

---

# Diagnostic des maladies parodontales

## Introduction

### Diagnostic clinique : l'examen clinique

Le diagnostic s'appuie d'abord et surtout sur les signes cliniques. D'une façon générale, le saignement gingival est considéré comme un signe révélateur de l'inflammation gingivale, extrêmement précoce et bien plus précis que la rougeur des tissus. L'exploration des profondeurs des poches à l'aide d'une sonde parodontale nouvelle permet d'établir un index gingival, ou un indice de saignement du sulcus, ou encore un index de saignement de la papille. Histologiquement, on a pu établir une bonne corrélation entre l'inflammation du tissu gingival et le saignement provoqué par le sondage. Cet indice est corrélé à l'augmentation de sécrétion du fluide gingival, lui-même associé à l'inflammation tissulaire. Au terme d'un traitement, l'arrêt du saignement est considéré comme témoignage de la réduction de l'inflammation gingivale, et un signe de réparation tissulaire et de réduction de la profondeur des poches, accompagnée de gain de hauteur d'attachement gingival.

Des techniques plus sophistiquées consistent à utiliser des sondes électroniques, afin de mieux maîtriser l'application de la pression de la sonde sur les tissus, qui peuvent varier d'un site à un autre, ainsi que d'un opérateur à un autre. Il faut noter que des variations importantes peuvent survenir selon l'épaisseur de la sonde, la pression appliquée, la forme de contour de la dent, le degré de dégradation de la trame collagénique. L'introduction de sondes électroniques couplées à des enregistrements informatisés devrait améliorer la sensibilité de cette méthode d'évaluation de la maladie.

Le saignement gingival constitue un signe extrêmement sensible de la présence de la maladie, mais ne permet pas de conclure quant à son évolution. D'autres signes tels que la rougeur et l'œdème ont été incorporés dans les

indices du statut de la maladie. La suppuration d'une poche parodontale concerne des sites présentant des parodontites plus avancées. À cet égard il n'existe pas d'échelle de signification ni de signe ayant valeur prédictive dont la standardisation permettrait d'évaluer l'évolution ultérieure de la maladie.

## **Bilan radiographique**

La radiographie permet d'évaluer les pertes de substance osseuses et leurs formes. Si les clichés donnent une évaluation correcte des pertes interproximales, ils conduisent à sous-estimer les pertes de substances vestibulaires (ou jugales) et linguales ou palatines. La radiographie conventionnelle est également inutile pour diagnostiquer les formes précoces de la maladie, en particulier les gingivites. Les défauts osseux ne sont détectés qu'au-delà d'un seuil de réduction des trabéculations ou de réduction de hauteur. On considère qu'à moins de 3 mm de perte osseuse, la destruction est indécélable sur un cliché. Les lésions de la furcation des dents ne sont détectées que quand la résorption s'est développée au-delà de la furcation. Le comblement des défauts angulaires et leur régénération doivent également être appréciés avec beaucoup de réserves, car ils peuvent ne pas être mis en évidence par cette méthode.

D'après une étude récente (Flack et coll., 1996), il ressort que l'outil diagnostique radiographique donne des réponses homogènes à 98 % entre plusieurs praticiens pour ce qui concerne les identifications d'atteintes de furcations. Le diagnostic de gingivite et de maladie parodontale ne concorde qu'à 70 %.

La radiographie conventionnelle n'est que de peu de valeur en présence de légers changements du niveau osseux. La radiographie digitalisée devrait pouvoir visualiser de faibles modifications. Il est connu que les changements osseux n'interviennent que bien après la perte d'attache du tissu conjonctif.

L'usage de méthodes nouvelles d'imagerie médicale devrait faciliter l'étude de l'état parodontal. La radiographie numérisée, associée à des densimètres, devrait permettre d'évaluer des changements subtils de densité. D'autres méthodes, encore à un stade de recherches, pourraient permettre de préciser les évolutions de la vascularisation et les modifications de l'os.

## **Analyses de laboratoire et marqueurs moléculaires**

D'autres techniques d'évaluation de la maladie font appel au laboratoire de biologie. Il s'agit d'analyses du fluide gingival. Sa composition en immunoglobulines et autres protéines sériques, le nombre de polynucléaires,

constituent autant d'indices de la maladie parodontale. Le Periotron est un instrument électronique qui permet la mesure du volume de fluide gingival collecté dans le sillon pendant un temps déterminé. Les analyses biochimiques de collagénases, d'inhibiteurs de collagénases, de prostaglandines E2, de  $\beta$ -glucuronidase peuvent contribuer aussi à identifier et quantifier l'état inflammatoire du parodonte.

Des micro-organismes prélevés dans plusieurs sites de la gencive et mis en culture permettent d'établir des différences entre les formes de maladies parodontales. La flore de la gingivite et des parodontites de l'adulte diffère des gingivites ulcéro-nécrotiques et de la parodontite juvénile. Du fait que les maladies parodontales sont des maladies infectieuses, ces cultures ont été considérées longtemps comme prometteuses dans l'établissement des spécificités de ces lésions et donc des orientations thérapeutiques. Si les formes de parodontites juvéniles localisées sont effectivement associées à la présence de *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, *Capnocytophage* et *Eikenella corrodens*, la plupart des maladies parodontales n'ont pas de flores spécifiques. L'identification de bactéries en tant qu'agent causal, ou la mise en évidence d'associations de bactéries, reste donc un domaine de recherche important qui pourrait déboucher un jour sur des applications cliniques. L'intérêt des sondes d'ADN mises sur le marché est donc encore plus cognitif que diagnostique. Le dosage des titres d'anticorps par des méthodes ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay* ou réaction enzymologique) entre également dans ce contexte.

Au-delà de ces approches, la discrimination entre groupes de patients à risque et patients peu susceptibles de présenter une évolution de la maladie parodontale pourrait passer selon Johnson et coll. (1988) par :

- Un interrogatoire ou un bilan incluant des informations telles que la race, le sexe, l'âge, l'appartenance à un groupe socio-économique, des précisions sur le statut immunologique, nutritionnel, les maladies intercurrentes de tous les autres systèmes et organes, le stress auquel le patient est soumis.
- Des examens de laboratoire incluant :
  - des analyses du sang : statut HLA, titre des anticorps aux pathogènes putatifs, marqueurs de maladies intercurrentes,
  - des analyses de la salive : titres d'anticorps, taux d'enzymes, comptage bactérien, composition cellulaire,
  - des analyses du fluide gingival créviculaire : cellules et leurs capacités fonctionnelles, titre en anticorps, toxines et enzymes, produits de dégradation tissulaire, cytokines, eicosanoïdes, pH,
  - des analyses de la plaque sous-gingivale : micro-organismes, toxines et enzymes,
  - des analyses du tissu : populations cellulaires inflammatoires et immunes, altérations du tissu épithélial et du tissu conjonctif.

Un bon nombre de ces éléments sera détaillé plus loin.

## Approche génétique

La détermination génétique des groupes à risque de maladies parodontales reste encore du domaine de la futurologie. Cependant un certain nombre d'informations montre que des formes précoces de parodontites (EOP : *early-onset periodontal diseases*) suivent une loi d'héritage mendélien d'un gène à effet majeur. Ce type de parodontite constitue un excellent champ d'investigation pour l'épidémiologie génétique et la détermination de patients à risques. Le génotype ainsi transmis peut prédisposer des individus à une parodontite quand ils sont exposés à certaines bactéries. Le dilemme pour l'instant se situe entre la susceptibilité génétique de réponse à une bactérie spécifique et l'altération de la réponse immune à une bactérie présente normalement dans la flore. Même s'il est clair qu'aucune bactérie ne peut être considérée en soi comme spécifique de la lésion parodontale, il apparaît que la flore et la réponse de l'hôte ne sont pas des variables indépendantes. La susceptibilité de l'hôte associée au facteur de risque que constitue l'environnement des tissus parodontaux peut entraîner une altération locale ou généralisée.

Un certain nombre de facteurs génétiques peuvent moduler l'apparition de la maladie ou sa progression. Cela inclut les facteurs anatomiques, la réponse inflammatoire, les effets immunologiques, les dysfonctions endocriniennes, les maladies génétiques du métabolisme et des états pathologiques systémiques. Dans le droit fil de ce concept, un certain nombre de formes de destruction du parodonte ont été signalées au cours des maladies suivantes :

Maladies	Défaut biochimique ou tissulaire	Mode
Syndrome de Papillon-Lefèvre	kératine/épithélium	AR
Syndrome de Haim Munk	kératine/épithélium	AR
Syndrome d'Ehlers-Danlos		
Type IV	collagène	AD, AR
Type VII	collagène	AR
Type IX	collagène	AD
Neutropénie		
cyclique	neutrophiles	AD
chronique	neutrophiles	AD
Acatalasia	catalase	AD

AD : autosomique dominant; AR : autosomique récessif

De plus, on sait que des parodontopathies sont associées au diabète de type I, à des aberrations chromosomiques du type trisomie et à d'autres maladies génétiques.

Pour ce qui concerne l'EOP, la prévalence de la maladie parodontale est héritée selon un mode lié à l'X ou présente un caractère autosomique

récessif. Cependant les gènes de susceptibilité sont difficiles à identifier, ne serait-ce qu'à cause de l'hétérogénéité étiologique, des incertitudes du diagnostic, des phénocopies, et de l'absence de spécificité des paramètres génétiques. Des analyses par ségrégation peuvent déterminer le mode de transmission. De travaux portant sur des familles de race noire, on a pu déduire que le mode de transmission est autosomique dominant. Il est cependant possible que des formes récessives et liées à l'X puissent aussi exister.

D'une première série d'analyses, on a cru pouvoir avancer qu'un lien pourrait exister avec le site de liaison à la vitamine D (GC) sur le chromosome 4. Cela n'a pas été confirmé par d'autres études qui suggèrent une hétérogénéité génétique des formes juvéniles de parodontites. L'association entre certains antigènes HLA et les parodontites s'est révélée faible. Il en est de même avec les sites codant pour le complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) situés sur le chromosome 6. Cependant certains allèles du MHC pourraient influencer la réponse de l'hôte à l'infection microbienne et, par là même, l'expression clinique de la maladie parodontale.

