. M. Strub, and D. Aunis. 1998. 'Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules', *Cell Mol Neurobiol*, 18: 249-66.
- Metz-Boutigue, M. H., A. E. Kieffer, Y. Goumon, and D. Aunis. 2003. 'Innate immunity: involvement of new neuropeptides', *Trends Microbiol*, 11: 585-92.
- Mishler, O. P., and H. J. Shiau. 2014. 'Management of peri-implant disease: a current appraisal', *J Evid Based Dent Pract*, 14 Suppl: 53-9.
- Mombelli, A. 2012. 'Antimicrobial advances in treating periodontal diseases', *Front Oral Biol*, 15: 133-48.
- Monje, A., G. Alcoforado, M. Padial-Molina, F. Suarez, G. H. Lin, and H. L. Wang. 2014. 'Generalized aggressive periodontitis as a risk factor for dental implant failure: a systematic review and meta-analysis', *J Periodontol*, 85: 1398-407.
- Monje, A., L. Aranda, K. T. Diaz, M. A. Alarcon, R. A. Bagramian, H. L. Wang, and A. Catena. 2016. 'Impact of Maintenance Therapy for the Prevention of Peri-implant Diseases: A Systematic Review and Meta-analysis', *J Dent Res*, 95: 372-9.
- Mysak, J., S. Podzimek, P. Sommerova, Y. Lyuya-Mi, J. Bartova, T. Janatova, J. Prochazkova, and J. Duskova. 2014. 'Porphyromonas gingivalis: major periodontopathic pathogen overview', *J Immunol Res*, 2014: 476068.
- Nagy, K., K. R. Mikulass, A. G. Vegh, A. Kereszt, E. Kondorosi, G. Varo, and Z. Szegletes. 2015. 'Interaction of cysteine-rich cationic antimicrobial peptides with intact bacteria and model membranes', *Gen Physiol Biophys*, 34: 135-44.
- Nazarzadeh Zare, E., M. Mansour Lakouraj, and M. Mohseni. 2014. 'Biodegradable polypyrrole/dextrin conductive nanocomposite: synthesis, characterization, antioxidant and antibacterial activity.', *Synthetic Metals*, 187: 9-16.
- Neuman, M. G., R. M. Nanau, L. Oruna-Sanchez, and G. Coto. 2015. 'Hyaluronic acid and wound healing', *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 18: 53-60.
- Neves, J., M. de Araujo Nobre, P. Oliveira, J. Martins Dos Santos, and P. Malo. 2018. 'Risk Factors for Implant Failure and Peri-Implant Pathology in Systemic Compromised Patients', *Journal of Prosthodontics*, 27: 409-15.
- Noimark, S., C. W. Dunnill, M. Wilson, and I. P. Parkin. 2009. 'The role of surfaces in catheter-associated infections', *Chemical Society Reviews*, 38: 3435-48.
- Norowski, P. A., Jr., and J. D. Bumgardner. 2009. 'Biomaterial and antibiotic strategies for peri-implantitis: a review', *Journal of Biomedical Materials Research, Part B: Applied Biomaterials*, 88: 530-43.
- Øilo, M., and V. Bakken. 2005. 'Biofilm and Dental Biomaterials', *Materials (Basel)*, 8: 2887-900.
- Oudhoff, M. J., M. E. Blaauboer, K. Nazmi, N. Scheres, J. G. Bolscher, and E. C. Veerman. 2010. 'The role of salivary histatin and the human cathelicidin LL-37 in wound healing and innate immunity', *Biological Chemistry*, 391: 541-8.

- Pappalardo, S., I. Milazzo, G. Nicoletti, O. Baglio, G. Blandino, L. Scalini, F. Mastrangelo, and S. Tete. 2007. 'Dental implants with locking taper connection versus screwed connection: microbiologic and scanning electron microscope study', *Int J Immunopathol Pharmacol*, 20: 13-7.
- Pasqua, T., T. Angelone, A. Spina, and M. C. Cerra. 2017. 'Biological Roles of the Eclectic Chromogranin-A-derived Peptide Catestatin', *Curr Med Chem*, 24: 3356-72.
- Pauling, L. 1960. *The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals : an introduction to modern structural chemistry* (Cornell University Press).
- Pelgrift, R. Y., and A. J. Friedman. 2013. 'Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance', *Adv Drug Deliv Rev*, 65: 1803-15.
- Pieroni, M., A. Corti, B. Tota, F. Curnis, T. Angelone, B. Colombo, M. C. Cerra, F. Bellocchi, F. Crea, and A. Maseri. 2007. 'Myocardial production of chromogranin A in human heart: a new regulatory peptide of cardiac function', *Eur Heart J*, 28: 1117-27.
- Pihlstrom, B. L., B. S. Michalowicz, and N. W. Johnson. 2005. 'Periodontal diseases', *Lancet*, 366: 1809-20.
- Pokrowiecki, R., A. Mielczarek, T. Zareba, and S. Tyski. 2017. 'Oral microbiome and peri-implant diseases: where are we now?', *Ther Clin Risk Manag*, 13: 1529-42.
- Postma, T.M., and R.M.J. Liskamp. 2016. 'Highly potent antimicrobial derivative of bovine cateslytin', *RCS Advances*, 6: 94840-4.
- Poulet, P.P., D. DUfaut, P. Barthet, and I. Brumpt. 2005. 'Concentrations and in vivo antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination.', *J Antimicrob Chemother.*, 55: 347-51.
- Pretzl, B., S. Salzer, B. Ehmke, U. Schlagenhaut, B. Dannewitz, H. Dommisch, P. Eickholz, and Y. Jockel-Schneider. 2019. 'Administration of systemic antibiotics during non-surgical periodontal therapy-a consensus report', *Clin Oral Investig*, 23: 3073-85.
- Putsep, K., G. Carlsson, H. G. Boman, and M. Andersson. 2002. 'Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study', *Lancet*, 360: 1144-9.
- Radek, K. A., B. Lopez-Garcia, M. Hupe, I. R. Niesman, P. M. Elias, L. Taupenot, S. K. Mahata, D. T. O'Connor, and R. L. Gallo. 2008. 'The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury', *J Invest Dermatol*, 128: 1525-34.
- Ramesh, S., T. Govender, H. G. Kruger, B. G. de la Torre, and F. Albericio. 2016. 'Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents', *J Pept Sci*, 22: 438-51.
- Rams, T. E., J. E. Degener, and A. J. van Winkelhoff. 2014. 'Antibiotic resistance in human peri-implantitis microbiota', *Clin Oral Implants Res*, 25: 82-90.
- Ratti, S., F. Curnis, R. Longhi, B. Colombo, A. Gasparri, F. Magni, E. Manera, M. H. Metz-Boutigue, and A. Corti. 2000. 'Structure-activity relationships of chromogranin A in cell adhesion. Identification of an adhesion site for fibroblasts and smooth muscle cells', *J Biol Chem*, 275: 29257-63.

- Ravat, F., P. Jault, and J. Gabard. 2015. '[Not Available]', *Ann Burns Fire Disasters*, 28: 13-20.
- Renoud, P., B. Toury, S. Benayoun, G. Attik, and B. Grosogeat. 2012. 'Functionalization of titanium with chitosan via silanation: evaluation of biological and mechanical performances', *PLoS One*, 7: e39367.
- Renvert, S., and G. R. Persson. 2009. 'Periodontitis as a potential risk factor for peri-implantitis', *J Clin Periodontol*, 36 Suppl 10: 9-14.
- Renvert, S., G. R. Persson, F. Q. Pirihi, and P. M. Camargo. 2018. 'Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations', *J Periodontol*, 89 Suppl 1: S304-s12.
- Renvert, S., and I. Polyzois. 2018. 'Treatment of pathologic peri-implant pockets', *Periodontol 2000*, 76: 180-90.
- Renvert, S., I. Polyzois, and N. Claffey. 2012. 'Surgical therapy for the control of peri-implantitis', *Clin Oral Implants Res*, 23 Suppl 6: 84-94.
- Ribeiro, M., M. P. Ferraz, F. J. Monteiro, M. H. Fernandes, M. M. Beppu, D. Mantione, and H. Sardon. 2017. 'Antibacterial silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels with silver and gold nanoparticles for bone regeneration', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13: 231-39.
- Roberts, A. P., and P. Mullany. 2010. 'Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8: 1441-50.
- Rovai, E. S., M. L. Souto, J. A. Ganhito, M. Holzhausen, L. Chambrone, and C. M. Pannuti. 2016. 'Efficacy of Local Antimicrobials in the Non-Surgical Treatment of Patients With Periodontitis and Diabetes: A Systematic Review', *J Periodontol*, 87: 1406-17.
- Russell, J., P. Gee, S. M. Liu, and R. H. Angeletti. 1994. 'Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides', *Endocrinology*, 135: 337-42.
- Ryu, J. H., Y. Lee, W. H. Kong, T. G. Kim, T. G. Park, and H. Lee. 2011. 'Catechol-functionalized chitosan/pluronic hydrogels for tissue adhesives and hemostatic materials', *Biomacromolecules*, 12: 2653-9.
- Sahiner, N., S. Sagbas, M. Sahiner, C. Silan, N. Aktas, and M. Turk. 2016. 'Biocompatible and biodegradable poly(Tannic Acid) hydrogel with antimicrobial and antioxidant properties', *International Journal of Biological Macromolecules*, 82: 150-9.
- Salick, D. A., J. K. Kretsinger, D. J. Pochan, and J. P. Schneider. 2007. 'Inherent antibacterial activity of a peptide-based beta-hairpin hydrogel', *Journal of the American Chemical Society*, 129: 14793-9.
- Salick, D. A., D. J. Pochan, and J. P. Schneider. 2010. 'Design of an injectable β -hairpin peptide hydrogel that kills Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Adv Mater Deerfield*, 21: 4120-23.
- Salvi, G. E., R. Cosgarea, and A. Sculean. 2017. 'Prevalence and Mechanisms of Peri-implant Diseases', *Journal of Dental Research*, 96: 31-37.
- . 2019. 'Prevalence of Periimplant Diseases', *Implant Dentistry*, 28: 100-02.

- Sang, L. Y., X. H. Zhou, F. Yun, and G. L. Zhang. 2010. 'Enzymatic synthesis of chitosan-gelatin antimicrobial copolymer and its characterisation', *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 58-64.
- Schenk, G., T. F. Flemmig, T. Betz, J. Reuther, and B. Klaiber. 1997. 'Controlled local delivery of tetracycline HCl in the treatment of periimplant mucosal hyperplasia and mucositis. A controlled case series', *Clin Oral Implants Res*, 8: 427-33.
- Schwach-Abdellaoui, K., N. Vivien-Castioni, and R. Gurny. 2000. 'Local delivery of antimicrobial agents for the treatment of periodontal diseases', *Eur J Pharm Biopharm*, 50: 83-99.
- Scorciapino, M. A., I. Serra, G. Manzo, and A. C. Rinaldi. 2017. 'Antimicrobial Dendrimeric Peptides: Structure, Activity and New Therapeutic Applications', *Int J Mol Sci*, 18.
- Seidah, N. G., and M. Chretien. 1999. 'Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides', *Brain Res*, 848: 45-62.
- Shlezinger, M., L. Khalifa, Y. Hourri-Haddad, S. Copenhagen-Glazer, G. Resch, Y. A. Que, S. Beyth, E. Dorfman, R. Hazan, and N. Beyth. 2017. 'Phage Therapy: A New Horizon in the Antibacterial Treatment of Oral Pathogens', *Curr Top Med Chem*, 17: 1199-211.
- Shooshtarizadeh, P., D. Zhang, J. F. Chich, C. Gasnier, F. Schneider, Y. Haikel, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 2010. 'The antimicrobial peptides derived from chromogranin/secretogranin family, new actors of innate immunity', *Regul Pept*, 165: 102-10.
- Simoës, S. M., F. Veiga, J. J. Torres-Labandeira, A. C. Ribeiro, M. I. Sandez-Macho, A. Concheiro, and C. Alvarez-Lorenzo. 2012. 'Syringeable Pluronic-alpha-cyclodextrin supramolecular gels for sustained delivery of vancomycin', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80: 103-12.
- Singh, B., and L. Pal. 2012. 'Sterculia crosslinked PVA and PVA-poly(AAm) hydrogel wound dressings for slow drug delivery: mechanical, mucoadhesive, biocompatible and permeability properties', *J Mech Behav Biomed Mater*, 9: 9-21.
- Smeets, R., A. Henningsen, O. Jung, M. Heiland, C. Hammacher, and J. M. Stein. 2014. 'Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis--a review', *Head Face Med*, 10: 34.
- Smiley, C. J., S. L. Tracy, E. Abt, B. S. Michalowicz, M. T. John, J. Gunsolley, C. M. Cobb, J. Rossmann, S. K. Harrel, J. L. Forrest, P. P. Hujoel, K. W. Noraian, H. Greenwell, J. Frantsve-Hawley, C. Estrich, and N. Hanson. 2015. 'Evidence-based clinical practice guideline on the nonsurgical treatment of chronic periodontitis by means of scaling and root planing with or without adjuncts', *J Am Dent Assoc*, 146: 525-35.
- Socransky, S. S., and A. D. Haffajee. 2005. 'Periodontal microbial ecology', *Periodontol 2000*, 38: 135-87.
- Socransky, S. S., A. D. Haffajee, M. A. Cugini, C. Smith, and R. L. Kent, Jr. 1998. 'Microbial complexes in subgingival plaque', *J Clin Periodontol*, 25: 134-44.
- Steinebrunner, L., S. Wolfart, K. Bossmann, and M. Kern. 2005. 'In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20: 875-81.

