



Thèse

2025

Open Access

This version of the publication is provided by the author(s) and made available in accordance with the copyright holder(s).

L'activité antimicrobienne du laser à diode 970 nm sur les biofilms
intracanalaires d'*Enterococcus Faecalis*

Tanner, Soraya

How to cite

TANNER, Soraya. L'activité antimicrobienne du laser à diode 970 nm sur les biofilms intracanalaires d'*Enterococcus Faecalis* . Doctoral Thesis, 2025. doi: 10.13097/archive-ouverte/unige:183092

This publication URL: <https://archive-ouverte.unige.ch/unige:183092>

Publication DOI: [10.13097/archive-ouverte/unige:183092](https://doi.org/10.13097/archive-ouverte/unige:183092)

Clinique universitaire de médecine
dentaire
Division de cariologie et d'endodontie

Thèse préparée sous la direction du Professeur Serge Bouillaguet

" L'activité antimicrobienne du laser à diode 970 nm sur les biofilms
intra-canalaires d'*Enterococcus Faecalis* "

Thèse
présentée à la Faculté de Médecine
de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de Docteur en médecine
par

Soraya TANNER

de

Lugano (Tessin)

Thèse n° 819

Genève

2025

Table des matières

Table des matières	2
Résumé.....	3
Introduction.....	4
Principes en endodontie	4
Laser en endodontie.....	9
Principes de base (2 types).....	9
SIROLaser Blue	16
Discussion	Erreur ! Signet non défini.
Discussion de la méthode	18
Discussion des résultats.....	23
Comparaison avec d'autre études	26
Conclusion	28
Bibliographie.....	29
Article (pièce jointe)	35

Résumé

Objectif : Évaluer l'effet photothermique d'un laser à diode de 970 nm sur des biofilms de *E. faecalis* à l'intérieur des canaux radiculaires.

Matériel et méthodes : 72 dents humaines extraites ont été préparées, stérilisées, puis infectées avec *Enterococcus Faecalis* pendant 2 semaines pour produire des biofilms matures. Les échantillons ont été répartis en six groupes : G1 (contrôle négatif - PBS sans laser), G2 (contrôle positif - NaOCl 1 % sans laser), G3 (laser 970 nm, 1,5 W, mode pulsé), G4 (laser 970 nm, 2 W, mode pulsé), G5 (laser 970 nm, 1,5 W, mode continu), et G6 (laser 970 nm, 2 W, mode continu). La viabilité bactérienne a été mesurée par cytométrie en flux (FCM) après coloration avec le kit LIVE/DEAD BacLight. Les variations de température à la surface radiculaire pendant l'irradiation ont été évaluées à l'aide d'un thermocouple de type K. Les données ont été analysées statistiquement via une ANOVA et le test de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Résultats : La viabilité bactérienne a été réduite de manière significative en mode continu, avec 21 % de bactéries vivantes à 1,5 W et 14 % à 2 W. En mode pulsé, la survie bactérienne était plus élevée, avec 53 % à 1,5 W et 29 % à 2 W.

Conclusion : Le laser à diode de 970 nm en mode continu à 2 W réduit efficacement la viabilité des biofilms d'*E. faecalis* dans les canaux radiculaires, sans provoquer de hausses de température excessives à la surface de la racine.

Introduction

Principes en endodontie

L'objectif du traitement endodontique est d'éliminer les microorganismes ainsi que les tissus vivants ou nécrosés présents dans tous les compartiments de l'endodonte (pulpe camérale, canaux radiculaires et accessoires / latéraux). Afin d'atteindre cet objectif, le traitement comporte plusieurs étapes fondamentales [1].

Dans un premier temps la mise en forme canalaire est réalisée à l'aide d'instruments manuels et mécanisés en combinaison avec des rinçage d'irrigants. Ceci permet un débridement mécanique de l'intérieur des canaux et des parois canalaire qui favorise une désinfection progressive. L'obturation canalaire qui fait suite à la mise en forme et la désinfection doit être effectuée, afin d'assurer une étanchéité canalaire et d'empêcher une colonisation ou recolonisation bactérienne de l'endodonte. Pour finir, une obturation coronaire va venir assurer un scellement hermétique afin de prévenir toute contamination ou de ré-contamination depuis la cavité orale [1, 2].