La recherche aujourd'hui s'oriente vers plusieurs directions et concepts :

- Il est probable que la prédisposition génétique ne suffise pas pour développer une parodontite précoce. L'infection microbienne est également nécessaire pour développer la maladie.
- Le génotype lui-même doit être caractérisé par des interactions entre gènes et par une hétérogénéité génétique.
- À ce jour, le modèle de parodontite juvénile semble retenir toute l'attention pour ce type d'investigation. En effet, un certain nombre d'anomalies incluent les dysfonctions des neutrophiles, la sécrétion des prostaglandines E2 en réponse aux lipopolysaccharides bactériens et la réponse des cellules T. La diminution d'activité chimotaxique, de réponse phagocytaire, d'activité antibactérienne, de formation de leucotriène B et la formation de superoxyde par les neutrophiles constituent autant de facteurs pouvant induire une parodontite juvénile. Or ces facteurs sont régulés génétiquement, la localisation des gènes affectant le fonctionnement des neutrophiles. D'autres gènes peuvent contrôler les activités de cellules immunocompétentes telles que les monocytes et les macrophages.
- Des études d'épidémiologie génétique devraient permettre d'identifier les gènes intervenant comme facteur de risque pour ces parodontites juvéniles. Un certain nombre de gènes candidats a été identifié. Il est probable que d'autres viendront s'ajouter à ceux qui sont actuellement en cours d'étude (Hart, 1996).

Ces voies viendront sans doute un jour enrichir le diagnostic et renforcer les schémas thérapeutiques. Pour l'instant, ceux-ci ne sont que cognitifs.

## Marqueurs biologiques de la maladie parodontale

### Position du problème

Les maladies parodontales inflammatoires résultent de l'interaction des systèmes immunitaires et inflammatoires avec les bactéries de la plaque. Elles intéressent un ensemble de tissus mous (épithélium et conjonctif gingival, ligament alvéolo-dentaire) et de tissus minéralisés (os, cément).

Nous pouvons répertorier quatre points sensibles :

- Un environnement bactérien dense et constant, dans un milieu ouvert (sans pouvoir isoler un germe responsable).
- Une réponse de l'hôte inconstante en termes de temps et de lieu chez un même patient. D'où la notion de site actif : un site actif est caractérisé par la perte d'os alvéolaire, de tissu conjonctif et d'attache clinique. L'exploitation de ces signes cliniques pose de nombreux problèmes pratiques, tant au niveau du diagnostic et du pronostic que des thérapeutiques. Quant à la réponse de l'hôte, il s'agit d'une réponse inflammatoire assez classique mais, contrairement à la plupart des pathologies survenant dans d'autres sites, elle n'entraîne aucune altération immédiate de la fonction. C'est en général le handicap fonctionnel qui conduit le patient à consulter. Les effets de cette réponse sont vite irréversibles, dès que le parodonte profond est touché. Ce qui renforce la nécessité de diagnostic précoce ou prévisionnel.
- Les thérapeutiques adaptées à ces spécificités sont difficiles à mettre en œuvre car la cible microbienne est imprécise et peu accessible durablement, et les acteurs de la réponse de l'hôte sont indispensables dans cette lutte contre l'agresseur.
- La réparation et la régénération physiologiques qui représentent normalement la phase ultime de l'inflammation sont incapables dans ce cadre précis de restaurer *ad integrum* les tissus lésés.

Selon Page (1992), le diagnostic parodontal pose quatre problèmes : 1 - Le patient est-il atteint par une maladie parodontale? Il est alors assez facile de répondre au simple examen des tissus bucco-dentaires. 2 - De quel type de maladie parodontale souffre-t-il? Là aussi, il est assez simple de répondre. Classifier une lésion parodontale ne pose pas de problème majeur à partir d'un examen détaillé et d'une bonne connaissance de l'histoire de la maladie. 3 - La maladie est-elle active ou inactive pour un site donné? Il devient très difficile de répondre. 4 - Quel est le degré de susceptibilité du patient? Là aussi, il est très difficile de répondre.

Selon Socransky (1992), les maladies parodontales se développent grâce à la conjonction de quatre facteurs :

- La présence de bactéries pathogènes virulentes (*Actinobacillus actinomyces-comitans*, *Bacteroides forsythus*, *Eikenella corrodens*, *Fuseatum nucleatum*, *P. micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Seimonas*, *Eubacterium*, spirochètes).
- L'absence de bactéries bénéfiques (*Actinomycès*, *Capnocytophaga ochracea*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* II, *Veillonella parvula*).
- La déficience du système immunitaire (LPN déprimés, réponse immunitaire inadéquate, sida, diabète, tabac, drogue).
- Un environnement défavorable.

Le fait que la maladie parodontale évolue en alternant avec des épisodes chroniques ou des périodes de latence, et la très large échelle de gravité affectant des sites différents chez un même patient, montrent bien que les informations diagnostiques se doivent d'aller bien au-delà de ce qui permet habituellement de répertorier la maladie dans une classe ou une sous-classe (McCulloch, 1994).

## Démarche diagnostique

Si la réponse des structures parodontales à une agression se distingue peu de celles des autres tissus conjonctifs, la nature, la fréquence, voire le degré des agressions sont très particuliers. Il en résulte des réactions tissulaires très localisées dans le temps et dans l'espace, accompagnées de signes cliniques discrets et différés. L'inflammation qui constitue la réponse à ces agressions, offre tous les critères cardinaux habituels, sauf un, le plus révélateur, l'altération de la fonction, ressentie extemporanément par le sujet.

Il est admis à ce jour que la maladie parodontale évolue selon un mode épisodique et irrégulier (Goodson et coll., 1982) et que les périodes actives ne concernent, à un moment donné, que quelques sites limités dans une même bouche (Haffajee et coll., 1983). Tout le débat porte sur notre incapacité à détecter les sites en phase active de détérioration et à dégager de l'ensemble d'une population le groupe de patients hautement susceptibles à la maladie. L'ensemble de nos connaissances sont fondées sur des observations longitudinales de perte d'attache ou d'altérations osseuses horizontales ou verticales (Page, 1992). Or, le sondage, même répété à intervalles réguliers, ainsi que le saignement au sondage ne peuvent donner que des indications *a posteriori*. Ils relatent l'histoire de la maladie, alors que le processus destructeur est déjà bien établi, et ne préjugent en rien de la nature ni du devenir de la lésion identifiée (Socransky, 1992; Page, 1992). On n'a jamais pu associer de manière univoque une espèce bactérienne à un type spécifique de parodontopathie. Par contre, certaines bactéries comme *A. actinomyces-comitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*,

*Bacteroides forsythus* et les spirochètes sont retrouvées dans des lésions dites actives (Slots et coll., 1986).

L'activité de la maladie a été corrélée à une proportion élevée de pathogènes probables, à un niveau élevé de médiateurs de l'inflammation, à une suppuration augmentée, à une perte d'os concomittante et à un nombre accru de poches. L'activité de la maladie précède, plutôt qu'elle ne suit, le saignement au sondage, qui est davantage une conséquence qu'un indice de prévision. Ainsi la maladie active n'est pas fortement associée à une augmentation de profondeur de poche parce que la perte d'attache intervient souvent sans approfondissement de la poche (Goodson, 1992).

La démarche diagnostique consiste en une procédure imparfaite résultant d'une probabilité plutôt que d'une certitude. Les relations mathématiques entre les résultats d'un test et la situation clinique réelle sont des modèles utiles (Lang, 1991).

Le diagnostic d'une maladie parodontale devrait idéalement inclure non seulement une description de l'état présent de la maladie, mais aussi une information indiquant si la maladie est actuellement en progression, ou si elle est sur le point de progresser (Palcanis, 1992). À ce jour aucun outil diagnostique ne permet d'atteindre cet objectif. Plusieurs travaux se sont attachés à l'étude de diverses substances du fluide gingival comme marqueurs de la progression de la maladie parodontale pour permettre au clinicien de déterminer s'il faut traiter une zone particulière, et quel type de thérapie utiliser. Le niveau de marqueur après traitement devrait fournir une indication du succès ou de l'échec d'une thérapeutique.

C'est pourquoi d'autres critères, objectifs, de nature biologique et complétant les précédents, ont été recherchés. Nous pouvons théoriquement attendre de ces marqueurs plusieurs types d'informations : contribuer à établir le diagnostic de la maladie; déterminer la susceptibilité à la maladie; identifier des composants normaux présents à une concentration anormale; identifier des constituants anormaux. Ces marqueurs devraient permettre d'établir un pronostic de déclenchement de pathologie sur un site initialement apparemment sain, et une prévision de réveil d'une zone atteinte, mais temporairement quiescente. En outre, ils devraient donner une indication sur le caractère actif extemporané d'un site suspect qui offrirait une indication thérapeutique utile et objective.

Deux voies ont été explorées à ce jour. La première repose sur des appréciations quantitatives et qualitatives liées à un vecteur biologique comme l'urine, la salive, le plasma ou le fluide gingival. À ce jour, la salive ne nous a apporté aucun renseignement. L'analyse d'urine ne serait utile que pour étayer un diagnostic différentiel de chute de dents liée à une hypophosphatasie du jeune enfant (présence de phospho-éthanolamine dans les urines (Baab et coll., 1986).

La seconde s'appuie sur une certaine forme de spécificité bactérienne associée aux lésions actives. La présence de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*, *Campylobacter rectus* (ex *Wolinella recta*), *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga* et de Spirochètes (*Treponema denticola*) révèle des facteurs de virulence bien connus : molécules d'adhérence, capsule, lipopolysaccharides, vésicules de membrane, protéases (Dzink et coll., 1988).

## Marqueurs de l'hôte

Le fluide gingival a pour origine l'inflammation des structures parodontales (Alfano, 1974; 1976). Brill et Krasse (1958) ont clairement montré que le débit de fluide gingival était corrélé à l'état inflammatoire. D'où un indice de fluide fondé sur une évaluation volumétrique, qui refléterait l'état inflammatoire avec davantage d'objectivité que les indices classiques. Les appareils de type PERIOTRON 600 et 6000 (Harco Electronics, Winnipeg, Canada) ont été mis au point à cet effet.

Le fluide gingival contient une grande variété de composants qui reflètent l'état métabolique des tissus parodontaux. Ces facteurs pourraient être considérés comme marqueurs diagnostiques, voire pronostiques, de santé ou de maladie parodontale.