- Stone, P. W., M. Pogorzelska-Maziarz, C. T. Herzig, L. M. Weiner, E. Y. Furuya, A. Dick, and E. Larson. 2014. 'State of infection prevention in US hospitals enrolled in the National Health and Safety Network', *American Journal of Infection Control*, 42: 94-9.
- Strub, J. M., Y. Goumon, K. Lugardon, C. Capon, M. Lopez, M. Moniatte, A. Van Dorsselaer, D. Aunis, and M. H. Metz-Boutigue. 1996. 'Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules', *J Biol Chem*, 271: 28533-40.
- Subramani, K., R. E. Jung, A. Molenberg, and C. H. Hammerle. 2009. 'Biofilm on dental implants: a review of the literature', *Int J Oral Maxillofac Implants*, 24: 616-26.
- Sugawara, M., J. M. Resende, C. M. Moraes, A. Marquette, J. F. Chich, M. H. Metz-Boutigue, and B. Bechinger. 2010. 'Membrane structure and interactions of human catestatin by multidimensional solution and solid-state NMR spectroscopy', *Faseb j*, 24: 1737-46.
- Suzuki, Y., M. Tanihara, Y. Nishimura, K. Suzuki, Y. Kakimaru, and Y. Shimizu. 1998. 'A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection', *J Biomed Mater Res*, 42: 112-6.
- Taglietti, A., Y. A. Diaz Fernandez, E. Amato, L. Cucca, G. Dacarro, P. Grisoli, V. Necchi, P. Pallavicini, L. Pasotti, and M. Patrini. 2012. 'Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram negative bacteria', *Langmuir*, 28: 8140-8.
- Tang, H., A. Lu, L. Li, W. Zhou, Z. Xie, and L. Zhang. 2013. 'Highly antibacterial materials constructed from silver molybdate nanoparticles immobilized in chitin matrix', *Chem Eng J*, 234.
- Taupenot, L., K. L. Harper, and D. T. O'Connor. 2003. 'The chromogranin-secretogranin family', *N Engl J Med*, 348: 1134-49.
- Territo, M. C., T. Ganz, M. E. Selsted, and R. Lehrer. 1989. 'Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils', *J Clin Invest*, 84: 2017-20.
- Theurl, M., W. Schgoer, K. Albrecht, J. Jeschke, M. Egger, A. G. Beer, D. Vasiljevic, S. Rong, A. M. Wolf, F. H. Bahlmann, J. R. Patsch, D. Wolf, P. Schratzberger, S. K. Mahata, and R. Kirchmair. 2010. 'The neuropeptide catestatin acts as a novel angiogenic cytokine via a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism', *Circ Res*, 107: 1326-35.
- Ting, M., J. Craig, B. E. Balkin, and J. B. Suzuki. 2018. 'Peri-implantitis: A Comprehensive Overview of Systematic Reviews', *J Oral Implantol*, 44: 225-47.
- Tinschert, J., G. Natt, W. Mautsch, M. Augthun, and H. Spiekermann. 2001. 'Fracture resistance of lithium disilicate-, alumina-, and zirconia-based three-unit fixed partial dentures: a laboratory study', *International Journal of Prosthodontics*, 14: 231-8.
- Tonetti, M. S., P. Bottenberg, G. Conrads, P. Eickholz, P. Heasman, M. C. Huysmans, R. Lopez, P. Madianos, F. Muller, I. Needleman, B. Nyvad, P. M. Preshaw, I. Pretty, S. Renvert, F. Schwendicke, L. Trombelli, G. J. van der Putten, J. Vanobbergen, N. West, A. Young, and S. Paris. 2017. 'Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases', *J Clin Periodontol*, 44 Suppl 18: S135-s44.

- Tota, B., M. C. Cerra, and A. Gattuso. 2010. 'Catecholamines, cardiac natriuretic peptides and chromogranin A: evolution and physiopathology of a 'whip-brake' system of the endocrine heart', *J Exp Biol*, 213: 3081-103.
- Tsao, C. T., C. H. Chang, Y. Y. Lin, M. F. Wu, J. L. Wang, J. L. Han, and K. H. Hsieh. 2010. 'Antibacterial activity and biocompatibility of a chitosan-gamma-poly(glutamic acid) polyelectrolyte complex hydrogel', *Carbohydrate Research*, 345: 1774-80.
- Tsigarida, A. A., S. M. Dabdoub, H. N. Nagaraja, and P. S. Kumar. 2015. 'The Influence of Smoking on the Peri-Implant Microbiome', *J Dent Res*, 94: 1202-17.
- Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, and P. Lejeune. 1998. 'Isolation of an Escherichia coli K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression', *J Bacteriol*, 180: 2442-9.
- Vimala, K., K. Samba Sivudu, Y. Murali Mohan, B. Sreedhar, and K. Mohana Raju. 2009. 'Development of gelatin based inorganic nanocomposite hydrogels for inactivation of bacteria ', *Carbohydrate Polymers*, 75: 463-71.
- Wang, G., X. Li, and Z. Wang. 2016. 'APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education', *Nucleic Acids Research*, 44: D1087-93.
- Wohlfahrt, J. C., A. M. Aass, F. Granfeldt, S. P. Lyngstadaas, and J. E. Reseland. 2014. 'Sulcus fluid bone marker levels and the outcome of surgical treatment of peri-implantitis', *J Clin Periodontol*, 41: 424-31.
- Woo, G. L., M. W. Mittelman, and J. P. Santerre. 2000. 'Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer', *Biomaterials*, 21: 1235-46.
- Xu, L., X. Li, T. Takemura, N. Hanagata, G. Wu, and L. L. Chou. 2012. 'Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel', *J Nanobiotechnology*, 10: 16.
- Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak, and J. J. Oppenheim. 2002. 'Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal', *Trends Immunol*, 23: 291-6.
- Yang, K., Q. Han, B. Chen, Y. Zheng, K. Zhang, Q. Li, and J. Wang. 2018. 'Antimicrobial hydrogels: promising materials for medical application', *Int J Nanomedicine*, 13: 2217-63.
- You, Y., Y. Xie, and Z. Jiang. 2019. 'Injectable and biocompatible chitosan-alginate hydrogels', *Biomed Mater*, 14: 025010.
- Yu, P., C. Wang, J. Zhou, L. Jiang, J. Xue, and W. Li. 2016. 'Influence of Surface Properties on Adhesion Forces and Attachment of Streptococcus mutans to Zirconia In Vitro', *Biomed Res Int*, 2016: 8901253.
- Zaet, A., P. Dartevelle, F. Daouad, C. Ehlinger, F. Quiles, G. Francius, C. Boehler, C. Bergthold, B. Frisch, G. Prevost, P. Lavalley, F. Schneider, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue, and C. Marban. 2017. 'D-Cateslytin, a new antimicrobial peptide with therapeutic potential', *Scientific Reports*, 7: 15199.
- Zandbergen, D., D. E. Slot, R. Niederman, and F. A. Van der Weijden. 2016. 'The concomitant administration of systemic amoxicillin and metronidazole compared to scaling and root planing alone in treating periodontitis: =a systematic review=', *BMC Oral Health*, 16: 27.

- Zasloff, M. 1987. 'Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 5449-53.
- Zhang, D., P. Shooshtarizadeh, B. J. Laventie, D. A. Colin, J. F. Chich, J. Vidic, J. de Barry, S. Chasserot-Golaz, F. Delalande, A. Van Dorselaer, F. Schneider, K. Helle, D. Aunis, G. Prevost, and M. H. Metz-Boutigue. 2009. 'Two chromogranin a-derived peptides induce calcium entry in human neutrophils by calmodulin-regulated calcium independent phospholipase A2', *PLoS One*, 4: e4501.
- Zhang, K., F. Rao, G. Wen, R. M. Salem, S. Vaingankar, M. Mahata, N. R. Mahapatra, E. O. Lillie, P. E. Cadman, R. S. Friese, B. A. Hamilton, V. Y. Hook, S. K. Mahata, L. Taupenot, and D. T. O'Connor. 2006. 'Catecholamine storage vesicles and the metabolic syndrome: The role of the chromogranin A fragment pancreastatin', *Diabetes Obes Metab*, 8: 621-33.
- Zhang, L., A. Rozek, and R. E. Hancock. 2001. 'Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes', *J Biol Chem*, 276: 35714-22.
- Zhang, L., M. G. Scott, H. Yan, L. D. Mayer, and R. E. Hancock. 2000. 'Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers', *Biochemistry*, 39: 14504-14.
- Zhao, Y., X. Zhang, Y. Wang, Z. Wu, J. An, Z. Lu, L. Mei, and C. Li. 2014. 'In situ cross-linked polysaccharide hydrogel as extracellular matrix mimics for antibiotics delivery', *Carbohydrate Polymers*, 105: 63-9.
- Zhou, C., P. Li, X. Qi, A. R. Sharif, Y. F. Poon, Y. Cao, M. W. Chang, S. S. Leong, and M. B. Chan-Park. 2011. 'A photopolymerized antimicrobial hydrogel coating derived from epsilon-poly-L-lysine', *Biomaterials*, 32: 2704-12.
- Zipprich, H., P. Weigl, B. Lange, and H.C. Lauer. 2007. 'Micromovements at the implant–abutment interface: measurement, causes, and consequences.', *Implantologie*, 15: 31–46.

Partie VII :

Publications et communications

Publications

1. **Baixe, S.**, H. Tenenbaum, and O. Etienne. 2016. '[Microbial contamination of the implant-abutment connections: Review of the literature]', *Rev Stomatol Chir Maxillofac Chir Orale*, 117: 20-5. *Référencé dans Pubmed. Voir chapitre 1, page 34.*
2. **Baixe, S.**, H. Tenenbaum, and O. Etienne. Bacterial contamination of the implant-abutment interface and sealing devices - A review. Présenté et soutenu pour le diplôme de l'*European Federation of Periodontology* passé, soutenu (*en anglais*) et obtenu à Strasbourg en 2018 (40 pages). *En vue d'être soumis dans le JOMI. Voir annexes, page 173.*
3. Mateescu, M., **S. Baixe**, T. Garnier, L. Jierry, V. Ball, Y. Haikel, M. H. Metz-Boutigue, M. Nardin, P. Schaaf, O. Etienne, and P. Lavalley. 2015. 'Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection', *PLoS One*, 10 : e0145143. (*co-auteur*). *Référencé dans Pubmed. Voir chapitre 3, page 102.*
4. Prothèses supra-implantaire : données et conceptions actuelles. Tavitian P. et coll. Editions CdP. Collection JPIO. Décembre 2017. ISBN 13 :9782843614026. **Rédaction du Chapitre 4** : Connexions implantaire : enjeux biologiques, mécaniques et esthétiques. Etienne O. **Baixe S.** Waltmann. E. pages 57-84. (*co-auteur*)

Communications

Communication orale :

1. Relation entre les connectiques implantaire et les péri-implantites. Revue de littérature. Soirée SFPIO (Société Française de Parodontologie et d'Implantologie région Alsace), 5 octobre 2014.
2. Étanchéité des connectiques implantaire : problématiques et solutions. Congrès annuel de L'ADF (Association Dentaire Française) 2018. Jeudi AM 29 Novembre 2018-Séance C58.

Communications affichées (poster) :

1. Antibacterial Peptide-Based Gel for Prevention of Medical Implanted-Device Infection. **Baixe S**, Mateescu M, Garnier T, Jierry L, Ball V, Haikel Y, Metz-Boutigue MH, Nardin M, Schaaf P, Lavallo P, Etienne O. Congrès de L'IRTEG SOMAS SCHOOL 2016. 4 juillet 2016.

Communication en anglais. Voir Chapitre 3, page 115.

2. Développement d'un gel antibactérien injectable pour la prévention des péri-implantites. **Baixe S**, Mateescu M, Garnier T, Jierry L, Ball V, Haikel Y, Metz-Boutigue MH, Nardin M, Schaaf P, Lavallo P, Etienne O. 40e journées du Collège National des Enseignants en Prothèse

Odontologique (CNEPO), 8-10 septembre 2016. *1er prix recherche.*

3. Evaluation dynamique du joint implanto-prothétique par éléments finis dans le cadre du développement d'un hydrogel antibactérien. F. Heichelbech, **S.Baixe**, E. Pilavayan, X. Van Bellinghen,

P. Schaaf, O. Etienne. (2^e auteur). *Voir annexes p 174. Présenté au 40e journées du Collège National des Enseignants en Prothèse Odontologique (CNEPO), 8-10 septembre 2016.*

Partie VIII :

Annexes

Poster III



EVALUATION DYNAMIQUE DU JOINT IMPLANTO-PROTHETIQUE

par éléments finis

dans le cadre du développement d'un hydrogel antibactérien



Frédéric HEICHELBECH, Sébastien BAIXE, Elise PILAVYAN, Xavier VAN BELLINGHEN, Pierre SCHAAF, Olivier ETIENNE

Ce travail réalisé à l'Unité INSERM UMR 1121 évalue les déformations dynamiques du micro-espacement au niveau du joint implanto-prothétique⁽¹⁾ lors des mouvements physiologiques de mastication à l'aide de la méthode des éléments finis. Cet outil mathématique simule virtuellement un objet et son comportement mécanique lorsqu'on y applique une force. Les résultats permettront de caractériser la compression et l'étirement maximal que devra supporter un hydrogel antibactérien⁽²⁾ inséré dans ce joint implanto-prothétique.