En ce qui concerne la désinfection canalaire, celle-ci est réalisée à l'aide d'irrigants qui devraient idéalement présenter les caractéristiques suivantes : [3, 4]

- Une activité antibactérienne puissante
- Pouvoir dissoudre et éliminer les tissus organiques vivants ou nécrotiques (sans oublier les zones inaccessibles par les instruments manuels et mécaniques)
- Des propriétés chélatrices, afin de pouvoir dissoudre les débris inorganiques produits par l'instrumentation (c'est-à-dire la boue dentinaire (*smear layer*))

- Être biocompatibles pour les tissus environnants (en cas d'extrusion)
- Aucun effet cytotoxique
- Une action lubrifiante pour faciliter l'instrumentation canalaire

À l'heure actuelle, il n'existe aucun irrigant qui satisfait tous les critères en même temps [4, 5]. C'est pour cela qu'une combinaison d'irrigants est conseillée.

La combinaison d'hypochlorite de sodium (NaOCl) et d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) est depuis longtemps décrite comme le *gold standard* en endodontie, car elle permet de cumuler l'ensemble des propriétés mentionnées ci-dessus. Le NaOCl est l'irrigant le plus utilisé, il a un effet nettoyant, lubrifiant, dénaturant (pouvoir dissolvant sur les tissus organiques) et bactéricide. Il est utilisé à une concentration qui se situe entre 1 % et 6 % [3, 6]. Le NaOCl se dissocie dans l'eau en ions Na^+ et OCl^- , ceci en établissant un équilibre avec HOCl. A pH neutre ou acide, le chlore existe principalement sous forme de HOCl, alors qu'à pH élevé de 9 et plus, l' OCl^- prédomine [7]. Ceci est important car, c'est l'acide hypochloreux qui est responsable principalement de l'activité antibactérienne, tandis que le ion OCl^- est moins efficace [8].

Afin d'éliminer les résidus inorganiques (boue dentinaire) sur lesquels le NaOCl n'a aucune action, la solution la plus utilisée est l'EDTA à 17%. Cette dernière agit comme un agent chélateur ; le sels d'EDTA captent les ions Ca^{2+} du phosphate tricalcique en les rendant solubles donc favorisant leur élimination. Cette étape permet l'exposition des tubulis dentinaires couverts par la smear layer, ce qui favorise leur désinfection. Elle permet donc une meilleure pénétration des produits désinfectants dans la dentine, augmentant par conséquent l'effet antibactérien de l'hypochlorite de sodium [3, 9].

Il est reconnu que des accidents d'extrusion d'hypochlorite au-delà de l'apex peuvent survenir lors des traitements endodontiques. Cette situation peut entraîner des

endommagements tissulaires, car le contact de l'hypochlorite avec les tissus vitaux peut provoquer des ulcérations, une hémolyse et, dans certains cas, des cicatrices ou des lésions nerveuses [10]. Ces risques potentiels ont suscité la recherche de stratégies alternatives pour éradiquer les bactéries intra-canalaire.

Il a été établi que la charge bactérienne doit être réduite le plus possible pour maximiser les chances de succès d'un traitement endodontique [11, 12], même si un seuil exact n'a pas encore été défini. La désinfection et l'instrumentation du canal radiculaire sont essentiels dans la diminution de la charge bactérienne [13]. Cependant, éliminer entièrement (stériliser) toutes les bactéries et leurs dérivés d'un système canalaire contaminé reste extrêmement difficile, voire impossible [14].

Il a été démontré que les instruments utilisés seuls ne parviennent pas à assurer une désinfection complète, d'où l'importance de les associer à des produits de rinçage [15, 16]. Malgré cela, certaines zones peuvent rester intouchées par cette étape [17, 18]. La désinfection est rendue encore plus difficile à cause de la structure complexe des systèmes canaux, souvent composée de crêtes, deltas, isthmes et canaux latéraux. Les bactéries présentes dans ces zones sont protégées de l'action directe des désinfectants, car les solutions d'irrigation pénètrent de manière limitée dans la masse dentinaire [15, 16]. Cela laisse une quantité substantielle de dentine susceptible d'être infectée [18], et ces zones non traitées peuvent servir de refuge aux bactéries, qui s'infiltrant profondément dans les tubules dentinaires, atteignant des profondeurs allant jusqu'à 1150 μm [19].