De nombreux travaux, très contradictoires, ont tenté d'établir une corrélation entre le volume de fluide gingival et l'état clinique du site de prélèvement, ou son état histologique (Cimasoni, 1983). Griffiths et coll. (1992) ont montré, sur 102 sujets jeunes, que le premier prélèvement opéré au temps 1 minute n'était corrélé à aucun indice clinique, alors que le cinquième prélèvement effectué au temps 9 minutes était corrélé au GI (*gingival index*). Cela reflète sans doute l'association entre l'inflammation cliniquement détectable et la susceptibilité du site à une irritation modérée.

Il est certain que la quantité recueillie dépend fortement de la technique employée (bandelette de papier, pointes de papier, tubes capillaires, triangles de nitrocellulose). L'insertion profonde et prolongée d'un matériau induit un flux soutenu, voire une augmentation de ce flux et des substances charriées. Par contre, un prélèvement répété à l'orifice du site sur 30 secondes ou 1 minute tend à réduire le volume de fluide et les quantités des composants par unité de temps. Dans une expérience de prélèvements répétitifs, l'activité aspartate amino-transférase du fluide gingival se retrouve essentiellement pendant les 5 premières secondes; l'activité est plus faible entre 20 et 30 secondes qu'entre 5 et 10 secondes. Cela est dû soit à une inactivation enzymatique sur la bandelette, soit

à la dilution du fluide gingival initial riche en enzymes par un fluide gingival plus pauvre. Il semble que la référence au temps de prélèvement soit meilleure que la référence au volume. La meilleure méthode est celle qui cause le moins d'interférence sur le temps le plus court.

Le fluide gingival contient des substances dérivées du fluide interstitiel (facteurs produits localement par les tissus traversés), du plasma et des bactéries de la plaque accumulées dans le sillon gingivo-dentaire (Cimasoni, 1983). La proportion de ces trois types de constituants dépend du caractère qualitatif et quantitatif de la plaque dentaire, du renouvellement du tissu conjonctif, de la perméabilité de l'épithélium et de la membrane basale, et du degré d'inflammation (Curtis et coll., 1989). Sa composition reflète donc assez bien l'activité biochimique au niveau des tissus sous-jacents.

Un marqueur biologique de maladie parodontale devra présenter des garanties indéniables d'origine tissulaire, sans risque d'ambiguïté avec une contamination de nature biochimique procaryote. D'autre part, il devra être corrélé avec l'activité réelle de la lésion et être relativement stable et aisément quantifiable. De nombreuses substances ont été étudiées dans cette perspective. Il est possible de les classer en cinq groupes (Douglass et Fox, 1991) :

- médiateurs de l'inflammation (médiateurs du catabolisme et de l'anabolisme lié à la réparation),
- enzymes qui s'expriment hors de la cellule et qui dégradent les structures tissulaires,
- produits du catabolisme tissulaire,
- enzymes issues de la lyse cellulaire,
- récepteurs des leucocytes polynucléaires neutrophiles.

Il est très important que les prélèvements de fluide gingival soient pratiqués selon un protocole rigoureux, afin de limiter les contaminations salivaires, sériques et bactériennes, mais aussi d'éviter les agressions gingivales génératrices d'un « débit » artificiellement accru. De même, il y aura lieu de soigner la référence quantitative du prélèvement, pour que les activités mesurées soient reproductibles et comparables entre elles. Pour répondre à ces exigences, il faudra appliquer strictement les procédures préparatoires (choix des sites, nettoyage, prélèvement « blanc » destiné à vider le sillon de son contenu initial). Il y aura lieu de respecter les temps d'insertion des bandelettes de papier filtre collectrices et d'évaluer la quantité recueillie à l'aide du PERIOTRON.

Nous allons donc passer en revue les différents marqueurs biologiques susceptibles de nous renseigner sur la phase de la maladie, et envisager les potentialités, les limites et les inconvénients de chacun d'entre eux, dans la perspective d'une éventuelle application clinique fiable et assez simple à mettre en œuvre.

## Marqueurs de l'inflammation gingivale

Les facteurs de la phase aiguë de l'inflammation et de la destruction ont été étudiés dans le fluide gingival. Il s'agit en particulier de la protéine C-réactive (CRP), l' $\alpha$ -1-antitrypsine et l' $\alpha$ -2-macroglobuline (Sibraa, 1991) qui donnent des résultats, pour le moment délicats à interpréter. Le principe consiste à immobiliser les protéines antigéniques (inflammatoires) sur une membrane, et à les identifier par anti-sérum et immunoenzyme-coloration ou par marqueur radio-isotopique.

### Interleukines

L'interleukine-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) est une cytokine issue des macrophages ayant interagi avec un produit bactérien. Elle induit la résorption osseuse et la sécrétion de certaines protéases. IL-1  $\beta$  augmente avec l'inflammation gingivale, précédant ses manifestations cliniques (Preiss et coll., 1994), mais son dosage est complexe et coûteux car il requiert des anticorps monoclonaux. IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$  et IL-6 sont dosés par ELISA (Reinhardt et coll., 1993). Chez des patients réfractaires, les résultats sont corrélés avec la présence dans la plaque sous-gingivale de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* et *Eikenella corrodens*. Lorsque l'on compare les sites produisant le plus de cytokines/patient dans le fluide gingival, les sites des patients réfractaires produisent davantage d'IL-6. La présence de chacun des organismes pathogènes dans la plaque sous-gingivale est associée à des concentrations élevées de IL-1 dans le fluide gingival. Donc IL-6 pourrait servir à identifier des sites réfractaires.

### TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  est produit par les lymphocytes activés et les monocytes. Il est retrouvé dans le fluide gingival de certains sites parodontaux. Or, TNF- $\alpha$  est un puissant immunorégulateur capable, entre autres fonctions biologiques, de stimuler les fibroblastes et la résorption osseuse.

### Prostaglandine E2

L'augmentation de la prostaglandine E2 (PGE2) est révélatrice d'une perte d'attache gingivale (Offenbacher et coll., 1991). PGE2 serait libérée localement par les leucocytes polynucléaires neutrophiles et les macrophages, avec une demi-vie biologiquement courte car elle est métabolisée sur place. Son activité est limitée aux territoires directement adjacents. PGE2 augmente sur les sites à parodontite progressive avec l'évolution inflammatoire et peut induire la destruction osseuse. Son augmentation pourrait refléter une inflammation parodontale persistante (Nelson et coll., 1992).

### **Lactoferrine**

La lactoferrine n'est pas intrinsèquement un médiateur de l'inflammation, c'est une glycoprotéine de liaison du fer. Cependant son action antibactérienne est particulière (par captage des ions  $Fe^{++}$ ), avec un effet bactéricide, indépendant de son rôle déprivateur en fer, qui la rend difficilement classable. La lactoferrine facilite aussi la phagocytose des germes de la plaque en réduisant leur hydrophobicité et en prévenant leur adhérence. Elle est impliquée dans la réponse inflammatoire en augmentant l'adhésion et la chémotaxie de leucocytes polynucléaires neutrophiles. Elle module la production de IL-1, de PG, et évacue le fer qui pourrait catalyser la formation des radicaux libres hydroxyles.

La lactoferrine est libérée exclusivement à partir des granules secondaires azurophiles des polynucléaires neutrophiles (elle est quasi absente du sérum); sa concentration augmente significativement dans tous les cas de pathologie parodontale.

Aussi, la lactoferrine pourrait être un marqueur simple et efficace du nombre de polynucléaires neutrophiles dans le sillon gingivo-dentaire (Adonogianaki, 1993).

### **Phosphatase alcaline**

En ce qui concerne le métabolisme osseux, plusieurs types de marqueurs ont été envisagés tant pour l'apposition, que pour la résorption. C'est ce domaine qui semble le plus important ; en effet, la perte osseuse alvéolaire est irréversible, et elle ne peut s'observer qu'*a posteriori*. Aucun indice clinique ne peut nous renseigner sur la résorption présente de l'os. Pour la formation d'os, la phosphatase alcaline serait un bon marqueur (de la maturation matricielle) si le test discriminait bien les phosphatases alcalines de l'os et de l'intestin.

### **Ostéocalcine**

L'ostéocalcine est un marqueur de la biominéralisation synthétisé par les ostéoblastes (1 à 2 % des protéines de la matrice osseuse). Sa teneur sérique (6 à 7 ng/ml) est accrue lors de la croissance squelettique, la puberté, l'hyperparathyroïdisme primaire et secondaire, l'acromégalie, la maladie de Paget, l'hyperthyroïdisme, et diminuée dans l'hypothyroïdisme, l'hypoparathyroïdisme, la corticothérapie. On ne trouve pas d'ostéocalcine en quantités significatives lors de la gingivite, même si le volume de fluide gingival est important (donc le flux d'ostéocalcine du sérum vers le fluide gingival serait négligeable). L'ostéocalcine est 10 à 500 fois plus concentrée dans le fluide gingival que dans le sérum (d'où l'idée d'une origine locale). Elle est significativement plus abondante dans le fluide gingival de patients atteints de parodontite que dans celui de patients atteints de gingivite (Nakashima et

Cimasoni, 1994). Des taux élevés d'ostéocalcine dans le fluide gingival pourraient refléter l'intensité du métabolisme osseux parodontal. Mais, là encore, on ne dispose pas d'études longitudinales.

## Enzymes dégradant les structures tissulaires

Les enzymes seront distinguées selon la nature de leur substrat. Les enzymes protéolytiques forment un groupe particulier, compte tenu de la très grande diversité des substrats protéiques concernés. Il est admis aujourd'hui que la spécificité d'une protéase repose en partie sur l'identité des quelques acides aminés présents sur le site de clivage du substrat.

### Collagénase

L'activité collagénase a été détectée dans le fluide gingival, avec une intensité proportionnelle à la profondeur des poches et au degré d'inflammation gingivale (Overall et coll., 1991).