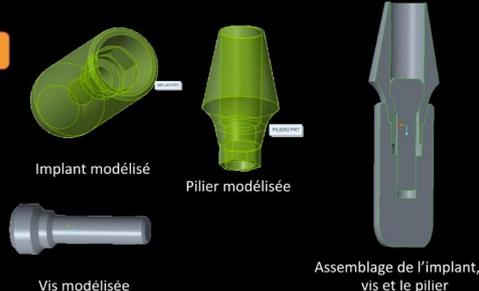
Matériels et méthodes :

Modélisation informatique

3 solides modélisés :

- implant : NobelParalell™ Conical Connection de diamètre 4.3 (RP) et de hauteur 10 mm
- pilier NobelProcera® Conical Connection en titane
- vis d'assemblage : NobelBiocare® unigrip

Logiciel : Creo 3 Parametric ®



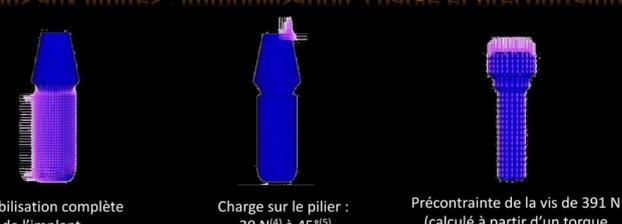
Implant modélisé, Pilier modélisée, Vis modélisée, Assemblage de l'implant, la vis et le pilier, Micro-espacement du joint implanto-prothétique (20 µm)⁽¹⁾

Conversion en éléments finis

	Module d'Young ⁽³⁾	Coefficient de Poisson ⁽³⁾
Titane implant	110 GPa	0,34
Titane vis	110 GPa	0,34
Titane pilier	110 GPa	0,34

Modélisation en éléments finis

Conditions aux limites : immobilisation, charge et précontrainte



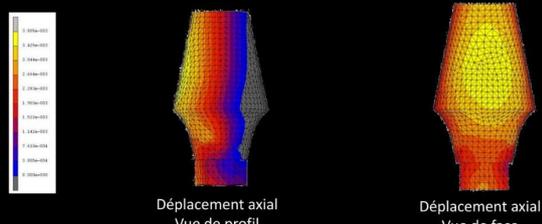
Immobilisation complète de l'implant, Charge sur le pilier : 20 N⁽⁴⁾ à 45°⁽⁵⁾, Précontrainte de la vis de 391 N (calculé à partir d'un torque de 35 N⁽⁶⁾)

Résultats :

Pincement du micro-espacement du côté opposé à la charge sur le pilier

Logiciel : Marc Mentat 2012

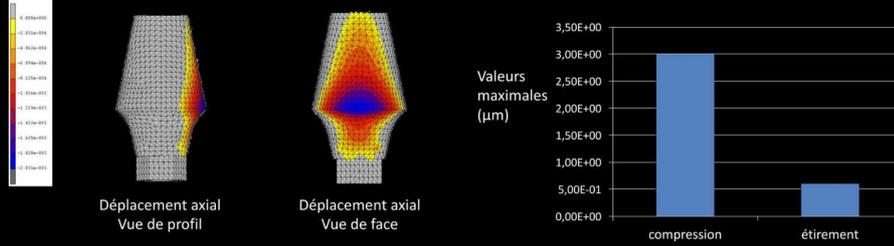
Echelle exprimée en µm



Déplacement axial Vue de profil, Déplacement axial Vue de face

Elargissement du micro-espacement du côté de la charge sur le pilier

Echelle exprimée en µm



Déplacement axial Vue de profil, Déplacement axial Vue de face

Valeurs maximales (µm)

Condition	Valeur maximale (µm)
compression	~3,00E+00
étirement	~0,50E+00

Discussion et conclusions:

Une colonisation par l'infiltrat microbactérien dans cet espace peut mettre en péril l'implant dentaire par destruction inflammatoire de l'os environnant, phénomène appelé péri-implantite⁽⁷⁾. D'après les résultats de ce travail, ce micro-espace de 20 µm subit des déformations cycliques au cours de la mastication. La matrice du gel contenant les agents anti-bactériens doit alors supporter une compression correspondant à 15% de son volume et à un étirement de 3% de son volume. Cela dit, la méthode des éléments finis ne reproduit pas à l'identique la réalité (pas de présence d'os) et donne une indication quant aux résultats à attendre. D'autres tests, in vitro et in vivo, doivent être conduits pour caractériser ce joint implanto-prothétique.

REFERENCES
1. S. Rubin, D. Etienne (2022) Microgaps between osseous abutments and titanium implants: a critical analysis of materials, Vol 21, p73.
2. Maronec M, Sabat S, Gerner S, Gerner L, Sabat S, Sabat S, Microleakage and Bacterial Infection of Implants: A Systematic Review of the Literature. J Oral Maxillofac Surg. 2015;73(10):1855-1861.
3. Wang et al. (2005) The dynamic behavior of implant loading. J Prosthet Dent. 2005;94(1):1-10.
4. P. Schmitt, C. Kersch, C. Kersch. (2008) The factors and their influence on the microleakage of dental implants. J Biomed Mater Res. 2008;82(1):113-118.
5. P. Schmitt, C. Kersch, C. Kersch. (2008) The factors and their influence on the microleakage of dental implants. J Biomed Mater Res. 2008;82(1):113-118.
6. Kersch C, Schmitt P. (2008) The factors and their influence on the microleakage of dental implants. J Biomed Mater Res. 2008;82(1):113-118.
7. Kersch C, Schmitt P. (2008) The factors and their influence on the microleakage of dental implants. J Biomed Mater Res. 2008;82(1):113-118.

Introduction

Perimplant diseases had growth since the beginning of implantology. These pathologies appear lately after implant surgery [1]. According to last reviews and meta-analysis, the prevalence of perimplantitis is estimated around 12% of the total number of implant in the population, and at 18 % with regard to patient [2]. They are the first cause of implant failure and represent a concerning issue.

Histologically, the perimplant biological space is compound of a connective tissue, placed above alveolar ridge, and a long-junction epithelium. These soft tissues are located around abutment or implant collar for tissue-level implants. First step of disease are clinically marked with a soft tissue inflammation (perimplant mucositis) that occurs in most of patients (80%) [3]. If it is not treated, a crestal bone loss can appears progressively around implant, leading thus to the perimplantitis.

Many aetiology and risk factors have been incriminated for perimplantitis and a recent consensus statement reviewed their influence [4]. Easy oral hygiene associated to a sufficient width of keratinized mucosa ($> 2\text{mm}$) is correlated to a better implant health, with less dental plaque [5]. Periodontal past and smoking are also often considered as a risk factor but further studies are need to confirm statistically this trend [6]. The link between general pathologies and perimplantitis is poor, but precautions are suggested for diabetic patients who are at a greater risk of periodontitis, especially during implantation. Sjogren's patients could also increase the risk of perimplantitis [7].

The role of the prosthetic assembly and strain's influence on the perimplant tissues has been also recently reviewed [8]. According to Frost' theory, bone has to be stimulated between weak forces for bone vitality and higher strains tolerated by bone resistance. Otherwise, overloads lead to bone resorption, and could lead to perimplant bone loss. The impact of

Microbial contamination of the implant-abutment connections: Review of the literature

Baixe Sébastien
Department of Periodontology, University of Strasbourg
March 2018

<p>theses forces is characterised in "stress" or "strain" along implant-bone interface (von Misses stress), and are calculated with the Finite Element Analysis (FEA). Even if studies need more homogeneity in the methodology, most of them assure that mainly, stress depends on the axis of the occlusal force, and non-axial forces increase perimplant strains [9-12]. The consecutive clinical recommendations indicate to place implant along the occlusal force direction to avoid stress with angled abutments [13, 14]. Platform switching for implant/prosthetic assembly connection associated with a passive fit between components allows decreasing of micro-strains [9-11]. In the same way, short implants could create a peak of stress in the marginal bone of implants, and should have a maximum crown/implant ratio less than 2,5 [15]. Width [16, 17], macro-relief (threads) [17, 18] and micro-reliefs (porosity) [19] of implant have are also related to the stress distribution. At least, the use of shock-adsorbing materials allows dissipating of forces transmitted on dental implants [15, 16].</p> <p>Connection between prosthetic components (abutment or crown with implant) plays a crucial role for the longevity of the assembly. Inaccuracy increase forces transmitted to alveolar bone, and could lead to biological failures [20, 21] for mechanical reasons. Consequently, the implant-abutment interface presents a microgap where microorganisms are able to grow and colonize other hollow spaces at the inner part of the assembly. Such a development is negative for the health of surrounding tissues, but biological implications are not yet well understood.</p> <p>The aim of this review is to evaluate the precision of fit between implant and abutment, in a static and dynamic situation. The microorganism colonization of assemblies is examined in order to understand the biological consequences. Then, sealing solutions are discussed.</p>	<p>Material and methods</p> <p>This review concerns articles written between 1981 and 2017. They are considering the measurement of the microgap between implant and abutment, bacterial colonisation and biological consequences. Methods for sealing the microgap between implant and abutment are also related. Medline database (Pubmed) has been used for the research with MeSH "precision of fit", "implant" and "abutment" for the first part, then "implant", "abutment" and "bacteria" for the three following parts. Articles or reviews that corresponded to the heart of this review have been retained, but more articles are now added for a more extensive bibliography. Complete articles, reviews and exceptionally abstracts available on Pubmed have been selected. Articles without abstract have been rejected.</p> <p>The first part of this review "dimension of the microgap" sets only the topic of the subject, and is not extensive (6 articles).</p> <p>For the following parts, articles out of topic or that are not talking about bacterial colonisation in connection (bacteria on implant surfaces only or around implant) are excluded. Implants that are not employed for a dental use are also rejected. Finally, from 219 articles, 81 articles are retained for these 3 parts that constitute this review. 5 reviews are added to articles (da Silva Neto et al., 2012; Schmitt et al. 2014; Mishra et al. 2017; Sasada et al. 2017; Passos et al., 2013.) They completely respond to these questions:</p> <ul style="list-style-type: none"> - What are the studies <i>in vitro</i> which evaluate the microbial colonization? - What are the technical used <i>in vitro</i> for these studies? - What are the methods to know <i>in vivo</i> the microgap colonization? What is the link between biology? - What are the possible devices to seal the connection, and what is already used <i>in vivo</i>? <p>The following flowchart sum-up how these articles were selected and splitted in the review.</p>
<p>3</p>	<p>4</p>

Table 1- Static studies *in vitro* – is focused on the methodological aspect of the *in vitro* studies. It indicates if microbial leakage is evaluated from the inner or from the outer part of the assembly. Many type of connections are evaluated through articles, and can be compared. These last years, technical of evaluation are using more and more DNA analysis of bacteria. Strains are also noticed because of their differences in size and behaviour.

Table 2- Dynamic studies *in vitro* – is developing the protocol of cycling, which trend to simulate oral conditions. It allows comparing with table 1 if connection with good sealing properties in static situation is still correct or not after cycling.

Table 3 – *in vivo* sampling of the connection sum-up all the studies that have collected bacteria in connection *in vivo*. These studies are mainly retrospective, and times of follow-up are very different (from 25 days to more than 9 years). Implants are healthy most of the time, but periopathogens bacteria are frequently found

Table 4 and 5 – Sealing devices *in vitro* and *in vivo* – make the point on all types of devices that have been already used, in order to seal the microgap. Mechanical seal (in silicone), antiseptic gel or solutions are assessed. Cements are sometime used. Time of activity is also noticed in order to compare these different seals.

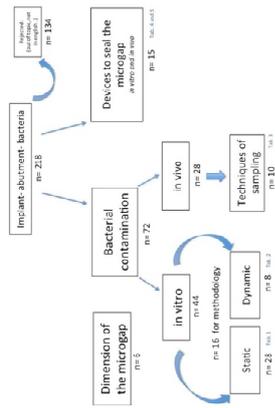


Figure 1. Flowchart of selection and repartition of studies for this review
Additional tables of studies are added to the end of this review in order to detail the protocols.

Tables

The final tables develop articles that constitute this review. They indicate the most important point of article in methodology. Then, conclusions of each chapter in the review can be understood with a more detailed and clear points. This review has been developed in 5 tables. Articles are classified globally following the order or references.