Il existe donc, différents moyens visant à optimiser l'action antibactérienne des solutions d'irrigation et donc de permettre la désinfection profonde des zones d'accès difficiles comme les isthmes et les canaux latéraux / accessoires. En plus du

renouvellement continu des solutions d'irrigation à l'intérieur de la dent, il est possible de les activer afin d'optimiser leur efficacité :

- **Activation manuelle** : à l'aide d'un cône de gutta percha qui est introduit à la longueur de travail dans le canal rempli de solution d'irrigant, le liquide est agité par des mouvements de va et viens afin de créer des turbulences. Cette méthode est simple et économique [20, 21].
- **Activation par la chaleur** : l'hypochlorite de sodium (NaOCl) est chauffé entre 50 et 60°C avant d'être introduit dans le canal. La chaleur optimiserait son effet bactéricide en agissant comme un catalyseur, c'est-à-dire qu'elle améliore la capacité du NaOCl à dissoudre les tissus organiques [3, 22].
- **Activation ultrasonore** : un insert est introduit au sein du canal et va agiter l'irrigant. Il en existe deux types :
 - **PUI (Passive Ultrasonic Irrigation)** : L'irrigant est inséré dans le canal avant l'utilisation de la lime ultrasonore. Cette technique crée de petites cavitations (streaming acoustique) qui implosent, provoquant une agitation intense de l'irrigant. Cela permet une amélioration de l'élimination des débris et augmente la pénétration intratubulaire de l'irrigant au niveau du tiers apical [23-26].
 - **UNI (Ultrasonic Needle Irrigation)** : L'irrigation et l'activation par l'insert ultrasonore se font simultanément ; cette technique a été introduite par Nusstein [27]. Elle permet de réduire la charge bactérienne, en nettoyant non seulement le canal principal, mais aussi les isthmes et les canaux accessoires [28-30].

Dans ces techniques, l'insert vibre à l'intérieur du canal à des fréquences comprises entre 25 000 et 30 000 Hz. Cela produit un mécanisme appelé

streaming acoustique, qui génère un cisaillement permettant de détacher les débris accrochés aux parois canalaire [23].

- **Activation sonore** : comme pour l'activation ultrasonore, un insert non coupant est introduit dans le canal pour agiter l'irrigant. La différence entre les deux techniques réside dans les mouvements oscillatoires. Les fréquences, dans ce cas, sont plus faibles, variant entre 1 500 et 6 000 Hz. Cette méthode permet de retirer plus de débris qu'une simple désinfection par seringue [31]. La figure 1 illustre un appareil utilisé pour l'activation sonore (EndoActivator System, Dentsply Tulsa Dental Specialties).



Figure 1: EndoActivator (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK)

- **Activation par le laser** : plusieurs types de lasers ont été proposés en endodontie pour augmenter l'efficacité des irrigants, tels que les lasers diode, CO₂, Nd : YAG, Er : YAG [32, 33]. Ce sujet sera discuté plus en détail par la suite.

Dans certains cas, il est conseillé d'appliquer une médication intermédiaire avant l'obturation finale afin de contrôler l'infection et de diminuer la charge bactérienne [34, 35]. Cliniquement cela impose au praticien de terminer le traitement endodontique en deux séances distinctes. Par ailleurs, cette étape est actuellement très controversée. Certaines écoles préconisent de réaliser le traitement en deux séances et d'appliquer une médication intermédiaire pour chaque traitement, tandis que d'autres conseillent d'appliquer la médication uniquement si le canal n'a pas pu être séché complètement

ou en cas de symptomatologie présente [36, 37]. Pour cette étape, l'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) est la substance de choix et la plus couramment utilisée. L'objectif de la médication intra-canalair est d'assurer une désinfection continue afin de limiter la croissance bactérienne entre deux séances [38, 39]. L'intérêt réside dans sa faible solubilité, ce qui garantit un effet antimicrobien continu sur une longue période, pouvant aller jusqu'à 4 semaines [40].

À l'heure actuelle, des résistances bactériennes ont été mises en évidence, la plus fréquente lors des traitements endodontiques étant celle de la bactérie *E. faecalis*. [41, 42]. Cette bactérie a d'ailleurs été mise en cause dans de nombreuses études sur les échecs de traitements endodontiques. L'amélioration de la désinfection canalair est donc toujours en cours, et de nouvelles technologies sont étudiées pour faire face à ce problème, comme le laser, par exemple. Le but principal est d'augmenter le nettoyage en profondeur de la dentine, ce qui est souvent limité lors de l'usage de irrigants à cause de l'anatomie complexe du système canalair [4].

Laser en endodontie

Principes de base (2 types)

En endodontie, les lasers permettant d'améliorer la désinfection peuvent agir de deux façons différentes :

1. **Indirectement** : en irradiant/activant des substances photoactives (en anglais : Photoactivated Disinfection, PAD) ou des irrigants (Laser-Activated Irrigation, LAI et PIPS-SWEEPS Photon Induced Photoacoustic Streaming; Shock Wave-Enhanced emission Photo-acoustic Streaming - PIPS-SWEEPS)
2. **Directement** : en irradiant les parois dentinaires (en anglais : Conventional Laser Endodontics - CLE)

Lorsque l'application est indirecte, l'action se fait par un intermédiaire, ce qui implique qu'aucune interaction directe entre le laser et la surface dentinaire n'a lieu.