L'intérêt clinique de la mesure de l'activité collagénolytique repose sur plusieurs observations. Le collagène type I est particulièrement bien représenté au sein des tissus parodontaux sains, mais disparaît en partie lors des gingivites, ce qui suppose une dégradation enzymatique importante. Les collagénases dirigées contre le collagène type I sont hautement spécifiques et agissent de façon très différente selon leur origine tissulaire ou bactérienne. Il est donc théoriquement possible d'isoler l'activité d'origine strictement eucaryote, malgré la diversité des cellules à la source de cette enzyme (leucocytes polynucléaires neutrophiles, mastocytes, fibroblastes, etc.). Toutefois, le protocole à mettre en œuvre est lourd. De plus, les collagénases sont libérées sous une forme latente. Il faut donc les activer, mais souvent cette activation s'est déjà faite, en présence de facteurs tissulaires et/ou bactériens. Il reste toujours le risque d'une neutralisation de l'activité enzymatique par un inhibiteur tissulaire de type TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteinase*).

Un test permettant d'évaluer l'activité collagénolytique dans le fluide gingival a été commercialisé aux Etats-Unis : le PERIOCHECK (mis au point par Advanced Clinical Technologies, ACTECH, Westwood, MA). Ce test ne sait pas discriminer les collagénases eucaryotes des procaryotes, et il n'a pas fait l'objet d'études longitudinales.

### Élastase

L'élastase est une sérine-endopeptidase issue des granules azurophiles de leucocytes polynucléaires neutrophiles, active contre divers substrats protéiques - élastine, collagène, protéoglycannes et laminines des membranes basales.

Sa présence dans le fluide gingival est le reflet de l'activité leucocytaire, donc du processus inflammatoire en cours au sein des structures parodontales (Palcanis, 1992; Cimasoni, 1983; Cox et Eley, 1992). La mise au point de peptides synthétiques spécifiques produisant une réaction colorée avec ce type d'enzyme est bien avancée (Cox et Eley, 1992).

Plusieurs kits de dosage de l'activité élastasique du fluide gingival destinés au praticien sont à l'étude.

Certaines études récentes sont contradictoires. Si Armitage et coll. (1994) ainsi que Zafiroopoulos et coll. (1991) concluent en signalant que les sites à forte activité élastasique sont des sites à risque plus élevé pour une perte osseuse progressive, Smith et coll. (1995) ont montré, dans une population placée dans un système d'organisation de santé, que les hauts niveaux d'élastase n'étaient pas associés à la perte d'attache. Jin et coll. (1995) estiment que le suivi de l'activité élastasique pourrait servir de comarqueur de la stabilité parodontale avec pour autre paramètre l'absence de saignement au sondage. Le même groupe a montré sur une population à parodontite réfractaire que la stabilité des niveaux élevés d'élastase signait la parodontite réfractaire.

### **Gélatinase 92 kDa**

Gangbar et coll. (1990) ont mis en évidence une collagénase et une gélatinase de 92 kDa dans le fluide gingival. Les cellules épithéliales dendritiques (de la famille des cellules de Langerhans) expriment de grandes quantités de gélatinase de 72 kDa (Birkedal-Hansen, 1993).

### **Pseudo-cathepsines et protéases neutres**

Les cathepsines sont des protéinases intracellulaires d'origines variées qui, libérées dans le compartiment extracellulaire, dégradent les composants de la matrice extracellulaire (dont le collagène). La cathepsine B (thiol-protéinase), la cathepsine D (carboxyendopeptidase acide monocytaire), les cathepsines acides H et L lysosomales, la cathepsine G (sérine-protéinase leucocytaire) ont été repérées dans le fluide gingival. Leur activité est souvent corrélée à divers indices de maladie parodontale. La cathepsine D du fluide gingival semble être corrélée positivement et significativement avec l'approfondissement des poches et l'alvéolyse (Tzamouranis et coll., 1977). Les études longitudinales font défaut pour ce type de marqueur potentiel.

Récemment, une activité tryptase, sans doute d'origine mastocytaire, a été révélée à partir de fluide gingival de patients atteints de parodontopathie (Cox et Eley, 1989).

### Autres enzymes

D'autres enzymes non protéolytiques ont été étudiées. Par exemple, celles qui dégradent les protéoglycannes de la substance fondamentale. Leur activité est corrélée avec l'inflammation (Tynelius-Bratthall et Attström, 1972).

Les enzymes qui parachèvent l'hydrolyse entamée par la hyaluronidase – la  $\beta$ -glucuronidase (LPN) et l'aryl-sulfatase (activité ostéoclasique) – sont issues des lysosomes de leucocytes polynucléaires neutrophiles (mais aussi d'autres granulocytes et de certaines bactéries). Elles requièrent un pH acide et se distinguent ainsi aisément des activités similaires d'origine bactérienne (fonctionnant à pH neutre). La  $\beta$ -glucuronidase est un bon marqueur de la libération des granules primaires des leucocytes polynucléaires neutrophiles, elle accompagne toute réponse exubérante de ces cellules. Elle signe donc la réponse inflammatoire aiguë (Lamster et coll., 1991). La  $\beta$ -glucuronidase augmente avec la présence de spirochètes, de *Prevotella intermedia*, et *Porphyromonas gingivalis* (Harper et coll., 1989) et serait corrélée à la présence de flore pathogène. Le kit de diagnostic offrirait une sensibilité de 89 % et une spécificité de 89 % pour l'identification des sites actifs.

Les résultats obtenus avec l'aryl-sulfatase semblent plus contradictoires (Lamster et coll., 1991).

Le dosage de ces activités fait appel à la spectrophotométrie, ce qui alourdit le protocole. Par contre la persistance de l'augmentation d'activité de ces deux enzymes est un facteur favorable à son emploi en clinique.

Le lysozyme agit sur les liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques des peptidoglycannes des parois bactériennes. On le trouve au sein des granules azurophiles et spécifiques des leucocytes polynucléaires neutrophiles. La contamination par le lysozyme d'origine salivaire est difficile à éviter. D'autre part, quand il est lié, le lysozyme n'est pas dosable.

### Produits du catabolisme tissulaire

L'hydrolyse des structures macromoléculaires conjonctives accompagnant l'inflammation gingivale libère des produits de dégradation assez caractéristiques (Embery et coll., 1991).

### Peptides et acides aminés

La destruction du collagène génère des peptides et des acides aminés, dont certains comme l'hydroxyproline sont spécifiques, voire des peptides conservant certaines liaisons croisées. La collagénolyse associée à une parodontite expérimentale a pu être suivie à l'aide de ces produits de dégradation, mais la méthodologie est complexe.

Les procollagène-I-carboxyterminal propeptides (PICP) et procollagène-I-aminoterminal propeptides (PINP) circulants reflètent le taux de formation osseuse (phase de prolifération). Les taux de propeptides collagène (propeptide carboxyterminal collagène III et propeptide aminoterminal collagène I) dans le sérum et dans le fluide lésionnel (fluide gingival) reflètent la quantité de collagène synthétisée (Talonpoika et Hämäläinen, 1992; 1993). Ils sont maximaux à 5-10 jours post-opératoires. Le pic de fibronectine correspond au taux maximal de prolifération fibroblastique, et précède le pic de synthèse collagénique. Quand le taux de collagène remonte, la fibronectine diminue (Talonpoika, 1993).

Le propeptide aminoterminal du collagène de type III (PIIINP) est libéré sur les sites de réparation après un processus destructeur inflammatoire ou une chirurgie parodontale. Il est associé au dépôt de nouveau collagène type III au sein de la matrice lésionnelle, et sert d'indicateur de synthèse de collagène en clinique générale (fibrose, cirrhose, arthrite rhumatoïde...). On le retrouve dans le fluide gingival à des concentrations très élevées (75 à 2670 µg/l contre seulement 1,7 à 4,2 µg/l dans le sérum), respectivement 1 et 5 jours après chirurgie. Un kit de dosage radioimmunologique pour PIIINP est commercialisé par Farnos Diagnostica (Oulu, Finlande) pour le sérum (Talonpoika et Hämäläinen, 1992).

Un marqueur biologique de la résorption osseuse est l'hydroxyproline urinaire. Les liaisons croisées « pyridinium », pyridinoline (Pyr) et désoxypyridinoline (dPyr), éliminées sous forme libre (40 %) et liée (60 %), sont dosables dans l'urine.

Ces liaisons croisées pyridinoline (Pyr) et désoxypyridinoline (dPyr) résultent d'une modification post-traductionnelle lors de la maturation du collagène. Pyr est abondante dans l'os et le cartilage et désoxypyridinoline est bien représentée dans l'os et la dentine. Les liaisons croisées de type pyridinium ne sont pas métabolisées. Elles sont éliminées telles quelles dans l'urine ou dans le fluide gingival. On utilise le dosage urinaire de ces composés comme marqueur du syndrome d'Ehlers-Danlos type VI, mais aussi du myxoœdème, de la thyrotoxicose, de l'ostéoporose post-ménopausique et de l'hyperparathyroïdisme primaire. On peut doser ces liaisons croisées de type pyridinium sur les télopeptides carboxyterminaux de collagène type I (ICTP).

Plusieurs études récentes ont suivi les ICTP dans le fluide gingival. Gianobile et coll. (1995) en particulier ont pu conduire une expérimentation animale longitudinale assez convaincante. Les ICTP pourraient donc représenter un marqueur fiable et objectif du processus destructeur osseux présent.

### **Glycosaminoglycannes**

Plusieurs glycosaminoglycannes (GAG) issus du catabolisme des protéoglycannes conjonctifs apparaissent dans le fluide gingival (visualisés en électro-

phorèse sur acétate de cellulose). Ils semblent assez bien refléter le processus destructeur sous-jacent (Embery et coll., 1991). Plusieurs types de GAG ont été identifiés dans le fluide gingival : C4S, C6S, héparane-sulfate, dermatane-sulfate, acide hyaluronique. La plupart de ces GAG sont des constituants de l'os, du ciment, de la gencive, du ligament et des tissus conjonctifs en général et sont caractéristiques des parodontites aiguës ou chroniques, du mouvement orthodontique, des blessures d'extraction. Par contre, aucun GAG sulfaté n'est détectable dans le fluide gingival de sujets avec parodonte sain ou atteints seulement de gingivite. La mesure du C4S (95 % de l'os alvéolaire) pourrait particulièrement refléter ce catabolisme. À ce jour, l'identification des GAG par électrophorèse et coloration au bleu Alcian (62,5 ng) est encore trop complexe. Un protocole plus simple est proposé par Gianobile et coll. (1993). La sensibilité de la méthode est égale à 0,01 µg GAG/ml, ce qui permet de détecter les signes initiaux de la destruction du parodonte. Les GAG détectés dans le fluide gingival par cette méthode proviendraient surtout de l'os alvéolaire, mais aussi, sans doute, du desmodonte et des tissus mous.