<p>Results and discussion</p> <p>1. Dimension of the microgap</p> <p>Precision of fit of the connection is evaluated since a long time in literature. It allows a long-term stability at the assembly. Lack of precision can lead to mechanical failures (screw loosening, screw fracture) or microbial contamination. Many studies <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> have evaluated the microgap dimension. Most of them are done in static conditions but some of them evaluate the dynamic behaviour of the prosthetic components.</p> <p><i>Static Studies</i></p> <p>Accuracy of abutment with implant has been assessed in three dimensions: vertical and horizontal (adaptation of antirrotational shapes). Precision of these forms is necessary but the interlocking doesn't have to be too accurate, otherwise abutment risks to be not completely inserted. Currently, 2° of rotational misfit of an abutment on an external hexagon is clinically acceptable [22].</p> <p>Evaluations of vertical microgap are generally realized on SEM views on torqued assemblies. Hence, the mean size of the microgap is 5 µm, but with variations between 10 and 50 µm [23]. Precisely, microgap varies according to the zone of measurement: it is more opened in periphery, and tighter for internal measurements closed to the screw. Horizontal discrepancies between implant and abutment show either a lack of precision between components, or a specific association like platform switching.</p> <p>There are no correlation between the shape of the connection and the precision of fit that depends mostly of the quality of the process for abutment fabrication and materials. In this</p>	<p>way, CAD/CAM allow to obtain zirconia abutments that are at least as accurate as titanium abutment [24].</p> <p><i>Dynamic Studies</i></p> <p>Dynamic <i>in vitro</i> studies simulate the masticatory strains on implant/abutment (or crown) assemblies. When lateral forces are applied on the abutment, the microgap is opening on this side and is tightening at the opposite side. The amplitude of the movement relies on the intensity of the force applied, the shape of the connection and the quality of the manufacturing. Two kinds of studies have been published in literature; the first approach is a mathematical and computing approach with the Finite Element Analysis (FEA), the second method use complex techniques of imaging.</p> <p>FEA allows comparison between different morphologies of connections, defining the ideal and theoretical behaviour of the connection. Under lateral loading forces, it has been shown that the more conical the connection the less opened the microgap. Beyond an angle of conicity, only few differences are noticed between connections and microgap doesn't vary so much. Saidin et al. shows that when similar concities of internal connection are associated to different shapes (hexagon, octagon and Morse cone), the microgap remains the same (1 µm) [25]. It decreases until 0,2 µm for internal non-conical connection (trilobes), made of an external flat-to-flat part, and an internal trilobed antirrotational part. However, these values concern only the apical part of the connection, and a greatest micromotion (2µm) is calculated in cervical area under forces.</p> <p>The other type of <i>in vitro</i> dynamic studies has the benefit to work on real prosthodontics or implant pieces, with potential defects of milling from manufacturers. Some devices use radiology to measure peripheral microgap opening, after lateral forces application. In Zipprich et al. study, microgap is opening until 36 µm for internal bone level connectors, and until 64</p>
7	8

<p>μm for tissue-level assemblies (Straumann) [26]. In another study with a more accurate device, authors evaluate the microgap between 1 μm and 4 μm, and until 22 μm in a dynamic situation [27].</p> <p>2. Microgap and <i>in vitro</i> bacterial colonisation. Tables 1 and 2</p> <p>Implant-abutment assembly sealing against bacteria can be assessed either studying colonisation from the exterior to the inner part of the assembly, or through the opposite sense.</p> <p>Sealing of implant –abutment assembly is generally evaluated putting it in a bacterial broth. The assembly is then removed and unscrewed. Bacteria that have grown inside connection are either directly visualized, other put again in a culture media. This approach highlights the centripetal colonization of the microgap [23, 28-31]. Another approach consist: to inoculate the tip of the abutment screw, then to screw the assembly before putting it inside a sterile bacterial broth. This media become cloudy if a bacterial leakage happens from the inner part to the external part of the implant-abutment connection [32, 33]. Then, recent methods like DNA checkerboard are more sensitive to detect specific bacteria with probes [34].</p> <p>Most of the studies use bacteria as an infectious agent. Strains involved in perimplantitis are sometimes used [31], but other strains easier to culture are often used as an experimental model [23, 30, 32, 33, 35]. <i>C. albicans</i> or other strains of yeast are also employed sometimes in order to complete the understanding of the colonisation [36]. At least, some authors evaluate directly the penetration of virulence factors like lipopolysaccharide (LPS) [37, 38].</p> <p>Its small size (less than 0.1 μm) colonizes easily connection that measure few micrometres. Otherwise, stains like toluidine blue are also employed [39, 40]. Human saliva is more rarely used for incubation, but it allows also results <i>in vitro</i> [41, 42].</p>	<p>a. Static studies</p> <p><i>Impact of the morphology of the connection</i></p> <p>No connection appears completely tight with microorganisms [37, 43-46]. In Jansen et al. study, many systems with different shapes of connection are evaluated in presence of <i>E.coli</i> [23]. All types of systems present a microleakage at 14 days for all morphologies of connection.</p> <p><i>Internal connection</i></p> <p>Internal conical connection present the best sealing properties, as reported in different studies or reviews [47-50], especially for the Morse cone [51-56]. The trilobes internal connections are more permeable [57]. Tesmer et al. compare penetration of <i>Porphyromonas gingivalis</i> (P2g) and <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa) in Morse cones (Ankylos®) and trilobes (Nobel Replace®) connections. Authors shows a contamination of the trilobes, but not for the Morse cone Ankylos® [31].</p> <p><i>External connection</i></p> <p>Dias et al. evaluated 5 external hexagons, from 5 different systems [32]. Mean size of the static microgap is less than 3 μm for all titanium-titanium assemblies. Only one system presents a microleakage (in 25% of the samples). Authors conclude that there is no direct link between the size of the microgap and the bacterial colonization because in this case, precision of fit is sufficient to prevent colonisation. However, these results should be relativized because study has been realized without dynamic strains that could open the microgap, permitting then a pumping effect of microorganisms.</p>
9	10

<p><i>. Impact of the diameter of the connection</i></p> <p>In a SEM evaluation on 2 implant systems (Bicon and Sweden-Martina), Pappalardo et al. observe that the bigger the diameter of the abutment, the higher the passage of bacteria [30].</p> <p><i>. Impact of the torque and screwing-unscrewing</i></p> <p>Respect of the torque and number of screwing/unscrewing are critical for the best seal of the assembly [36, 58-60]. It can limit or prevent microbial penetration. After only 2 manipulations (of screwing/unscrewing), 70% of connections are contaminated, but only 30% after 1 manipulation [28].</p> <p><i>. Impact of materials</i></p> <p>Materials developed for prosthetic abutment are diversified, and rely on the technical used. Hence, technical of metal casting, cast-to alloy or milling require for each some specific materials.</p> <p>Even if it's no more the first option today, realization of framework of abutment or crown can be done with calculable pre-made component, that are put directly in contact with the implant flat. Initially, custom abutments were made with complete calculable component, or with a premachined cobalt-chromium connection with a plastic sleeve abutment, with poor sealing properties [61]. When they are correctly treated with classical technical of laboratory, both present surprisingly the same sealing ability according to do Nascimento et al. study [35].</p> <p>Today, abutments are mainly made in titanium, in zirconia or with a titanium connection glued to a zirconia core in order to avoid biomechanical damages of the titanium by zirconia that is 6 times harder than titanium [24]. Studies show that zirconia has a good precision of fit, but a recent review shows a light better seal for titanium abutments [56].</p>	<p><i>. Impact of the screw fixed dental prostheses</i></p> <p>Contamination happens through the screw access channel, but only few studies evaluate this microbial pathway. Quirynen et al. submerge implant-abutment assemblies in a bacterial culture broth, partially until the connection and completely [62]. After 7 days, it is observed that assemblies completely submerged present more bacteria in their inner part than others.</p> <p>Guindy et al. confirm these results, considering that contamination occurs mainly along the screw access channel, rather than the implant-abutment interface [63]. Thus, occlusal sealing should limit the total bacterial quantity in connection. These results show the importance of the respect of the protocol for sealing the screw access channel.</p> <p><i>b. Dynamic studies</i></p> <p>Dynamic studies apply transversal loads on abutment, which create a movement of opening and closure of the microgap between implant and abutment, permitting then a microleakage of fluids and bacteria and their metabolites through the connection (<i>pumping effect</i>). Steinbruner et al. highlight this inoculating <i>E. coli</i> at the inner part of the implant, and applying forces (120 N) on an abutment in an occlusal simulator [33]. The bacterial contamination is directly in correlation with the number of cycle [64], but is not directly correlated to preload loss [65].</p> <p>Most of the studies that evaluate Morse cone show also that it is the connection with the weakest colonization, which occurs after more cycles than other connections [39, 66-68].</p> <p>Differences between other connections are not always demonstrated [69].</p>
11	12

3. Bacterial contamination *in vivo*. Table 3

a. Presence of bacteria in connection

. Origin and composition of bacteria

Composition of peri-implant flora is influenced by teeth flora: bacteria that are found in peri-implant sulcus and hollow spaces of implant assemblies come from dental sites that serve of bacterial reservoir [70]. There is also a correlation between quantity of peri-implant plaque and importance of connection contamination [71]. Initially, Quirynen and van Steenberghe had shown existence of bacteria on healing abutment screws thread, 3 months after screwing [72]. Bacteria found were mainly cocci (86%) and non-motile rods (12%) while motile microorganisms (1%) and spirochetes (0,1%) were weakly present. According to authors, this non-pathogen flora was linked to the existence of a microgap. However, Rosenberg et al. showed that up to 42% of flora was composed of spirochetes and motile rods [73].

A recent study evaluates the presence of bacteria in connections on screw-retained bridges without pathological situation, 9 years after insertion [74]. The flora of sulcus, screw head, and screw thread are evaluated. Classical pathogens associated to periimplantitis, and other unusual bacteria like *Helicobacter pylori* or *Streptococcus aureus* are found in compartments. The quantity of bacteria found on screw thread is weakest than in sulcus, but the composition of the flora of internal compartments is very closed to the healthy sulcus. Authors consider that colonization occurs continually either through the implant-abutment connection, or through the screw access channel. In fact, bacteria can't survive in completely closed compartment, without culture media. These results are in agreement with Quirynen and van Steenberghe works [72].

13

Moreover, according to authors, bacterial penetration is under-estimated in most of the studies, because only one sampling associated to only one bacterial assay are investigated. Authors suggest also that colonization occurs continually through the implant-abutment connection, or through the screw access channel. Some contaminations are evaluated on big bacteria, like *Fusobacterium nucleatum*, but smaller bacteria that could contaminate are not taken in order. Thus, Callan et al. confirms the presence of periodontopathogenic bacteria in connection, using a DNA probe detection technique [75].

. Chronology of contamination

The presence of bacteria in connection at the 2nd stage surgery suggests that connections are contaminated since the implant surgery [72]. Colonization continues after healing abutment (or abutment) connection. At least, microgap continue to be invaded by bacteria if precision of fit of component is weak, or if the screw access channel is porous [62]. After a periodontal treatment, Quirynen et al. estimates that perisulcular flora around teeth and implant can recover within one week. Bacteria found in the deep pockets belong to the orange and red complex [76]. They grow directly close to the connection, and may invade at new the microgap.

. Impact of the materials

Options most frequently used in supra-implant prosthesis are milled materials, for personalized or standardized abutment manufacturing. Titanium and zirconia are the most representative materials. Recent study *in vivo* show that development of bacteria is similar in connection with zirconia or titanium abutment [77].

14

b. Biological and clinical implication

. Relation between intra-implant bacteria and inflammation

Periimplant bone resorption has a multi-factorial aetiology, but the presence of a microgap between implant and abutment closed to the crestal bone (bone level system) is classically associated to inflammatory cells infiltrate [78, 79]. This observation doesn't exist when there is no microgap as is the case for implants with trans-gingival collar (tissue level implants). Inflammation has been highlighted in pre-clinical studies, even if implant are put in good conditions, with a satisfactory hygiene [72, 80-86].

For Brogini et al., the persistence over time of inflammation suggests a local chemotaxis, linked to living bacteria existing in the connection [87, 88]. Polymorphonuclear neutrophils are the most stimulated cells during inflammatory reaction. Plasmaocytes and lymphocytes are also found nearby implant-abutment interface. Without contamination of the microgap, inflammatory cells are not present. In addition LPS secreted by bacteria participate to pre-osteoclasts survival, disturbing inflammatory cytokine (IL-6) (of healthy cells) incriminated in periodontal diseases. This virulence factor stimulates then bone resorption, and its existence in microgap has a detrimental effect on periimplant crestal bone [89].

. Impact of the position of microgap on inflammation

The more the connection sub-crestal is placed, the more the concentration of neutrophils nearby and up to the microgap is important. Position of microgap has a role in inflammatory reaction intensity and contributes indirectly to bone destruction when it is placed subcrestally. There is only few or no bone destruction when connection is more coronal. Results of

15

Brogini et al. has shown existence of a link between intensity of periimplant inflammatory reaction and importance of bone destructor [87].

. Impact of the shape of connection on inflammation

Hollow spaces provide anaerobic conditions in which bacteria may grow and release immunogenic pathogens. In a systemic review, Schmitt et al. show that internal coronal connection has less opening and more sealing than other connections *in vitro*, even if the connection is deeply buried in implant [47, 90], and Morse taper is the connection with the best seal [91]. This type of connection could limit inflammation.

Platform switching offsets the implant-abutment interface horizontally toward the inner part of implant [92]. The risk of bone loss is then limited. However, Survival and success implant rates of this kind of assembly are similar to other connections *in vivo*.

. Relation between presence of bacteria and periimplantitis

Some authors have found that *A. actinomycetemcomitans* and bacteria from the orange and red complexes are present in a healthy implant sulcus, 10 years after implant placement [93]. In Cosyn et al. study, implant were not in periimplantitis situation. However, bacteria (as *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *L. buccalis*, *P. micro*, *P. melaninogenica*, and *Treponema denticola*) are observed in hollow spaces of some of them. The authors suggest that this reservoir can participate to the initiation of periimplantitis when total amount of bacteria become too important, even if implants are in healthy environment for many years [94]. This could explain inefficiency of surgical treatments because sulcus continues to be contaminated by bacteria that are present inside the connection.

Histologic analysis of implants removed after an advanced periimplantitis shows a very high quantity of bacteria in the microgap between implant and abutment [94].

16

In fact, even if an older review show that microbial leakage is not correlated to the implant-abutment interface size [95], today, presence of this contamination next to crestal bone is considered as a risk factor of the implant success and periimplantitis as confirmed by recent articles and reviews [76, 96].

4. Disinfection and sealing of the microgap between implant and abutment

Link between periimplant inflammation and presence of a contaminated microgap can be assessed studying efficiency of different devices that may seal or disinfect the microgap.

Silicon and gutta-percha seals have been placed in implant-abutment connection [23, 97-102].

An *in vitro* study have shown that silicon seals provided hermeticity against bacteria 2 months after placement in static conditions [29]. However, this study doesn't evaluate their ageing correlated to mechanical strength and salivary environment.

Among all the suggestions, chlorhexidine-based gels, varnishes or solution have been also assessed, with concentrations varying between 0.2% to 1% [103-106]. Evaluations are undertaken for 2 to 6 months, and show that these gels decrease the peritopathogens concentration. However, these studies are realized in a short-term period and today, there is not any evaluation of the efficiency of these kinds of gel on a more long-term period.

Another retrospective *in vitro* 16-years study compared abutment sealed with conventional cement directly in implant with classical abutment screw-retained [107]. Measurements of external microgap were 40 μm for screwed abutment, against 60 μm for cemented abutments.

17

However, bacteria are not detected in cemented connections, contrary to the screwed abutments as shown in others studies [40, 107, 108].

Sealing of the connection with a deformable biomaterial or an antiseptic gel limits bacterial penetration and subsequently the corresponding inflammatory reaction. Today, all published studies are only on a short-term period and don't evaluate the resistance of the seal to degradation in oral conditions (saliva, occlusal strains...). A biomaterial that could fill the connection, without blocking insertion of abutment in implant, is an interesting clinical perspective to develop.

Conclusion

1. The connection between implant and abutment is less than 1 μm for the most accurate systems in static studies, but it's opening in a dynamic situation, permitting then a microbial colonization.
2. Because of their shape, internal connections are opening less under occlusal forces, especially with Morse cones, but no connection seems completely impervious to bacteria.
3. Internal colonization depends on the quality of the prosthetic suprastructure.
4. Clinical procedures need to be followed to assemble prosthetic component. The manipulation of the screw has to be respected, and the screw access channel should be closed hermetically.

18

5. Position of the external microgap has an influence on gingival tissues because of the microbial leakage. Shifting of this connection, with platform switching or more coronal placement, take away the risk of inflammation of marginal crestal bone.
6. Gels or mechanical devices that are used to seal the connection are efficient only in short-term. Only cement could have efficiency.

19

References

- Giovannoli, J.L. and S. Renvert, *Peri-implantitis*, ed. Q. International, 2012.
- Zitzmann, N.U. and T. Berglundh, *Definition and prevalence of peri-implant diseases*. J Clin Periodontol, 2008, **35**(8 Suppl): p. 286-91.
- Lindhe, J. and J. Meyje, *Peri-implant diseases: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology*. J Clin Periodontol, 2008, **35**(8 Suppl): p. 282-5.
- Stacchi, C., et al., *The 16th Baltic Osseointegration Academy and Lithuanian University of Health Sciences Consensus Conference 2016. Summary and Consensus Statements: Group 1 - Peri-Implantitis Aetiology, Risk Factors and Pathogenesis*. J Oral Maxillofac Res, 2016, **7**(3): p. e7.
- Pranskunas, M., et al., *Influence of Peri-Implant Soft Tissue Condition and Plaque Accumulation on Peri-Implantitis: a Systematic Review*. J Oral Maxillofac Res, 2016, **7**(3): p. e2.
- Stacchi, C., et al., *Risk Factors for Peri-Implantitis: Effect of History of Periodontal Disease and Smoking Habits. A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Oral Maxillofac Res, 2016, **7**(3): p. e3.
- Guobis, Z., I. Pacauskiene, and I. Astramskiute, *General Diseases Influence on Peri-Implantitis Development: a Systematic Review*. J Oral Maxillofac Res, 2016, **7**(3): p. e5.
- Maminskas, J., et al., *The Prosthetic Influence and Biomechanics on Peri-Implant Strain: a Systematic Literature Review of Finite Element Studies*. J Oral Maxillofac Res, 2016, **7**(3): p. e4.
- Bouazza-Juanes, K., et al., *Effect of platform switching on the peri-implant bone: A finite element study*. J Clin Exp Dent, 2015, **7**(4): p. e483-8.
- Paul, S., T.V. Padmanabhan, and S. Swarup, *Comparison of strain generated in bone by "platform-switched" and "non-platform-switched" implants with straight and angulated abutments under vertical and angulated load: a finite element analysis study*. Indian J Dent Res, 2013, **24**(1): p. 8-13.
- Sahabi, M., et al., *Biomechanical effects of platform switching in two different implant systems: a three-dimensional finite element analysis*. J Dent (Tehran), 2013, **10**(4): p. 338-50.
- Xia, H., et al., *The effect of platform switching on stress in peri-implant bone in a condition of marginal bone resorption: a three-dimensional finite element analysis*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2013, **28**(3): p. e122-7.
- Martini, A.P., et al., *Straight and angulated abutments in platform switching: influence of loading on bone stress by three-dimensional finite element analysis*. J Craniofac Surg, 2012, **23**(2): p. 415-8.
- Arun Kumar, G. B. Mahesh, and D. George, *Three dimensional finite element analysis of stress distribution around implant with straight and angled abutments in different bone qualities*. J Indian Prosthodont Soc, 2013, **13**(4): p. 466-72.
- Sotto-Maior, B.S., et al., *Influence of crown-to-implant ratio, retention system, restorative material, and occlusal loading on stress concentrations in single short implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012, **27**(3): p. e13-8.
- Santiago Junior, J.F., et al., *Stress analysis in bone tissue around single implants with different diameters and veneering materials: a 3-D finite element study*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2013, **33**(8): p. 4700-14.
- C. I.C., et al., *Finite element modelling of implant designs and cortical bone thickness on stress distribution in maxillary type IV bone*. Comput Methods Biomech Biomed Engin, 2014, **17**(5): p. 516-26.

20

18. Chou, I.C., S.Y. Lee, and C.P. Jiang. *Effects of implant neck design on primary stability and overload in a type II mandibular bone*. Int J Numer Method Biomed Eng, 2014. **30**(11): p. 1223-37.
19. Savadi, R.C., et al. *Influence of Implant Surface Topography and Loading Condition on Stress Distribution in Bone Around Implants: A Comparative 3D FEA*. J Indian Prosthodont Soc, 2011. **11**(4): p. 221-31.
20. Caetano, C.R., et al. *Overdenture retaining bar stress distribution: a finite-element analysis*. Acta Odontol Scand, 2015. **73**(4): p. 274-9.
21. Farina, A.P., et al. *An in vitro comparison of joint stability of implant-supported fixed prosthetic superstructures retained with different prosthetic screws and levels of fit under masticatory simulation conditions*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. **27**(4): p. 833-8.
22. Biron, P.P. *Evaluation of machining accuracy and consistency of selected implants, standard abutments, and laboratory analogs*. Int J Prosthodont, 1995. **8**(2): p. 162-78.
23. Jansen, V.K., G. Conrads, and E.J. Richter. *Microbial leakage and marginal fit of the implant-abutment interface*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1997. **12**(4): p. 527-40.
24. Baixe, S., et al. *Microgap between zirconia abutments and titanium implants*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2010. **25**(3): p. 455-60.
25. Saidin, S., et al. *Effects of different implant-abutment connections on micromotion and stress distribution: prediction of microgap formation*. J Dent, 2012. **40**(6): p. 467-74.
26. Zippich, H., et al. *Micromovements at the implant-abutment interface: measurement, causes, and consequences*. Implantologie, 2007. **15**: p. 31-46.
27. Rack, A., et al. *In vitro synchrotron-based radiography of micro-gap formation at the implant-abutment interface of two-piece dental implants*. J Synchrotron Radiat, 2010. **17**(2): p. 289-94.
28. do Nascimento, C., et al. *Influence of repeated screw tightening on bacterial leakage along the implant-abutment interface*. Clin Oral Implants Res, 2009. **20**(12): p. 1394-7.
29. Duarte, A.R., et al. *In vitro sealing ability of two materials at five different implant-abutment surfaces*. J Periodontol, 2006. **77**(11): p. 1828-32.
30. Peppalardo, S., et al. *Dental implants with locking taper connection versus screwed connection: microbiologic and scanning electron microscope study*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007. **20**(1 Suppl 1): p. 13-7.
31. Tesmer, M., et al. *Bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study*. J Periodontol, 2009. **80**(12): p. 1991-7.
32. Dias, E.C., et al. *Evaluation of implant-abutment microgap and bacterial leakage in five external-hex implant systems: an in vitro study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. **27**(2): p. 346-51.
33. Steinebrunner, L., et al. *In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of different implant systems*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2005. **20**(6): p. 875-81.
34. Barbosa, R.E., et al. *Bacterial culture and DNA Checkerboard for the detection of internal contamination in dental implants*. J Prosthodont, 2009. **18**(5): p. 376-81.
35. do Nascimento, C., et al. *Bacterial leakage along the implant-abutment interface of premachined or cast components*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2008. **37**(2): p. 177-80.
36. Baggé, L., et al. *Microbiological evaluation of bacterial and mycotic seal in implant systems with different implant-abutment interfaces and closing torque values*. Implant Dent, 2013. **22**(4): p. 344-50.
37. Harder, S., et al. *Molecular leakage at implant-abutment connection—in vitro investigation of tightness of internal conical implant-abutment connections against endotoxin penetration*. Clin Oral Investig, 2010. **14**(4): p. 427-32.
38. Harder, S., et al. *Analysis of the intracanal microflora of two-piece dental implants*. Clin Oral Investig, 2013. **17**(4): p. 1135-42.
39. Scatano, A., et al. *Sealing capability of implant-abutment junction under cyclic loading: a toluidine blue in vitro study*. J Appl Biomater Funct Mater, 2015. **13**(3): p. e293-5.
40. Pianelli, A., et al. *Fluids and microbial penetration in the internal part of cement-retained versus screw-retained implant-abutment connections*. J Periodontol, 2001. **72**(9): p. 1146-50.
41. do Nascimento, C., et al. *Bacterial leakage along the implant-abutment interface: culture and DNA Checkerboard hybridization analyses*. Clin Oral Implants Res, 2012. **23**(10): p. 1168-72.
42. do Nascimento, C., et al. *In vitro evaluation of bacterial leakage along the implant-abutment interface of an external-hex implant after saliva incubation*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011. **26**(4): p. 782-7.
43. Coelho, P.G., et al. *In vitro evaluation of the implant abutment connection sealing capability of different implant systems*. J Oral Rehabil, 2008. **35**(12): p. 917-24.
44. Teixeira, W., et al. *Microleakage into and from two-stage implants: an in vitro comparative study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011. **26**(1): p. 56-62.
45. Decotto, M.A., A.D. Salvoni, and T. Wassall. *In vitro microbiological bacterial seal analysis of the implant abutment connection in Morse taper implants: a comparative study between 2 abutments*. Implant Dent, 2010. **19**(2): p. 158-66.
46. Rismanchian, M., et al. *Evaluation of microgap size and microbial leakage in the connection area of 4 abutments with Streamann (ITI) implant*. J Oral Implantol, 2012. **38**(6): p. 677-85.
47. Schmitt, C.M., et al. *Performance of conical abutment (Morse Taper) connection implants: a systematic review*. J Biomed Mater Res A, 2014. **102**(2): p. 552-74.
48. Aloise, J.P., et al. *Microbial leakage through the implant-abutment interface of Morse taper implants in vitro*. Clin Oral Implants Res, 2010. **21**(3): p. 328-35.
49. Resende, C.C., et al. *Influence of the Prosthetic Index Into Morse Taper Implants on Bacterial Microleakage*. Implant Dent, 2015.
50. D'Ercole, S., et al. *Microleakage of bacteria in different implant-abutment assemblies: an in vitro study*. J Appl Biomater Funct Mater, 2015. **13**(2): p. e174-80.
51. Dibart, S., et al. *In vitro evaluation of the implant-abutment bacterial seal: the locking taper system*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2005. **20**(5): p. 732-7.
52. Tripodi, D., et al. *An in vitro investigation concerning the bacterial leakage at implants with internal hexagon and Morse taper implant-abutment connections*. Implant Dent, 2012. **21**(4): p. 335-9.
53. D'Ercole, S., et al. *Implants with internal hexagon and conical implant-abutment connections: an in vitro study of the bacterial contamination*. J Oral Implantol, 2014. **40**(1): p. 30-6.
54. Ramieri, R., et al. *The bacterial sealing capacity of Morse taper implant-abutment systems in vitro*. J Periodontol, 2015. **86**(5): p. 696-702.
55. Jaworski, M.E., et al. *Analysis of the bacterial seal at the implant-abutment interface in external-hexagon and Morse taper-connection implants: an in vitro study using a new methodology*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012. **27**(5): p. 1091-5.
56. Mishra, S.K., R. Chowdhary, and S. Kumari. *Microleakage at the Different Implant Abutment Interface: A Systematic Review*. J Clin Diagn Res, 2017. **11**(6): p. Ze10-ze15.
57. Assenza, B., et al. *Bacterial leakage in implants with different implant-abutment connections: an in vitro study*. J Periodontol, 2012. **83**(4): p. 491-7.