Il est certain que d'autres molécules pourraient être étudiées, comme par exemple les produits de dégradation de l'élastine, de la fibronectine ou de la laminine. Curtis et coll. (1990) ont montré que les altérations métaboliques majeures accompagnant la destruction des tissus parodontaux s'observaient aisément sur un simple profil électrophorétique protéique du fluide gingival.

## Enzymes cytoplasmiques issues de lyse cellulaire

Toute nécrose tissulaire s'accompagne d'une augmentation brutale de la concentration d'un certain nombre d'enzymes strictement endocellulaires. Ce phénomène s'observe lors de l'infarctus du myocarde ou lors d'hépatites aiguës, mais aussi à l'occasion de poussées inflammatoires. C'est ce qui a incité quelques auteurs à suivre l'évolution de certaines enzymes intracellulaires dans le fluide gingival agissant alors comme un émonctoire.

### Lactico-déshydrogénase

La lactico-déshydrogénase (LDH isoenzyme 5) est présente au sein du fluide gingival. Son activité est corrélée avec le nombre de *Porphyromonas gingivalis* (Harper et coll., 1989). Une contamination bactérienne n'est pas exclue, ce qui rend ce marqueur de lyse cellulaire peu fiable. Pourtant, la mort des fibroblastes progéniteurs de la base des poches est étroitement associée aux lésions avancées (Nemeth et coll., 1993). C'est donc une voie à approfondir.

### Aspartate aminotransférase

L'aspartate aminotransférase (AST) est une enzyme très répandue qui participe à la chaîne de transfert des groupes aminés issus des acides aminés.

Elle est normalement confinée dans le cytoplasme et constitue un indicateur de dommage tissulaire (nécrose tissulaire et mort cellulaire) couramment utilisé, par exemple, pour le diagnostic ou le suivi des nécroses myocardiques ou des hépatites aiguës. On la retrouve dans le sérum, le fluide cérébrospinal, le fluide articulaire. Il a été montré que l'activité AST du fluide gingival était corrélée avec l'intensité de la parodontite et de la gingivite expérimentale. Il semble aussi que l'expression de cette enzyme reflète bien les phases actives de la maladie parodontale, matérialisées par les cinétiques de perte d'attache (Persson et coll., 1992). Ce marqueur semble donc digne d'intérêt, malgré les interférences toujours possibles avec des pathologies nécrosantes intercurrentes. Malgré tout, un certain nombre de résultats inexplicables statistiquement peuvent refléter la minorité de sites en cours de destruction au moment du prélèvement (Imrey, 1991). Des études approfondies sont nécessaires afin de distinguer par l'augmentation de l'AST entre les parodontites actives et inactives, ainsi qu'entre différentes formes de gingivites en l'absence de parodontites. Un kit est en cours d'expérimentation. Il mesure l'activité AST sur des prélèvements de 30 secondes. Une étude clinique multicentrique est en cours. Les mesures sont faites 2 et 4 semaines après traitement. Un haut degré d'association existe entre les taux d'AST et les paramètres cliniques avant et après traitement.

Chambers et coll. (1991) ont suivi, pendant deux ans, l'AST dans le fluide gingival de 31 patients atteints de parodontite non traitée. Pendant l'étude, 2,6 % des 1 536 sites suivis ont perdu 2 mm ou plus d'attache. Tous les sites non évolutifs ont été placés respectivement dans les groupes suivants : sain, gingivite, parodontite modérée inactive ou parodontite grave inactive. La médiane des niveaux d'AST varie largement selon les groupes et les sujets. Bien que les résultats de cette étude suggèrent une forte association entre le niveau d'activité AST et celui des sites qui perdent de l'attache, des associations faibles existent dans le cas de sites avec gingivite et de sites inactifs de parodontite. Le problème du test AST est sa forte relation avec la présence d'inflammation gingivale prononcée (évaluée par saignement au sondage); or tous les sites qui saignent ne perdent pas d'attache. Une étude multicentrique récente (Persson et coll., 1995) confirme les résultats déjà évoqués mais ne répond pas à l'objection ainsi posée.

## Récepteurs de leucocytes polynucléaires

L'étude par immunofluorescence de marqueurs cellulaires a aussi été proposée. Par exemple les leucocytes polynucléaires neutrophiles (LPN) ont des récepteurs pour les peptides chémoattractifs C5a et la N-formylméthionylleucylphénylalanine (Van Dyke, 1990). L'expression de certains récepteurs pourrait être perturbée et leur étude permettre une approche pronostique.

On sait que les polynucléaires neutrophiles, qui représentent environ 90 % de la population cellulaire du fluide gingival, manifestent une sensibilité chimotactique réduite. Ce phénomène pourrait être provoqué par les bactéries.

Une anomalie des molécules d'adhérence CD11b des LPN a une valeur diagnostique pour les formes généralisées de parodontite prépubertaire (Page, 1987). L'expression de CD11b des leucocytes est plus forte dans le fluide que dans le sang. Cette augmentation de CD11b pourrait être due à LPS, fMLP ou à des protéases bactériennes, voire à des cytokines (IL-1, TNF- $\alpha$ ) (Sugita et coll., 1993).

CD16, le récepteur Fc IgG de basse affinité de type III (Fc $\gamma$ RIII), est ancré à la surface du leucocyte et diminue chez le neutrophile activé. Le Fc $\gamma$ RIII est moins exprimé par les leucocytes du fluide gingival que par ceux du sang. L'expression de ce récepteur Fc $\gamma$ RIII sur les leucocytes du sillon gingivodentaire est réduite chez les patients (Sugita et coll., 1993). Cela pourrait être dû à une activité PI-phospholipase-C bactérienne ou à des composants libérés par les granules des leucocytes polynucléaires neutrophiles.

LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen*) est une intégrine hétérodimérique exprimée par tous les leucocytes, exceptés les macrophages. Ce serait la plus versatile des intégrines. Sa chaîne  $\beta$  est retrouvée chez CD11b et CD11c. Une déficience en LFA-1 s'accompagne d'une forte susceptibilité aux infections bactériennes. L'expression de LFA-1 ne varie pas entre fluide gingival et sang.

CD54 (ou ICAM-1), une glycoprotéine largement distribuée sur les cellules endothéliales, fibroblastiques, épithéliales, synoviales, lymphocytaires, monocytaires, est un ligand pour CD11a. L'adhésion CD11a-CD54 est un signal costimulateur impliqué dans les réactions de contact de l'inflammation et de l'immunité (Takeuchi et coll., 1995).

Une anomalie de GP110 avec suppression de la chimotaxie *in vitro* (baisse du nombre de récepteurs de surface pour les molécules chémoattractantes) est indicatrice de parodontite juvénile (Van Dyke, 1987). Mais ces tests n'ont pas de valeur diagnostique puisque 20 à 25 % des patients atteints de parodontite juvénile ont une chimotaxie normale. De plus, des tests ne sont pas indispensables dans ce cas, puisque les manifestations cliniques se suffisent à elles-mêmes pour étayer ce diagnostic.

## Conclusions

### À diagnostic précis, thérapeutique ciblée

L'opportunité et l'efficacité d'un traitement de parodontie supposent un diagnostic précis. Si à ce jour, on sait repérer les dommages tissulaires consécutifs

à l'agression contre le parodonte, il est très difficile de déceler les phases d'activité de la maladie. Pour satisfaire aux exigences de cet aspect du diagnostic, on peut envisager de rechercher des « marqueurs biologiques » de cette activité.

Les marqueurs systémiques n'ont qu'un intérêt limité pour détecter les quelques maladies d'ordre général qui constituent un facteur de risque important, comme, par exemple, les déficits des leucocytes polynucléaires neutrophiles, certains syndromes d'Ehlers-Danlos, le diabète insulino-dépendant ou le syndrome d'immunodéficience acquise. Restent alors des marqueurs recueillis *in situ*, dans le sillon gingivo-dentaire. On peut théoriquement attendre de ces marqueurs une information à caractère pronostique ou diagnostique. À ce jour, seule la démarche de diagnostic d'une phase d'activité semble raisonnablement envisageable.

Le matériel biologique prélevé dans le sillon gingivo-dentaire a une double origine, procaryote (flore locale et/ou flore invasive) et eucaryote. Nous avons vu que l'identification simple, rapide et précise des germes présents n'est pas possible actuellement. Lorsque les caractéristiques biochimiques de chaque germe seront mieux connues, on sera peut-être en mesure de faire un diagnostic microbiologique de la maladie parodontale, à partir de produits bactériens particuliers, à condition bien sûr, qu'une relation micro-organismes/pathologie ait pu être établie clairement.

Parmi les constituants strictement tissulaires, et identifiables en tant que tels, il s'en trouve plusieurs qui offrent des garanties diagnostiques de phase active : métabolites de l'acide arachidonique, interleukine-1b, collagénase, élastase, protéases,  $\beta$ -glucuronidase, aspartate aminotransférase. La fiabilité et la facilité de mise en œuvre contribueront à la sélection de la meilleure méthode, celle qui permettra au praticien d'obtenir, immédiatement ou après quelques heures, sans faire appel à des appareils complexes et coûteux, un « indice de site actif », utile complément d'autres critères de nature clinique.

Les traitements s'appuyant sur des critères diagnostiques évolués seront plus efficaces et moins onéreux qu'un traitement fondé sur un diagnostic plus primitif comme ceux que l'on utilise aujourd'hui.

Selon Page (1992), le fluide gingival est plus prometteur que le sérum ou les cellules sanguines comme matériel de test d'activité de maladie parodontale. Sur plus de 40 constituants étudiés à ce jour, seuls ALP,  $\beta$ -G, AST, PG, Ig4, et les liaisons croisées de type pyridinium pourraient avoir une signification dans la progression de la maladie parodontale sur des sites spécifiques. Nous devons chercher le marqueur idéal. En fait, aucun marqueur ou test unique ne fournira de réponse à lui seul. Au mieux, de tels tests seront utiles comme compléments objectifs de nos procédures diagnostiques traditionnelles.