58. da Silva-Neto, J.P., et al., *Influence of methodologic aspects on the results of implant-abutment interface microleakage tests: a critical review of in vitro studies*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012, 27(4): p. 793-800.
59. Gross, M., I. Abramovich, and E.I. Weiss, *Microleakage at the abutment-implant interface of osseointegrated implants: a comparative study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999, 14(1): p. 94-100.
60. D'Ercolo, S., et al., *Bacterial leakage in Morse Cone internal connection implants using different torque values: an in vitro study*. Implant Dent, 2014, 23(2): p. 175-9.
61. Ramos, M.B., et al., *Evaluation of UCLA implant-abutment sealing*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2014, 29(1): p. 113-20.
62. Quirynen, M., et al., *Microbial penetration along the implant components of the Branemark system. An in vitro study*. Clin Oral Implants Res, 1994, 5(4): p. 239-44.
63. Guindy, J.S., et al., *Bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained implant-borne crowns in vitro*. J Oral Rehabil, 1998, 25(6): p. 403-8.
64. Koutouzis, T., et al., *The effect of dynamic loading on bacterial colonization of the dental implant fixture-abutment interface: an in vitro study*. J Oral Implantol, 2014, 40(4): p. 432-7.
65. Ricomini Filho, A.P., et al., *Prelux loss and bacterial penetration on different implant-abutment connection systems*. Braz Dent J, 2010, 21(2): p. 123-9.
66. Larrucea Verdugo, C., et al., *Microleakage of the prosthetic abutment-implant interface with internal and external connection: in vitro study*. Clin Oral Implants Res, 2014, 25(9): p. 1078-83.
67. do Nascimento, C., et al., *Leakage of saliva through the implant-abutment interface: in vitro evaluation of three different implant connections under unloaded and loaded conditions*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2012, 27(3): p. 551-60.
68. Koutouzis, T., et al., *Bacterial colonization of the implant-abutment interface using an in vitro dynamic loading model*. J Periodontol, 2011, 82(4): p. 613-8.
69. Koutouzis, T., H. Gadalla, and T. Lundgren, *Bacterial Colonization of the Implant-Abutment Interface (AI) of Dental Implants with a Sloped Marginal Design: An in-vitro Study*. Clin Implant Dent Relat Res, 2015.
70. do Nascimento, C., et al., *Bacterial diversity of periodontal and implant-related sites detected by the DNA Checkerboard method*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2011, 30(12): p. 1607-13.
71. Keller, W., U. Bragger, and A. Mombelli, *Peri-implant microflora of implants with cemented and screw retained suprastructures*. Clin Oral Implants Res, 1998, 9(4): p. 209-17.
72. Quirynen, M. and D. van Steenberghe, *Bacterial colonization of the internal part of two-stage implants. An in vivo study*. Clin Oral Implants Res, 1993, 4(3): p. 158-61.
73. Rosenberg, E.S., J.P. Torosian, and J. Slots, *Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants*. Clin Oral Implants Res, 1991, 2(3): p. 135-44.
74. Cosyn, J., et al., *The peri-implant sulcus compared with internal implant and suprastructure components: a microbiological analysis*. Clin Implant Dent Relat Res, 2011, 13(4): p. 286-95.
75. Callan, D.P., C.M. Cobb, and K.B. Williams, *DNA probe identification of bacteria colonizing internal surfaces of the implant-abutment interface: a preliminary study*. J Periodontol, 2005, 76(1): p. 115-20.
76. Quirynen, M., et al., *Initial subgingival colonization of 'pristine' pockets*. J Dent Res, 2005, 84(4): p. 340-4.
77. Salhoğlu, U., et al., *Bacterial adhesion and colonization differences between zirconium oxide and titanium alloys: an in vivo human study*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2011, 26(1): p. 101-7.
78. Adell, R., et al., *A 15-year study of osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw*. Int J Oral Surg, 1981, 10(6): p. 387-416.
79. Adell, R., et al., *Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures (I). A 3-year longitudinal prospective study*. Int J Oral Maxillofac Surg, 1986, 15(1): p. 39-52.
80. Berglundh, T. and J. Lindhe, *Dimension of the periimplant mucosa. Biological width revisited*. J Clin Periodontol, 1996, 23(10): p. 971-3.
81. Brogini, N., et al., *Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface*. J Dent Res, 2003, 82(3): p. 232-7.
82. Hermann, J.S., et al., *Crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged and submerged implants in the canine mandible*. J Periodontol, 2000, 71(9): p. 1412-24.
83. Hermann, J.S., et al., *Biologic Width around one- and two-piece titanium implants*. Clin Oral Implants Res, 2001, 12(6): p. 559-71.
84. Hermann, J.S., et al., *Crestal bone changes around titanium implants. A radiographic evaluation of unloaded nonsubmerged and submerged implants in the canine mandible*. J Periodontol, 1997, 68(11): p. 1117-30.
85. Hermann, J.S., et al., *Crestal bone changes around titanium implants: a methodologic study comparing linear radiographic with histometric measurements*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2001, 16(4): p. 475-85.
86. Hermann, J.S., et al., *Influence of the size of the intergap on crestal bone changes around titanium implants. A histometric evaluation of unloaded non-submerged implants in the canine mandible*. J Periodontol, 2001, 72(10): p. 1372-83.
87. Brogini, N., et al., *Peri-implant inflammation defined by the implant-abutment interface*. J Dent Res, 2006, 85(3): p. 473-8.
88. Persson, L.G., et al., *Bacterial colonization on internal surfaces of Branemark-system implant components*. Clin Oral Implants Res, 1996, 7(2): p. 90-5.
89. Ujite, Y., R. Todescan, and J.E. Davies, *Peri-implant crestal bone loss: a putative mechanism*. Int J Dent, 2012, 2012: p. 742439.
90. Canulle, L., et al., *Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading*. Clin Oral Implants Res, 2015, 26(4): p. 426-34.
91. Romanos, G.E., et al., *Bacterial Composition at the Implant-Abutment Connection under Loading in vivo*. Clin Implant Dent Relat Res, 2016, 18(1): p. 138-45.
92. Lazzara, R.J. and S.S. Porter, *Platform switching: a new concept in implant dentistry for controlling postrestorative crestal bone levels*. Int J Periodontics Restorative Dent, 2006, 26(1): p. 9-17.
93. Leonhardt, A., et al., *Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters*. Clin Oral Implants Res, 2002, 13(2): p. 127-32.
94. Covani, U., et al., *Bacterial plaque colonization around dental implant surfaces*. Implant Dent, 2006, 15(3): p. 298-304.
95. Passos, S.P., et al., *Implant-abutment gap versus microbial colonization: Clinical significance based on a literature review*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2013, 101(7): p. 1321-8.
96. Sassi, Y. and D.L. Cochran, *Implant-Abutment Connections: A Review of Biologic Consequences and Peri-implantitis Implications*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2017, 32(6): p. 1296-1307.

97. Proff, P., et al., *Bacterial colonisation of interior implant threads with and without sealing*. Folia Morphol (Warsz), 2006. **65**(1), p. 75-7.
98. Rimondini, L., et al., *Internal contamination of a 2-component implant system after occlusal loading and provisionally luted reconstruction with or without a washer device*. J Periodontol, 2001. **72**(12), p. 1652-7.
99. Pimentel, A.C., et al., *In vivo effectiveness of silicone gel sheets as barriers at the inner microgap between a prosthetic abutment and an external-hexagon implant platform*. Int J Oral Maxillofac Implants, 2014. **29**(1), p. 121-6.
100. Park, S.D., et al., *Microleakage of different sealing materials in access holes of internal connection implant systems*. J Prosthet Dent, 2012. **108**(3), p. 173-80.
101. Neyak, A.G., et al., *Efficacy of antibacterial sealing gel and O-ring to prevent microleakage at the implant abutment interface: an in vitro study*. J Oral Implantol, 2014. **40**(1), p. 111-4.
102. Cavalcanti, A.G., et al., *Efficacy of Glna-Percha and Polyvinylfluorocethylene Tape to Microbiologically Seal the Screw Access Channel of Different Prosthetic Implant Abutments*. Clin Implant Dent Relat Res, 2016. **18**(4), p. 778-87.
103. D'Ercole, S., et al., *Microbiological and biochemical effectiveness of an antiseptic gel on the bacterial contamination of the inner space of dental implants: a 3-month human longitudinal study*. Int J Immunopathol Pharmacol, 2009. **22**(4), p. 1019-26.
104. Groenendijk, E., et al., *Microbiological and clinical effects of chlorhexidine enclosed in fixtures of 3i-Titanium implants*. Clin Oral Implants Res, 2004. **15**(2), p. 174-9.
105. Paolantonio, M., et al., *Internal decontamination of dental implants: an in vivo randomized microbiologic 6-month trial on the effects of a chlorhexidine gel*. J Periodontol, 2008. **79**(8), p. 1419-25.
106. Bestiro, C.E., et al., *Prevention of bacterial leakage into and from prefabricated screw-retained crowns on implants in vitro*. Int J Oral Maxillofac Implants, 1999. **14**(5), p. 654-60.
107. Scarano, A., et al., *A 16-year study of the microgap between 272 human titanium implants and their abutments*. J Oral Implantol, 2005. **31**(6), p. 269-75.
108. Mencia, F., et al., *Salivary bacterial leakage into implant-abutment connections: preliminary results of an in vitro study*. Eur Rev Med Pharmacol, 2016. **20**(12), p. 2476-83.

Tables

1. Static studies *in vitro*

Publication	Implant system (Implant + corresponding abutment)	Type of connection	Direction of microleakage observation		Microbiological strain or type of dye	Maximal Period of incubation	Problematic/Method Microbiological observations
			Ext → int	Int → ext			
1. Jansen et al. 1997 JOMI	Ankylos (Dentsply-Friadent) Frialit-2 and IMZ (Dentsply-Friadent) Bonafit conical and synOcta (Straumann) Brånemark (Nobelbiocare) Hati (Leibniz) Calcitek Osseospeed (Astratech) Semados (BegoSemados)	Conical intern Intern Internal hexagon External hexagon	X	X	<i>E. coli</i>	14 D	Microleakage evaluation between implant and abutment: cloudiness of media and SEM views. Bacterial colonisation for all systems Non colonisation with a silicon washer
2. Barbosa et al. 2009 JP	<i>Implant</i> : SIN, Sao Paulo, Brazil <i>Abutment</i> : pre-machined co-cr. alloy with plastic sleeve cast with -ni-cr alloy	ext. hex		X	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	14 D	Bacterial microleakage: penetration along the implant component (sampling and DNA checkerboard detection) and turbidity of media DNA checkerboard method highlight more bacteria than classical method
3. do Nascimento et al. 2011 JOMI	Revolution Implant, SIN Co-Cr alloy abutment	Ext hex	X		Human saliva (11 bacteria assessed) <i>A. actinomycetemcomitans</i> and <i>Capitocytophaga. gingivalis</i> are the most represented.	7D in human saliva	Penetration of microorganism in connection Connection sampling, then DNA checkerboard Contamination of connection
4. do Nascimento et al. 2012 COIR	<i>Implant</i> : Revolution Implant, SIN, Brazil <i>Abutment</i> : hexagonal UCLA, SIN	Ext. hex	X		<i>C. gingivalis</i> <i>S. mutans</i> <i>V. parvula</i>	7 D	Presence of bacteria with DNA checkerboard or culture method (with human saliva) Detection of bacteria with both methods a the same frequency (40%)

26

5. Pappalardo et al. 2007 Abstract Int Journ Immunopatholpharmacol	Bicon Sweden-Martina	Morse cone (locking taper, diam. 3.5) (diameters: 3,8-4,7-5,7-6,7)	X		<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. pyogenes</i>	no data	SEM analysis Existence of an important correlation between diameter of connection and bacterial colonization Influence of connection design
6. Dias et al. 2012 JOMI	Neodent implant system Dentoflex Titanium fix SIN Conexão	External hexagon		X	<i>E. coli</i> ATCC 25922	24h → 7 D	SEM analysis - Only 25% of one system shows microleakage (Dentoflex) No correlation between microgap < 3 µm and microleakage
7. Do Nascimento et al. 2008 JOMI	SIN, Sao Paulo, Brazil	External hex.		X	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	14 D	Bacterial colonization of medium for premachined or cast abutment; visual evaluation 11,1 % of microleakage (1/9 assembly) for both systems
8. Do Nascimento et al. 2009 COIR	Revolution Implant, SIN- Sao Paulo, Brazil	External hex.	X		<i>S. mutans</i> ATCC 25175	14 D	Impact of loosening/screwing twice an abutment DNA Checkerboard method evaluate the total number of bacteria 1 tightening torque: 30% of assemblies contaminated 2 tightening torques: 70% of assemblies contaminated Higher quantities of bacteria for 2 screwings
9. Baggi et al. 2013 Implident	<i>Group 1</i> : Ankylos Astra Tech GTB (Plan OneHealth) Artridge and EZ (Maga'Gen) Bone Level (Straumann) CC (Nobel Active, Nobel Biocare) <i>Group 2</i> : XiVE (Dentsply Implant) Replace trilobe and Brånemark (Nobel Biocare)	Tube in tube (G1) Flat-to-flat (G2)	X	X	Bacteria: <i>S. sanguinis</i> ATCC 10536 <i>F. nucleatum</i> , ATCC 25586 <i>A. odonolyticus</i> ATCC 17929 Yeasts: <i>C. albicans</i> ATCC 66027 <i>C. glabrata</i> ATCC 64677	7 D	Bacterial colonization of medium and microgap according to torque and system → number of CFU on agar plates + SEM views Tube in tube more resistant to microbial colonization Manufacturer tightening torque allows less microleakage than lower torques.
10. Harder et al. 2010 Clin. Oral Invest.	Astratech Ankylos plus	Conical intern antiroational Morse cone		X	Lipopolysaccharide (from <i>S. enterica</i>) ATCC 9700	5 mn → 7D	Detection of LPS in media at different times Contamination at 5 mn for Ankylos samples Contamination at various times for Astra samples (higher tightness for Astra assemblies)

27

11. Coelho et al. 2008 Journal of Oral Rehabil	Replace, Straumann, Intralock	Internal trilobed, Internal cone/hexagon Modified internal hexagon,		X	Toluidine blue	6h → 6 D	Sealing capability of different system Spectrophotometric analysis: Microleakage for all connections
12. Teixeira et al. 2011 JOMI	Titamax CM and II Plus (Neodent)	CM : Morse taper II Plus : internal hexagon	X	X	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	7D (Int → Ext) 14 D (Ext → Int)	Sampling of connections, then making an enzymatic reaction on agar plates with bacteria: Microleakage for both systems (no statist. Differences) Int_hexagon: 2 directions: 100% Int_conical connection: Ext → int: 70 % Int → ext: 77,7%
13. Deconto et al. 2010 Impl Dent	Titamax, Neodent, Brazil	Morse taper		X	<i>E. coli</i> ATCC 25922	7 D	Microleakage for a solid abutment (one piece) vs passing bolt screw (2-pieces): turbidity of media Microleakage for both groups (30 % for one piece and 40 % for 2-pieces). No significative differences
14. Rismanshian et al. 2012 JOI	Straumann	intern connection : Solid (morse cone), SynOcta (octagone + morse cone) Cast on Castable		X	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	14 D	SEM view and contamination of medium (CFU on agar plates) Microleakage is comparable for the 4 abutments
15. Aloise et al. 2010 COIR	Bicon, Ankylos	Conical intern		X	<i>S. sanguinis</i> biotype II ATCC 10557	14 D	Leakage through interface of morse taper implant 20% culture media contaminated for both systems
16. Resende et al. 2015 Implant dent	Implant: Alvin CM, Neodent Abutments: 20 solid CM universal post without index 10 abutments CM exact universal post	Morse taper without index Morse taper with index	X	X	<i>S. sanguinis</i> (Int → Ext) (ATCC 10556) <i>F. nucleatum</i> (Ext → Int)	7 D (Int → Ext) 30 D (Ext → Int)	Bacterial microleakage with/without index on a morse taper Very bacteria few detected (10%) No influence of indexation
17. D'Ereole et al. 2015 J Appl Biomater Funct Mater	Implant: Sweden Marima, Italia (Xhono straight and TG implants)	Morse taper interface		X	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) <i>A. actinomycetemcomitans</i> (ATCC 29522)	14 D	Turbidity of media + SEM views No leakage for both systems