Les processus de réparation commencent à être un peu mieux connus et pourraient dans l'avenir être évalués (Wikesjö, 1992).

Le fluide gingival constitue un bon moyen de surveiller les tissus parodontaux de manière non invasive. Il est évident qu'un marqueur unique n'apportera jamais la réponse qu'un clinicien est en droit d'attendre. L'avenir est sans doute aux « trousseaux multitest ».

### **Évaluation de la validité d'un test**

L'évaluation de la qualité d'un test diagnostique s'appuie sur la sensibilité et la spécificité. La sensibilité est la probabilité que la maladie soit présente quand le test répond positivement. La spécificité est la probabilité que la maladie soit absente quand le résultat est négatif.

Si la question est la progression de la parodontite, un test performant devrait être capable de détecter des sites en progression sans donner de résultats faussement négatifs (sensibilité optimale) et détecter des sites non évolutifs sans livrer de résultats faussement positifs (spécificité optimale). À ce jour, aucun test n'a à la fois une bonne sensibilité et une bonne spécificité. Cependant, selon Lang (1990), les tests diagnostiques ne doivent pas avoir systématiquement une bonne sensibilité et une bonne spécificité pour offrir un intérêt clinique. Par exemple, un test sensible qui identifie une forte proportion de sites ou de patients malades, peut se révéler utile quand les résultats du test sont négatifs. De plus, de tels tests peuvent se révéler utiles pour éviter de passer à côté d'une maladie.

De nombreuses études cliniques évaluent les nouveaux tests en s'appuyant sur les sites plutôt que sur les patients. Dans ce cas, de nombreux sites sont utilisés chez un même patient. Cela crée un problème d'analyse des données puisque les sites chez un même patient ne sont pas indépendants les uns des autres (les sites d'un même patient partagent le même système immunitaire). Hujoel et coll. (1990) font remarquer qu'estimer la sensibilité et la spécificité en faisant appel à un modèle binomial suppose que les unités de l'analyse sont des variables indépendantes. Or ce n'est pas le cas puisqu'il peut y avoir des effets « intra-patients ». Un modèle binomial corrélé serait préférable. Un tel modèle permettrait de prendre en compte les corrélations intra-patients, et de considérer l'effet des facteurs liés au patient sur la performance des tests diagnostiques.

## **Méthodes de diagnostic microbiologique en parodontologie**

Les méthodes d'étude des micro-organismes de la flore orale sont schématiquement divisées en trois groupes : diagnostic bactériologique, diagnostic

immunologique et diagnostic moléculaire. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients qui permettent de définir avec précision leur champ d'application. L'étiologie bactérienne des maladies parodontales amène à mettre l'accent sur l'importance des examens microbiologiques dans le diagnostic et le traitement de ces pathologies. Cependant, la complexité de la flore buccale commensale rend difficile l'utilisation optimale de ces examens. Ces particularités de la flore buccale justifient l'intérêt actuellement porté par de nombreuses équipes de chercheurs et de cliniciens à son étude et sa compréhension.

## Diagnostic bactériologique

Le diagnostic bactériologique est fondé sur le principe de l'isolement et de la culture des bactéries d'intérêt. Ces techniques sont les plus anciennes. Elles constituent donc la méthode de référence permettant d'évaluer toute autre stratégie.

*Les principaux avantages des cultures sont :*

- l'aspect non ciblé de ces techniques qui permettent donc d'identifier un grand nombre de micro-organismes,
- la possibilité de réaliser un antibiogramme après isolement des bactéries pathogènes d'intérêt.

*Les principaux inconvénients de la culture sont :*

- le coût élevé,
- la durée de l'examen (5 à 6 semaines),
- la faible sensibilité de la méthode,
- la variabilité des compétences du microbiologiste,
- l'impossibilité ou la difficulté de cultiver certaines espèces microbiologique (*Bacteroides forsythus*, *Treponema sp...*),
- l'aspect essentiel du milieu de transport qui doit permettre la survie des espèces anaérobies et capnophiles tout en limitant les phénomènes de compétition ou d'inhibition interbactériens.

Les études bactériologiques de la flore buccale, et plus spécifiquement de la flore parodontale (sous-gingivale), présentent de nombreuses difficultés liées à l'obligation de maintenir une anaérobiose la plus stricte possible tout au long de la chaîne d'analyse, c'est-à-dire du prélèvement au résultat de l'antibiogramme, un mois plus tard. La culture en anaérobiose est basée sur le principe de la recherche de tous les moyens permettant d'éliminer l'oxygène de l'atmosphère et des milieux de culture bactérienne. Le prélèvement est placé dans un milieu de transport anaérobie. Puis dans un délai maximal de 48 heures après le prélèvement d'un échantillon de plaque sous-gingivale, ce dernier doit parvenir dans un laboratoire adapté,

c'est-à-dire être placé dès réception dans une station d'anaérobiose. La densité de l'échantillon ( $10^5$  à  $10^9$  bactéries) requiert de faire des séries de dilutions de 10 en 10,ensemencées sur des milieux de culture non sélectifs et sélectifs. Les milieux de culture non sélectifs sont enrichis avec de nombreux facteurs de croissance (sang de mouton, sérum de cheval, hémine, ménadione, vitamine K1...). Ils permettent la croissance d'un maximum d'espèces bactériennes nécessitant des conditions d'anaérobiose ou un taux de  $\text{CO}_2$  de 5 à 10 %. La quantification du nombre total de bactéries viables dans l'échantillon est souvent réalisée sur ce type de milieu. Les milieux de culture sélectifs contiennent des antibactériens qui vont éliminer ou réduire de façon très importante les micro-organismes qui ne sont pas désirés, favorisant ainsi l'émergence des espèces d'intérêt. Les principales espèces bactériennes de la flore sous-gingivale pour lesquelles nous disposons d'un milieu sélectif sont : *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga* sp., *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides* sp., *Porphyromonas* sp., *Prevotella* sp., *Haemophilus* sp., *Actinomyces* sp., *Streptococcus* sp... La croissance sur milieu de culture solide permet le développement de colonies dont la morphologie est souvent caractéristique de l'espèce. L'identification bactérienne repose sur une série de critères morphologiques, biochimiques et enzymatiques : aspect des colonies, aspect des bactéries en microscopie photonique après coloration de Gram, mobilité, test à l'oxydase, test catalase, fermentation des sucres, réduction des nitrates...

La complexité des approches bactériologiques par culture dans l'étude d'une flore anaérobie a incité les bactériologistes s'intéressant à la flore buccale à faire appel à d'autres stratégies, immunologique et moléculaire.

## Diagnostic immunologique

Le diagnostic immunologique repose sur la spécificité de la réaction antigène-anticorps. Il peut permettre la détection des antigènes bactériens (détection directe de la bactérie) ou d'immunoglobulines de type IgG ou IgM (détection de la réaction immunitaire humorale de l'hôte dirigée contre la bactérie d'intérêt).

Les principaux avantages du diagnostic immunologique sont :

- la rapidité (de l'ordre de quelques heures),
- le travail sur des échantillons non vivants (bactéries mortes),
- la simplicité et la facilité à standardiser (adaptable en kit pour réaliser des tests diagnostiques éventuellement au cabinet dentaire),
- le coût modéré,
- le sérotypage qui peut apporter en outre des éléments d'information épidémiologique.

Le diagnostic immunologique présente certains inconvénients :

- c'est une méthode ciblée de recherche des micro-organismes; on ne peut trouver que ce que l'on cherche,
- la sensibilité est médiocre (de l'ordre de  $10^{-4}$ ),
- la spécificité est très variable selon les réactifs utilisés : excès de spécificité des anticorps monoclonaux et manque de spécificité des réactifs polyclonaux,
- l'importance de disposer de contrôles positifs et négatifs afin d'interpréter correctement les résultats des essais,
- l'impossibilité de connaître la sensibilité aux antibiotiques sans isolement,
- la quantification n'est souvent qu'une semi-quantification (ELISA, agglutination sur latex...).

De nombreux laboratoires ont développé des productions d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dirigés contre les principaux pathogènes du parodonte humain : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, et d'autres.

Les principales techniques immunologiques qui peuvent être utilisées pour le diagnostic immunologique sont : le test d'agglutination au latex, la cytométrie en flux, le test ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), l'immunofluorescence directe ou indirecte. Le principe de l'agglutination au latex a été utilisé pour la mise au point de kit diagnostique destiné au cabinet dentaire pour identifier *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Cependant, ce type de test ne présente pas les critères de qualité requis pour le diagnostic. La sensibilité trop faible est à l'origine de nombreux faux négatifs. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ne correspondant qu'aux principaux sérotypes connus est également à l'origine de faux négatifs.

Les systèmes de détection des pathogènes du parodonte par des techniques immunologiques sont d'excellents outils de laboratoire destinés à la recherche, mais ils supportent mal l'adaptation à une présentation en kit qui engendre, pour l'instant, une dégradation de la sensibilité et de la spécificité des résultats.

## Diagnostic moléculaire

Les diagnostics par sonde génétique reposent sur les propriétés et la structure de la molécule d'ADN. La molécule d'ADN est composée de l'union de deux brins, enroulés en double hélice. Chaque brin est composé d'une longue chaîne de polydésoxyribonucléotides. Les deux chaînes d'ADN s'associent entre elles au niveau de leurs bases. Les bases sont au nombre de quatre et s'associent deux à deux : adénine-thymine et guanine-cytosine. Ces deux couples de bases sont dits complémentaires. Les chaînes de polydésoxyribonucléotides ont la propriété de s'apparier (s'hybrider)

avec leur réplique complémentaire. Si on dispose d'une copie fidèle et pure d'un gène ou d'un fragment de gène dont on veut repérer une séquence identique d'intérêt, cette copie pure peut être marquée avec un isotope radioactif ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ) ou non radioactif (biotine, avidine...), et porte aussi le nom de sonde. Deux notions sont essentielles dans le concept de sonde : la spécificité : une sonde ne peut s'hybrider avec une très forte affinité qu'avec le gène dont elle est la copie; la sensibilité : le marquage radioactif ou non radioactif facilite le repérage et la quantification de la sonde et de son hybridation.

L'utilisation des sondes génétiques dans le diagnostic des infections parodontales est basée sur l'existence, pour tout micro-organisme, de parties spécifiques de son génome qui le distingue des autres micro-organismes. Les sondes génétiques peuvent être réalisées à partir d'ADN, d'ARN ou d'oligonucléotides de synthèse.

*Les principaux avantages du diagnostic moléculaire sont :*

- la spécificité maximale lorsque la sonde est convenablement sélectionnée,
- la sensibilité, de l'ordre de  $10^{-3}$  avec des sondes marquées par radioéléments et  $10^{-4}$  avec un marquage non radioactif,
- l'utilisation de techniques d'amplification (PCR : *polymerase chain reaction*) qui permettent d'abaisser le seuil de sensibilité à la présence de quelques bactéries cibles dans l'échantillon,
- la rapidité, de l'ordre de 24 à 48 heures,
- le travail sur des échantillons non vivants (bactéries mortes),
- la simplicité et la facilité à standardiser,
- le coût modéré,
- l'apport d'éléments d'information épidémiologique.

*Il existe des inconvénients au diagnostic moléculaire :*

- la recherche ciblée des micro-organismes,
- l'impossibilité de connaître la sensibilité aux antibiotiques sans isolement,
- la quantification partielle.

Des sondes moléculaires ont été développées vis-à-vis de tous les principaux pathogènes parodontaux : *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus micros*...

## Types de sonde

Plusieurs types de sondes génétiques existent. Chacune présente des caractéristiques différentes et n'est pas utilisable pour le même usage. Les sondes à visée diagnostique doivent répondre à des impératifs de spécificité stricte limitant le plus possible les tests faussement positifs. Les principales catégories de sondes moléculaires sont les suivantes :

- *Les sondes génomiques globales.* Ce type de sonde utilise l'ensemble du génome bactérien marqué par radioéléments ou par des éléments non radioactifs. La sonde est donc une macromolécule présentant des zones très spécifiques du micro-organisme d'intérêt et des zones ubiquitaires, non spécifiques qui seront à l'origine de nombreuses réactions d'hybridations croisées.
- *Les sondes génomiques par clonage aléatoire.* La taille d'une sonde (nombre de paires de bases) est un critère important de qualité dans le choix d'une sonde à visée diagnostique. Trop courte, elle présentera une faible affinité pour sa cible. Cette faible affinité diminuera la sensibilité du test. Trop longue, la sonde présentera de nombreuses réactions croisées. Les sondes génomiques par clonage aléatoire ont une taille sélectionnée entre 2 et 6 kb (kilobases). Cette fenêtre de taille semble être idéale pour favoriser une bonne hybridation et suffisamment courte pour sélectionner une séquence spécifique du micro-organisme d'intérêt.
- *Les sondes ADNc.* Ces sondes sont obtenues à partir d'ARN messenger purifié ou enrichi. Elles correspondent uniquement à des séquences exoniques. Elles sont principalement utilisées pour des diagnostics sur cellules eucaryotes.
- *Les ribosondes.* Les ribosondes sont des séquences d'ARN simple brin. Elles sont obtenues par voie biologique en transcrivant *in vivo*, par une ARN polymérase un fragment de ADNc ou d'ADN génomique inséré dans un vecteur possédant un promoteur fort. Ces sondes présentent l'avantage de pouvoir être radiomarquées de façon uniforme et de présenter une forte activité spécifique. Elles permettent de mettre en évidence des séquences fortement conservées chez les bactéries.
- *Les oligosondes de synthèse.* Les oligosondes de synthèse sont de courtes séquences d'ADN monocaténaire, synthétisées *in vitro* par des automates. Elles dépassent rarement quelques dizaines de bases. Leur faible longueur est à l'origine d'une affinité faible nécessitant des conditions de lavage ou post-hybridation de faible stringence pour ne pas perdre le signal.

Ces différentes caractéristiques des sondes génétiques expliquent les divergences de résultats obtenus en diagnostic. Les sondes génomiques par clonage aléatoire semblent être très intéressantes pour le diagnostic. À l'inverse les sondes génomiques globales sont les moins adaptées. Les oligosondes peuvent être intéressantes si elles sont manipulées de façon adaptée.

## Intérêt des examens de laboratoire en microbiologie

### Diagnostic

Un nombre important de micro-organismes est impliqué dans l'étiologie des maladies parodontales. La sélection d'un traitement et le pronostic seront différents en fonction des bactéries pathogènes identifiées. La première étape consistera à déterminer les pathogènes spécifiques qui infectent

les sites parodontaux d'un patient. Les prélèvements pourront provenir d'un seul site ou d'une série de sites d'un même patient, ce qui permettra d'obtenir un meilleur reflet de la flore parodontale sous-gingivale.

### **Pronostic**

La présence de certains pathogènes permet d'apprécier le potentiel évolutif de lésions parodontales (*Porphyromonas gingivalis*). L'association de certaines souches entre elles peut potentialiser leur virulence (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedius*) et accélérer le processus de destruction des tissus parodontaux (Slots, 1986). La titration de la flore sous-gingivale apporte également des informations supplémentaires qui aideront le clinicien à apprécier l'évolution d'une pathologie parodontale.

### **Contrôle d'un traitement**

En toute rigueur, l'efficacité d'un traitement parodontal se traduit par la disparition de la symptomatologie clinique et la disparition des principaux pathogènes impliqués dans cette pathologie.

Si, à la suite d'un traitement initial (détartrage, surfaçage, curetage), des phénomènes inflammatoires persistent au niveau de certains sites et que des pathogènes parodontaux spécifiques sont retrouvés, le traitement devra être repris afin d'obtenir la disparition des signes cliniques et des pathogènes.

### **Indication d'une antibiothérapie**

La nature des micro-organismes isolés peut aider le thérapeute à poser l'indication d'antibiothérapie. Par exemple, dans la situation d'une parodontite juvénile localisée, l'éradication de *A. actinomycetemcomitans* nécessitera l'association de traitements mécanique, chirurgical et d'une antibiothérapie par voie générale. L'absence d'utilisation d'une antibiothérapie dans cette situation se traduira, dans le meilleur des cas, par une réduction du nombre d'*A. actinomycetemcomitans*. À l'inverse, face à une parodontite de l'adulte et en présence d'une flore sous-gingivale à virulence modérée, une antibiothérapie ne sera pas nécessaire. Un traitement associant des phases de détartrage, surfaçage et curetage à des antiseptiques et une hygiène de qualité peut apporter d'excellents résultats.

### **Choix de l'antibiotique**

L'antibiogramme est classiquement utilisé en bactériologie médicale afin de déterminer la sensibilité bactérienne à différentes molécules antibiotiques. Cette méthode permet également de contrôler immédiatement la présence d'un mutant ou d'une résistance inductible, de distinguer l'effet antagoniste ou synergique d'une association de deux antibiotiques. Les résultats

de cet examen appliqués aux bactéries anaérobies et capnophiles de la cavité buccale apportent des informations importantes au clinicien afin qu'il puisse choisir l'antibiotique ou l'association de molécules antibiotiques la plus appropriée.

## Conclusion

Les progrès de la bactériologie anaérobie ont apporté aux cliniciens une meilleure compréhension des pathologies parodontales ainsi qu'une aide dans leur diagnostic, traitement et réévaluation. Cependant le faible nombre de laboratoires de microbiologie formés à l'isolement et à l'identification des bactéries anaérobies et capnophiles de la cavité buccale limite de façon importante l'utilisation de ce type d'examen biologique. Il est souhaitable qu'à court terme un plus grand nombre de laboratoires puisse proposer aux chirurgiens dentistes, de façon routinière, des examens de la flore sous-gingivale.

## RÉFÉRENCES

- ADONOGIANAKI E, MOUGHAL NA, KINANE DF. Lactoferrin in the crevicular crevice as a marker of polymorphonuclear leucocytes in periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1993 **20** : 26-31
- ALFANO MC. The origin of gingival fluid. *J Theor Biol* 1974 **47** : 127-138
- ALFANO MC, BROWNSTEIN CN, CHASENS AI, KASLICK RS. Passively generated increase in gingival crevicular fluid glow from human gingiva. *J Dent Res* 1976 **55** : 1132-1136
- ARMITAGE GC, JEFFCOAT MK, CHADWICK DE, TAGGART EJ, NUMABE Y, LANDIS JR, WEAVER SL, SHARP TJ. Longitudinal evaluation of elastase as a marker for the progression of periodontitis. *J Periodontol* 1994 **65** : 120-128
- BAAB DA, PAGE RC, EBERSOLE, JL, WILLIAMS BL, SCOTT CR. Laboratory studies of a family manifesting premature exfoliation of deciduous teeth. *J Clin Periodontol* 1986 **13** : 677-683
- BIRKEDAL-HANSEN H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993 **64** : 474-484
- BRILL N, KRASSE B. The passage of tissue fluid into the clinically healthy gingival pocket. *Acta Odontol Scand* 1958 **16** : 233-245
- CHAMBERS DA, IMREY PB, COHEN RL, CRAWFORD JM, ALVES ME, MCSWIGGIN TA. A longitudinal study of aspartate aminotransferase in human gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1991 **26** : 65-74
- CIMASONI G. *Crevicular fluid updated. Monographs in Oral Science (vol. 12)*. Basel, Karger, 1983
- COX SW, ELEY BM. Trypsin-like activity in crevicular fluid from gingivitis and periodontitis patients. *J Periodont Res* 1989 **24** : 41-44