28

18. Ranieri et al. 2015 JOP	Ankylos, dentsply implant Neodent, Brazil Conexao, Brazil Osteoft, DSP Biomedical, Brazil	Morse cone from 4 systems	X		<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	2 D	Detection of bacteria in the microgap with SEM views All assemblies are contaminated (Only the body of abutment for Ankylos group)
19. Jaworski et al. 2012 JOMI	Neodent Implant System (Titamax TI cortical and Titamax CM)	External hex. Morse taper		X	<i>E. coli</i> ATCC 25922	14 D	Detection of microleakage (sample of medium in culture on petri dishes) 60% of external connection contaminated 30% of internal connection contaminated
20. Assenza et al. 2012 Journal of Oral Perio.	Replace Select, Nobel Bone System, Italia Ankylos plus	Screwed trilobed Cemented Internal conical	X	X	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	28 D	Leakage with different connections Turbidity of media: Cement retained connection: hermeticity (0/10) Internal connection: Low permeability (1/10) Trilobed connection: high microleakage (6/10)
21. da Silva Neto et al. 2012 J App Oral Science	Neodent implant system	External hexagon		X	<i>E. coli</i> ATCC 35218	14 D	Bacterial colonization of medium in function of tightening torque Weak torque don't statistically affect microleakage, but no media is contaminated with recommended torque 20% for a 10 N.cm torque 10% for a 20 N.cm torque 0% for a 32 N.cm torque Bacteria remain viable at 32N.cm
22. Gross et al. 1999 JOMI	Spline (Salzer Calcitek) Ceraone (Nobel Biocare) Steri-Oss 3I ITI	Spline- ext. hex ext. hex ext. hex morse taper	X		Particle free gentian violet	80 mn under a 2 bars pressure	Penetration of dye according to tightening torque (10N.cm, 20 N.cm, manufacturer tightening torque) Decreasing of leakage with an increase torque
23. D'Ereole et al. 2014 Impl dent.	Biological Conical Connection, Oralplant, Cordenons, PD, Italia	conical intern (cone morse taper)		X	<i>P. aeruginosa</i> (PS) ATCC 27853 <i>A. actinomycetemcomitans</i> (AA) ATCC 29522	14 D	Contamination of medium according to torque Reduction of microleakage with increase of torque values (10 and 20 N.cm : 2/10 assemblies contaminated) (40 N.cm : assemblies contaminated)

29

24. Ramos et al., 2014 JOMI	<i>Implant:</i> SIN, Sao Paulo, Brazil <i>UCLA abutment:</i> Microplant, Signo vices, Titanium fix, Bioinnovation, Impladen	External hex.	X		Toluidine blue	6 D	Effect of presence of premachined cobalt/chromium abutment on sealing (SEM view) Complete leakage for all systems at 6 days
25. Quirynen et al. 1994 COIR	<i>System:</i> Brånemark (32 assemblies)	External hex.	X		Gram + cocci Gram – rods <i>F. nucleatum</i> identified (API system)	7D	Immersion of colonization between assemblies partially and completely immersed Sampling and culture. Counting of CFU Immersion in a bacterial broth. Anaerobic conditions Less bacteria for partially immersed assemblies
26. Guindy et al. 1998 Journal of Oral Rehab.	<i>Implant:</i> Ha-Ti implant (Mathis AG, betlach, Switzerland) <i>Crown:</i> (V Supergold, Métaux Précieux SA, Neuchâtel, Switzerland)	Internal hex.	X	X	<i>S. aureus</i> ZIB 6901	120 h	Detection of bacteria (microgap alone or assembly completely immersed in medium) All samples are contaminated at 120h when microgap is immersed
27. Dibart et al. 2005 JOMI	Bicon	Conical intern (morse cone)	X	X	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43718 <i>S. oralis</i> ATCC 35037 <i>F. nucleatum</i> ATCC 10953	24h (ext → int) 72 h (int → ext)	Evaluation of sealing ability of a morse cone: SEM views and ability of media to contaminate agar plates. Ext → int: SEM view Int → ext: agar No bacterial seepage in both conditions
28. Tripodi et al. 2012 implant dent	Universal II HI and CM (implacil de Bortoli)	HI: internal hexagon CM: conical intern (cone morse taper)		X	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522	28 D	Turbidity of media <u>HI</u> : 3/5 (PS); 2/5 (AA) <u>CM</u> : 2/5 (PS); 0/5 (AA)

30

29. D'Ercole et al. 2014 Journ. Oral Implant	Cone Morse Implant and Universal abutment (Dentoflex, Brazil) Internal Hexagon Implant and fixed-air abutment (Dentoflex, Brazil)	Morse Cone (morse taper) Internal hexagon		X	<i>P. aeruginosa</i> (PS) <i>A. actinomycetemcomitans</i> (AA)	28 D	Turbidity of media Less microleakage with cone morse taper <u>HI</u> : 3/5 (PS); 2/5 (AA) <u>CM</u> : 3/5 (PS); 2/5 (AA)
--	--	--	--	---	---	------	--

31

2. Dynamic studies *in vitro*

Publication	System	Type of connection	Direction of colonization		Microbiological strain or type of dye	Maximal Period of incubation Number of cycles	Problematic and microbiological observations
			ext → int	int → ext			
1. Steinbruner et al. 2005 JOMI	1. Brånemark System, Nobel Biocare 2. Frialit-2, Dentsply Friadent 3. Camlog, Altatec 4. Replace Select, Nobel Biocare 5. Screw-Vent, Zimmer dental	1. Ext. hex 2. Guide rod with integrated hex and silicon washer 3. Tube in tube with cam-slot fixation 5. Int. hex with friction fit		X	<i>E. coli</i> ATCC 11229	1,200,000 cycles at 120 N	Bacterial leakage in function of dynamic loading Leakage for all systems, depending on the connection and the duration of loading.
2. do Nascimento et al. 2012 JOMI	Sistema de implante nacional	External hex. Internal hex Morse cone	X		32 human bacterial species from saliva assessed	7 D at 35°C (for both groups) 500,000 cycles at 120 N (for dynamic group)	Leakage of saliva through connection with/without external forces applied on abutment. DNA checkerboard technique. Bacteria found in all conditions Morse cone: less bacteria
3. Larrea-Verdugo et al. 2014 COIR	Ossus MG Mozo Grau, Valladolid, Spain MG Mozo Grau inFlex, Valladolid, Spain	External conn. Morse taper	X		Methylene blue	Thermal cycler (2 x 300 cycles)	Different tightening torque, then load cycling and thermocycling. Optical views. Decrease of the microleakage with increasing torque and with morse taper.
4. Scarano et al. 2015 JABFM	G1 : Universal II III and CM G2 : Implacil, De Bortoli, Sao Paulo, Brasil	G1: ext. hex G2: cone morse		X	Toluidine blue	1 to 6x10 ⁶ cycles	Leakage of dye with loading conditions Less leakage for cone morse beyond 3. 10 ⁶ cycles

32

7. Koutousis et al. 2011 JOP	Ankylos, Dentsply Friadent Bone Level, Straumann	G1: Morse taper G2: Four-groove conical internal connection	X		<i>E. coli</i> DH5a	500,000 cycles at 15 N (4th corresponding to 2 years of fixation)	Comparison of bacterial colonization with 2 shapes of internal connection (sampling of the threaded portion of abutment) G1: 14 CFU, 1/14 connections contaminated G2: 184 CFU, 12/14 connections contaminated
4. Ricomini Filho et al. 2010 Braz Dent J	Neodent implant system	ext. hex/ univ. post Morse taper/ univ post Morse taper/ univ post through bolt Locking taper/ standart abut.	X		<i>S. sanguinis</i> NCTC 10904	1000 thermal cycling of 5° and 55° 1,000,000 cycles at 120 N	Bacterial colonization after thermal and mechanical cycling, SEM views and bacterial culture. Detorque values after thermal and mechanical cycling, but no correlation with bacterial penetration. Bacterial presence in all systems except external hexagon, but sampling only in screw hole.
5. Koutousis et al. 2015 JOI	Ossespeed TX, Astra Tech Ossespeed TX Profile, Astra Tech	Morse taper (conventional marginal vs sloped marginal design)	X		<i>E. coli</i> DH5a	500,000 cycles at 160 N (30°)	Comparison of bacterial colonization of internal connection with or without slope marginal design No differences of colonization between marginal shape of implants
6. Koutousis et al. 2014 JOI	Implant-One fixture, Custom Dental Implant, Wis	Morse taper	X		<i>E. coli</i> DH5a	500,000 cycles at 50 N (30°)	Colonization with non loading vs loading conditions Microgap in contact of bacterial media for 5 days, then loading in bacterial suspension. Sampling in the threaded portion. 1/20 implant contaminated in unloaded group 4/20 implant contaminated in loaded group Increase of colonization with loading forces.

33

3. *In vivo* sampling of the connection

Publication	Implant system/type of connection (Implant + corresponding abutment)	Bacteria evaluated or detected	Time after abutment placement	Problematic and Microbiological observations
1. Quirynen et al. 1993 COIR	Brånemark implants (Nobelbiocare) External hexagon – transmucosal abutments	Morphotype of bacteria	> 2 years	Description of morphology of bacteria with phase contrast microscopy. Presence of cocci (86%) and non-motile rods (12%) while motile microorganisms (1%) and spirochetes (0,1%)
2. Cosyn et al. 2011 CIDRR	58 Brånemark implants (Nobelbiocare) in 9 patients	40 species with DNA-DNA hybridation	9,6 years (average)	DNA checkerboard to identify and quantify 40 species Sampling on cotton pellet, sulcus and threads of screw. Bacteria: pellet similar to sulcus, less for screw. Link between bacteria of all compartments Presence of "pathologic" bacteria on healthy implant
3. Quirynen et al. 1994 COIR	Brånemark assemblies Ext. hexagone	Plaque from patients with periodontal	Infection at 7 D	Bacterial penetration along the implant component (sampling, culture, and counting CFU), partially or completely immersed in bacterial media Micro-organisms found in completely immersed assemblies, and at lower number in partially immersed assemblies
4. Callan et al. 2005 IF	54 2-stages hydroxyapatite plasma spray –coated implant from various manufacturers	8 probes for 8 classical pathogens (<i>A.a.</i> , <i>T.f.</i> , <i>F.n.</i> , <i>P.g.</i> , <i>P.t.</i> , <i>C.Rectus.</i> , <i>E. corrodens.</i> , <i>T. denticola</i>)	25 days between healing abutment placement and sampling	DNA analysis of bacteria in connection Few bacteria on healing abutment threads Moderate to high level of bacteria in connections (41,9 to 60,5 % of aggregate percentage)
5. Salthoglu et al. 2011 JOMI	RCT <i>Implants:</i> Ankylos <i>Abutments:</i> titanium and zirconia	<i>Aa</i> and <i>Pg</i> Total number of bacteria	5 weeks after abutment placement	Analyse of flora of connection with RT-PCR No bacterial differences between zirconia and titanium abutments Detection of <i>Pg</i> in both cases

34

6. Persson et al. 1996 COIR	28 Brånemark implants (Nobelbiocare) in 10 patients. EsthetiCone abutments	Facultative anaerobic streptococci, Gram + anaerobic rods (<i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> species)	1 to 8 years after prosthesis placement	Sampling and culture of different part of the connection → Sampling up to the screw head and inside the connection Semi-quantitative estimation of bacteria based on morphology of colonies on blood agar plates Identification by Gram reaction and biochemical test Initial contamination at 1 st , 2 nd step surgery and transmission of microorganisms during function.
7. do Nascimento et al. 2011 EJCMID	Brånemark compatible implant (ext hex.)	18 bacteria	2 months after placement in function	Dental vs implant sites: bacterial evaluation DNA checkerboard Higher bacterial count for peri-implant and peri-dental sites than implant-related sites Higher count of <i>C. Gingivalis</i> , <i>P. Intermedia</i> , <i>P. Nigrescens</i> and <i>P. Nigra</i> . Weak correlation between bacteria from intra implant sites and other sites Strong correlation between periodontal and peri-implant sites
8. Romanos et al. 2016 CIDRR	Morse taper (G.A) (Ankylos plus implant, Dentsply) vs Internal polygonal butt-joint connections (G.B) (Certain Preval Implant, Biomet 3I)	Taxa found GB: <i>Actinomyces</i> group <i>Eubacterium saburreum</i> <i>Fusobacterium periodontium</i> <i>Lautropical mirabilis</i> <i>Prevotella</i> sp. <i>Prevotella tannerae</i> <i>Propionibacterium propionicum</i> <i>Selenomonas sputigena</i> or <i>Selenomonas</i> sp. GA: <i>Ochrobactrum anthropii</i>	2 years for 1 st sampling (decontamination with chlorhexidine just after sampling) 1 month after 1 st sampling for 2 nd sampling	Evaluation of contamination on 2 types of connections of abutments from full-arch restoration with a PCR technique (HOMIM) Evaluation of chlorhexidine (CHX) solution 0.12 % effect after irrigation. G.B : trend to a greatest presence of periodontal pathogens than G.A after decontamination: bacteria found in both groups, and similarities of bacteria. Continuous irrigation with CHX don't seem to be an effective protocol for decontamination
9. Canullo et al. 2015 COIR	G1: External hexagon (Biomet 3I) G2: Double int. hex (Biomet 3I, Certain) G3: Conical connection (Astra Tech)	Total bacterial count and 10 species.	5 years	Microbiological evaluation in connection, perimplant sulcus and along abutment with quantitative real-time PCR. No connection prevents microleakage Less bacteria from red complexes for G3 Lower total bacterial counts inside the connection and in the perimplant sulcus for G2 and G3