- COX SW, ELEY BM. Cathepsin B/L, elastase, trypase, trypsin- and dipeptidyl peptidase IV-like activities in gingival crevicular fluid. A comparison of levels before and after basic periodontal treatment of chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1992 **19** : 333-339
- CURTIS MA, GILLETT IR, GRIFFITHS GS, MAIDEN MFJ, STERNE JAC, WILTON DT, WILTON JMA, JOHNSON NW. Detection of high risk groups and individuals for periodontal diseases : laboratory markers from analysis of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1989 **16** : 1-11
- CURTIS MA, SLANEY JM, CARMAN RJ, HARPER FH, WILTON JMA, GRIFFITHS GS, JOHNSON NW. Serum IgG antibody response to antigens of presumed periodontal pathogens : a case-control study using ELISA and Western Blot analysis. *Microbiol Health Disease* 1990 **3** : 251-258
- DOUGLASS C, FOX CH. Determining the value of a periodontal diagnostic test. *J Periodontol* 1991 **62** : 721-730
- DZINK JL, SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1988 **15** : 316-323
- EMBERY G, WADDINGTON RJ, LAST K.S. The connective tissue of the periodontium and their breakdown products in gingival crevicular fluid as markers of periodontal disease susceptibility and activity. In NW Johnson (ed) : *Risk markers for oral diseases (vol. 3). Periodontal diseases*. Cambridge, Cambridge University Press, 1991, pp. 338-364
- FLACK VF, ATCHISON KA, HEWLETT ER, WHITE SC. Relationships between clinician variability and radiographic guidelines. *J Dent Res* 1996 **75** : 775-782
- GANGBAR S, OVERALL CM, MCCULLOCH CAG, SODEK J. Identification of polymorphonuclear leukocyte collagenase and gelatinase activities in mouthrinse samples : correlation with periodontal disease activity in adult and juvenile periodontitis. *J Periodont Res* 1990 **25** : 257-267
- GIANNOBILE WV, RIVIERE GR, GORSKI JP, TIRA DE, COBB CM. Glycosaminoglycans and periodontal disease : analysis of GCF by safranin O. *J Periodontol* 1993 **64** : 186-190
- GIANNOBILE WV, LYNCH SE, DENMARK RG, PAQUETTE DW, FIORELLINI JP, WILLIAMS RC. Crevicular fluid osteocalcin and pyridinoline cross-linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) as markers of rapid bone turn-over in periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995 **22** : 903-910
- GOODSON JM, TANNER ACR, HAFFAJEE AD, SORNBERGER GC, SOCRANSKY SS. Patterns of progression and regression of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982 **9** : 472-481
- GOODSON JM. Diagnosis of periodontitis by physical measurement : interpretation from episodic disease hypothesis. *J Periodontol* 1992 **63** : 373-382
- GRIFFITHS GS, STERNE JAC, WILTON JMA, EATON KA, JOHNSON NW. Associations between volume and flow rate of gingival crevicular fluid and clinical assessments of gingival inflammation in a population of British male adolescents. *J Clin Periodontol* 1992 **19** : 464-470
- HAFFAJEE AD, SOCRANSKY SS, GOODSON JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 1983 **10** : 298-310
- HARPER DS, LAMSTER IB, CELENTI R. Relationship of subgingival plaque flora to lysosomal and cytoplasmic enzyme activity in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 1989 **16** : 164-169

- HART TC. Genetic risk factors for early-onset periodontitis. *J Periodontol* (Suppl) 1996 **67** : 355-366
- HUJOEL PP, MOULTON GH, LOESCHE WJ. Estimation of sensitivity and specificity of site-specific diagnosis tests. *J Periodont Res* 1990 **25** : 193-196
- IMREY PB, CRAWFORD JM, COHEN RL, ALVES ME, MCSWIGGIN TA, CHAMBERS DA. A cross-sectional analysis of aspartate amino-transferase in human gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1991 **26** : 75-84
- JIN LJ, SÖDER PÖ, ASMAN B, BERGSTROÖM K. Granulocyte elastase in gingival crevicular fluid : improved monitoring of the site-specific response to treatment in patients with destructive periodontitis. *J Clin Periodontol* 1995 **22** : 240-246
- JOHNSON NW, GRIFFITHS GS, WILTON JMA, MAIDEN MFJ, CURTIS MA, GILLETT IR, WILSON DT, STERNE JAC. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases.-Evidence for the existence of high-risk groups and individuals and approaches to their detection. *J Clin Periodontol* 1988 **15** : 276-282
- LAMSTER IB, OSHRAIN RL, CELENTI R, LEVINE K, FINE JB. Correlation analysis for clinical and gingival crevicular fluid parameters at anatomically related gingival sites. *J Clin Periodontol* 1991 **18** : 272-277
- LANG NP, ADLER R, JOSS A, NYMAN S. Absence of bleeding on probing. An indicator of periodontal stability. *J Clin Periodontol* 1990 **17** : 714-721
- LANG NP, BRÄGGER U. Periodontal diagnosis in the 1990s. *J Clin Periodontol* 1991 **18** : 370-379
- MCCULLOCH CAG. Host enzymes in gingival crevicular fluid as diagnostic indicators of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1994 **21** : 497-506
- NAKASHIMA K, ROEHRICH N, CIMASONI G. Osteocalcin, prostaglandin E2 and alkaline phosphatase in gingival crevicular fluid : their relations to periodontal status. *J Clin Periodontol* 1994 **21** : 327-333
- NELSON SL, HYND BA, PICKRUM HM. Automated enzyme immunoassay to measure prostaglandin E2 in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1992 **27** : 143-148
- NEMETH E, KULKARNI GW, MCCULLOCH CA. Disturbances of gingival fibroblast population homeostasis due to experimentally inflammation in the *cynomolgus* monkey : potential mechanism of disease progression. *J Periodont Res* 1993 **28** : 180-190
- OFFENBACHER, SOSKOLNE WA, COLLINS JG. Prostaglandins and other eicosanoids in gingival crevicular fluid as markers of periodontal disease susceptibility and activity. In NW Johnson (ed) : *Risk markers for oral diseases (vol. 3), Periodontal diseases*. Cambridge, Cambridge University Press, 1991, pp. 313-337
- OVERALL CM, SODEK J, MCCULLOCH CA, BIREK P. Evidence for polymorphonuclear leukocyte collagenase and 92 kDa gelatinase in gingival crevicular fluid. *Infect Immun* 1991 **59** : 4687-4692
- PAGE RC, BEATTY P, WALDROP TC. Molecular basis for the functional abnormality in neutrophils from patients with generalized prepubertal periodontitis. *J Periodont Res* 1987 **22** : 182-193
- PAGE RC. Host response tests for diagnosing periodontal diseases. *J Periodontol* 1992 **63** : 356-366
- PALCANIS KG, LARJAVA IK, WELLS BR, SUGGS KA, LANDIS JR, CHADWIK DE, JEFFCOAT MK. Elastase as an indicator of periodontal disease progression. *J Periodontol* 1992 **63** : 237-242

- PERSSON GR, PAGE RC. Diagnostic characteristics of crevicular fluid aspartate aminotransferase (AST) levels associated with periodontal disease activity. *J Clin Periodontol* 1992 **19** : 43-48
- PERSSON GR. A multicenter clinical trial of PerioGard tm in distinguishing between diseased and healthy periodontal sites. *J Periodont Res* 1995 **22** : 794-803
- PREISS DS, MEYLE J. Interleukin-1b concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 1994 **65** : 423-428
- RANNEY RR. Classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 1993 **2** : 13-26.
- REINHARDT RA, MASADA MP, KALDAHL WB, DUBOIS LM, KORNMANN KS, CHOI JI, KALKWARF KL, ALLISON AC. Gingival fluid IL-1 and IL-6 levels in refractory periodontitis. *J Clin Periodontol* 1993 **20** : 225-231
- SIBRAA PD, REINHARDT RA, DYER JK, DU BOIS LM. Acute-phase protein detection and quantification in gingival crevicular fluid by direct and indirect immunodot. *J Clin Periodontol* 1991 **18** : 101-106
- SLOTS J. Bacterial specificity in adult periodontitis. A summary of current work. *J Clin Periodontol* 1986 **13** : 912-917
- SMITH QT, HARRIMAN L, AU GS, STOLTENBERG JB, AEPPLI DM, FISHER G. Neutrophil elastase in crevicular fluid : comparison of a middle-aged general population with healthy and periodontitis groups. *J Clin Periodontol* 1995 **22** : 935-941
- SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease : current concepts. *J Periodontol* 1992 **63** : 322-331
- SUGITA N, SUZUKI T, YOSHIDA N, ADACHI M, HARA K. Differential expression of CR3, FcεRII and FcγRIII on polymorphonuclear leukocytes in gingival crevicular fluid. *J Periodont Res* 1993 **28** : 363-372
- TAKEUCHI Y, SAKURAI K, IKE I, YOSHIE H, KAWASAKI K, HARA K. ICAM-1 expressing pocket epithelium, LFA-1-expressing T-cells in gingival tissue and gingival crevicular fluid as features characterizing inflammatory cell invasion and exudation in adult periodontitis. *J Periodont Res* 1995 **30** : 426-435
- TALONPOIKA JT, HÄMÄLÄINEN MM. Collagen III aminoterminal propeptide in gingival crevicular fluid before and after periodontal treatment. *Scand Dent Res* 1992 **100** : 107-110
- TALONPOIKA JT, HÄMÄLÄINEN MM. Type I collagen carboxyterminal telopeptide in human gingival crevicular fluid in different clinical conditions and after periodontal treatment. *J Clin Periodontol* 1993 **21** : 320-326
- TYNELIUS-BRATTHAL G, ATTSTRÖM R. Acid phosphatase, hyaluronidase and protease in crevices of healthy and chronically inflamed gingiva in dogs. *J Dent Res* 1972 **51** : 279-283
- TZAMOURANIS A, MATTHYS J, ISHIKAWA I, CIMASONI G. Increase of extracellular cathepsin D activity in gingival washings during experimental gingivitis in man. *Arch Oral Biol* 1977 **22** : 375-378
- VAN DYKE TE, WILSON-BURROUGHS C, OFFENBACHER S, HENSON P. Association of an abnormality of neutrophil chemotaxis in human periodontal disease with a cell surface protein. *Infect Immun* 1987 **55** : 2262-2267
- VAN DYKE TE, WARBINGTON M, GARDNER M, OFFENBACHER S. Neutrophil surface protein markers as indicators of defective chemotaxis in LJP. *J Periodontol* 1990 **61** : 180-184
- WIKESJÖ UME, NILVEUS R, SELVIG K.A. Significance of early events on periodontal repair : a review. *J Periodontol* 1992 **63** : 158-165

- ZAFIROPOULOS GG, FLORES de JACOBY L, TODT G, KOLB G, HAVEMANN K, TATAKIS DN. Gingival crevicular fluid elastase-inhibitor complex : correlation with clinical indices and subgingival flora. *J Periodont Res* 1991 **26** : 24-32