35

4. Sealing devices in vitro

Publication	Implant system/type of connection (implant + corresponding abutment)	Sealing biomaterial	Direction of microleakage observation		Bacteria evaluated	Time	Problematic and Microbiological observations
			ext → int	int → ext			
1. Jansen et al. 1997 JOMI	Ankylos (Dentsply-Friadent) Frialit-2 and IMZ (Dentsply-Friadent) Bonelit conical and synOcta (Straumann) Branamark (NobelBiocare) Haiti (Ledermax) Calctek Osseospeed (Astratech) Semados (Bego/Semados)	Silicon washer	x	x	<i>E. coli</i>	14 D	Comparison of bacterial penetration between nothing and with silicone washer for one system (Frialit-2). Culture of the inner part of assemblies Bacterial colonisation for all systems No colonisation with a silicon washer
2. Proff et al. 2006 Folia Morphol	Straumann (implant for orthodontic anchorage)	Gutta-percha	x		<i>P. gingivalis</i> DSM 20709	72h	Ability of gutta-percha for connection sealing Sampling of the abutment and culture at 24h and 72 h. → bacterial growth with or without sealing
3. Duarte et al. 2006 JOP	Connection designs: ext and int. hex. - Master Screw, Conexao Sistemas de Implantes, Brazil - Titamax, Neddent, Brazil - EX, Serson Implant, Brazil - Titanium Fix, AS Technology, Brazil	Varnish of 1% chlorhexidine and thymol (SigmaStat 2.0, Sandel, CA) Silicon material (Cervitec, Vivadent-Ivoclar)	x		<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	63 D	Comparison between 2 sealing gels: sampling the inner part of implant, and culture No differences between gels at 63 days Sealing materials are not able to completely prevent microleakage (both all types of connection assessed)

36

4. Bessimo et al. 1999 JOMI	Ha-Ti implant system (Mathys corporation, Switzerland). Internal connection	Chlorhexidine varnish (Cervitec, Vivodent)	x	x	<i>S. aureus</i> ZIB69	Ext → int 4 weeks (partially submerged) 8 weeks (totally submerged) Int → ext 1 week	Microleakage with chlorhexidine varnish Sampling and culture of the inner part of the assembly. ext → int : contamination for 1/5 totally submerged sample (at 4 week) int → ext : no contamination at 1 week for totally and partially submerged assemblies Few contamination and diffusion of chlorhexidine in a small volume, but MIC no reached.
5. Park et al. 2012 JFD	GS II RBM Fixture, Ostem Implant, Korea	<i>First material</i> : - cotton pellet - silicone sealing material (EZ seal) - silicone (Registil rigid) - gutta-percha (Dia-Pro) <i>Recovering material</i> : - composite resin (Filteck Z250 Universal restaurative)	x		Basic fuchsin dye	Dynamic loading: 16,000 cycles (7 D of mastication at 21N)	Evaluation of penetration of dye through the screw hole access More infiltration with cotton pellets Less infiltration with compacted gutta-percha
6. Piatelli et al. 2001 JOP	Bone system	Cement (resin) : Panavia 21, Kuraray	x		Toluidine blue <i>P. aeruginosa</i>	Fluid penetration: 30 h Bacterial incubation: 72h	Comparison of bacterial leakage between cemented retained abutment (CRA) vs screwed-retained abutment (SRA) :SEM view, fluid and bacterial analysis. SEM: gap 2-7 µm for SRA; 7 µm for CRA but no gap within the cement CRA: no presence of fluids and bacteria SRA: fluid penetration and bacterial leakage in all cases

37

7. Nayak et al. 2014 JOI Abstract only	ADIN Dental Implant System	Polysiloxane ring (O-ring) Antibacterial gel (Gapsal)	x		<i>Enterococcus</i>	5 D	Comparison of bacterial penetration between nothing, silicone washer or gel. Culture of the inner part of assemblies Sealing agent help to reduce microleakage Physical agent such silicone ring prevents complete seating of abutment No complete sealing is found with any material
8. Cavalcanti et al. 2015 CIDDR	SIN, Sistema de implante Connections: Morse taper Ext. hex	e-PTFE and Gutta-percha	X		<i>E. coli</i> ATCC 25922	14 D	Evaluation of bacterial leakage comparing gutta-percha, ePTFE, and no sealing for sealing screw channel access. Less turbidity of media for gutta-percha. Equivalence of turbidity between PTFE and no sealing
9. Mencio et al. 2016 EurRMPS	<i>G1: 6 Implants (Winsix®, BioSAF IN, Ancona, Italy + internal hex.)</i> <i>G2: 6 Implants Bone System®, Milan, Italy) + cemented abutment</i> Connection: Internal hexagon	Cement (resin): Panavia 21, Kuraray	X		Bacteria from Healthy patients Probes from 10 classical periopathogens (<i>Aa, Pg, Pt, Tj, Td, Pm, Fn, Cr, Ec + C. albicans</i>)	14 D	Comparison of colonization between screwed vs cemented abutment Evaluation with Q-RT-PCR Total amount of microorganisms of screwed abutments >> cemented abutments.

38

5. Sealing devices *in vivo*

Publication	Implant system/type of connection (Implant + corresponding abutment)	Sealing biomaterial	Bacteria evaluated	Time	Problematic and Microbiological observations
1. Rimondini et al. 2001 JOI	Frialit-2, Friatech Gbm, Germany	O-ring silicone washer (Hermetics, Friatech Gbm, Germany)	Morphologic views: cocci, shot rods ≤ 10µm or long rods > 10 µm	2 months	SEM and energy dispersive x-ray spectroscopy analysis with and without sealing → Sampling different portions of the screw Control group: 7/9 screws contaminated Test group (sealed): 2/8 screws contaminated Bacteria present only in the coronal portion of the screw for seal group Fewer bacteria for seal group Clinical parameters similar
2. d'Ercole et al. 2009 IJI Pharmacol	Brånemark, Nobel Pharma AB. (ext. hex.)	Chlorhexidine gel 1%	<i>A. aggragatibactercomitans</i> <i>T. forsythia</i> <i>C. rectus</i> <i>E. corrodens</i> <i>F. nucleatum</i>	3 months	Sampling of the connection and the sulcus (AST test). Control group vs test group. Significant reduction of total amount of bacteria in test group (CFU). AST increase in the control group.
3. Groenedijk et al. 2004 COIR	3i Titled implants	Chlorhexidine solution 0.2% (Cordosyl® dental gel)	Counting the number of CFU after sampling	6 weeks	Sampling the connection at 2nd step surgery (SSS) and 6 weeks later SSS: 46% of connections with viable bacteria + 6 weeks: 87 % Less bacteria for chlorhexidine group
4. Paolantonio et al. 2008 JOI	Brånemark, Nobel Pharma AB. (ext. hex.)	Chlorhexidine gel 1% (Cordosyl® dental gel)	<i>A. aggragatibactercomitans</i> <i>T. forsythia</i> <i>C. rectus</i> <i>F. nucleatum</i> <i>E. corrodens</i> <i>F. gingivialis</i> <i>P. intermedia</i> <i>T. denticola</i>	6 months	Evaluation of clinical parameters + microbiological sampling for control and test group (multiplex PCR and total bacterial count) Stability of clinical parameters for both groups Reduction of total bacterial count and periopathogens in the control group

39

5. Scarano et al. 2005 IOI	Implant retrieved from humans: <i>Screw-retained abutment:</i> Brånemark, Nobelbiocare, Implant Innovation, Restore (Lifecore Biomedical) <i>Cement-retained abutment:</i> Bone System Primary Healing	Zinc phosphate cement	Microscopically evaluation of bacteria: Presence or not: visual aspect.	16 years	Microscopically evaluation of screw retained vs cemented retained abutment on slides views of assemblies removed G1: 60 µm of microgap, presence of bacteria G2: 40 µm of microgap, no bacteria
6. Pimentel et al. 2014 IOI	Implant: <i>data no provided</i> Abutment: External hexagon	Silicone gel sheets (Medgel silicone gel, Silimed)	Detection of 4 periimplant pathogens: <i>-P. gingivalis</i> <i>-P. intermedia</i> <i>-A. aggregatibacter</i> <i>-T. forsythia</i>	Crowns placed from 2 to 36 months, then sampling	Evaluation of bacterial colonization of the connection with a silicone sheet. PCR technique. Sampling before, 30 and 90 days after membrane placement. Reduction of the number of pathogens with silicone membranes (52% to 32% and 27%), but they don't prevent a total microleakage.

Développement d'un hydrogel injectable à propriétés antimicrobiennes pour la prévention des péri-implantites

Résumé

Les maladies périimplantaires sont des pathologies inflammatoires d'origine bactérienne impliquant les bactéries parodontopathogènes, et surtout *P.gingivalis*. Elles évoluent parfois en périimplantite, avec une destruction des tissus vivants environnants. Les traitements chirurgicaux, antibiotiques ou antiseptiques échouent parfois car la connectique implantaire est un véritable réservoir bactérien inaccessible au nettoyage, et situé en regard de tissus fragiles. Le développement d'un gel préventif antimicrobien à injecter dans la connectique est un véritable enjeu pour les situations à risque. Nous avons choisi de travailler sur un gel d'alginate-catéchol (AC) à 1%. Inspiré de l'adhésion de la moule marine, ses propriétés en milieu humide sont convaincantes dans des conditions buccales. Nous avons montré que c'est un gel possédant une structure physico-chimique stable à 37°C sur un mois dans du tampon phosphate. Sa cinétique de gélification est rapide (une minute) et reproductible dans les essais au rhéomètre. Les tests de pelage confirment qu'il est adhérent sur le métal et les tissus mous, et que ses propriétés physiques sont encore améliorées en le combinant au pluronic bisSH à 18%. La cateslytine (CTL) est un peptide antimicrobien (PAM) naturel. Son utilisation en configuration Dextrogyre (D-CTL) est plus efficace, sans entrainer de résistance bactérienne. Ajoutée dans le gel, elle le renforce et amène une bactéricidie sur *P. gingivalis*, *E. coli* et *C. albicans*. Entre 1 et 10% de la quantité introduite de CTL est libérée hors du gel. Les peptides retrouvés après analyse HPLC et spectrométrie de masse sont des fragments de D-CTL ayant conservé le site actif, d'où leur activité persistante. La biocompatibilité des gels est proche de 100% sur des fibroblastes humains. L'AC est testé sur des assemblages d'implants dans des boîtes étanches. Si les bactéries colonisent les joints pilier/implant et pilier/couronne vierges, ainsi que les structures rugueuses, elles ne passent pas dans la connectique où le gel chargé en PAM a été introduit. Ainsi, l'AC1%+ D-CTL constitue un candidat prometteur pour une utilisation en prothèse implantaire.

Mots clés : Alginate-Catéchol, peptide antimicrobien, D-CTL, péri-implantite, *microgap*, *P. gingivalis*

Abstract

Peri-implant diseases are an oral infection caused by bacteria, especially *P. gingivalis* that is a periodontal pathogen involved in the inflammatory response, leading to a destruction of implant-supporting tissues (peri-implantitis). Currently, effective treatments consist in surgical techniques with antibiotics and antiseptics. Nevertheless, these therapies may fail because of the hollow spaces in the implant-abutment connection, that are completely contaminated by bacteria in proximity of soft tissues. In this PhD project, we have chosen an alginate-catechol-based gel at 1% in weight (for an easy manipulation), that is bioinspired from the system of adhesion system of marine mussels' pads. Physicochemical framework of this gel in wet conditions are tunable with an oral application. We show that AC 1% is stable for one month in PBS at 37°C. Gelation kinetics is rapid (under one minute) and reproducible in rheometer assays. Tacking tests highlight good adhesive results on metal and soft tissues. AC 0,5% can be blended with pluronic bisSH 18% to provide a gel with better physicochemical properties. D-CTL is a natural antimicrobial peptide (AMP) with a Dextrogyre configuration (D-CTL) that is more efficient, without bacterial resistance. D-CTL mixed to the gel strengthens its mechanical properties and has a bactericide activity against *P. gingivalis*, *E. coli* and *C. albicans*. Between 1 and 10 % of the peptide initially introduced in gel are released. HPLC and mass spectrometry indicate that most of the fragments are conserve their active site and remain efficient. Biocompatibility tests on human fibroblast show results close to 100%. Gels are assessed *in vitro* on implant/abutment assemblies put in sealing boxes. Bacteria colonize microgaps between implant and abutment, abutment and crown and its rough surfaces, but are shown to stop at the interface with the AMP loaded gel. AC 1%+ D-CTL is a promising candidate for a dental implant application.

Keywords : Alginate-catechol, antimicrobial peptide, D-CTL, peri-implantitis, *microgap*, *P. gingivalis*