Dans le cas de la désinfection photoactivée (PAD), aussi appelée thérapie photodynamique antibactérienne (aPDT), le médiateur est un liquide coloré photoactif (photosensibilisateur antimicrobien) qui est introduit à l'intérieur du canal radiculaire et activé par des longueurs d'onde spécifiques, généralement celles du spectre visible (de 635 à 675 nm) et proches de l'infrarouge (810 nm). Lors de l'application du laser, un effet photochimique va activer le photosensibilisateur, ce qui entraînera la libération de radicaux actifs et d'oxygène singulet (ROS) générant l'effet bactéricide. Les photosensibilisateurs les plus utilisés sont : le bleu de méthylène, le bleu de toluidine O, les phthalocyanines, les chlorines, les porphyrines, les xanthènes et les monoterpènes [43]. Cette technique ne permet pas l'élimination de la smear layer, et l'élimination des bactéries est limitée par l'utilisation de photosensibilisateurs spécifiques aux espèces présentes [44, 45] .

L'irrigation activée par laser (LAI) implique l'activation d'un irrigant qui absorbe le rayonnement et va avoir une action sur les trois dimensions à l'intérieur des canaux,

ce qui amplifie la désinfection. Les lasers utilisés pour cette technique sont l'Erbium Yag, l'Erbium Chrome. L'effet recherché est de créer un phénomène de cavitation, qui génère des bulles (espaces vides) s'effondrant rapidement dans le liquide. Ce processus est très rapide et entraîne un effet en chaîne : dans un premier temps, une cavitation primaire se forme lorsque la bulle s'effondre. Cet effondrement est suivi par la formation de bulles de cavitation secondaires, créant des mouvements rapides au sein du fluide dans le canal [46-48]. Ces dernières sont plus petites que la première bulle ; de plus, après l'effondrement des bulles de cavitation secondaires, d'autres bulles, de taille encore plus petite, se forment et disparaissent ensuite en nombre décroissant [49]. Des micro-jets sont créés dans le fluide par les bulles de cavitation primaires et secondaires, ce qui génère des contraintes de cisaillement et des forces élevées le long des parois de la dentine, suffisantes pour éliminer le biofilm et la smear layer [46]. Plusieurs études ont montré que cette technique peut améliorer la désinfection [46-48]. Cette technique est utilisée avec des longueurs d'ondes situées entre 2780 nm et 2940 nm.

La fibre optique utilisée pour la technique PIPS – SWEEPS ne pénètre pas complètement dans le canal, comme pour la technique directe, mais reste stationnaire à l'entrée. La pointe utilisée a un design spécifique qui permet une dispersion latérale et la propagation d'ondes de choc (shock waves) dans le liquide. Pour cette technique, le laser Er : YAG est utilisé en mode pulsé, à une puissance sous-ablative. À l'intérieur de l'irrigant, des ondes photoacoustiques sont créées, et celles-ci sont efficaces au niveau des parois canalaire pour éliminer la smear layer [50]. Cette technique utilise des longueurs d'onde entre 2790 nm et 2940 et a également démontré de bons résultats [51, 52] .

Cependant, les techniques LAI et PIPS-SWEEPS soulèvent des inquiétudes quant aux

risques d'extrusion d'irrigants, car l'extrusion de NaOCl au-delà de l'apex radiculaire peut provoquer des nécroses tissulaires [53-55].

En ce qui concerne le CLE, les lasers ont des fibres qui peuvent être introduites dans les canaux radiculaires. Ces pointes, munies d'un embout d'émission fin en fibre optique, sont insérées à 1 mm de l'apex, et un mouvement hélicoïdal de rétraction est effectué pendant un temps déterminé. L'irradiation laser a un effet thermique (photothermique) direct sur les parois dentinaires et les bactéries présentes dans tout le système canalaire. Lorsqu'un laser proche de l'infrarouge est utilisé, puisqu'il n'a pas d'affinité avec l'eau et l'hydroxyapatite, la lumière pénètre directement dans les tubulis dentinaires et exerce des effets thermiques au niveau de la surface de la dentine et des bactéries. Cela permet d'avoir un effet bactéricide dans les couches profondes de la dentine [56, 57]. Les lasers utilisés pour ce type d'effet ont une longueur d'onde comprise entre 810 et 980 nm.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité de ces lasers dans la réduction des germes [57-59], tandis que d'autres n'ont rapporté aucun effet significatif [60-64]. De plus, le risque de lésion thermique des tissus parodontaux après une exposition prolongée et continue à l'irradiation par laser NIR a été rapporté [65, 66].

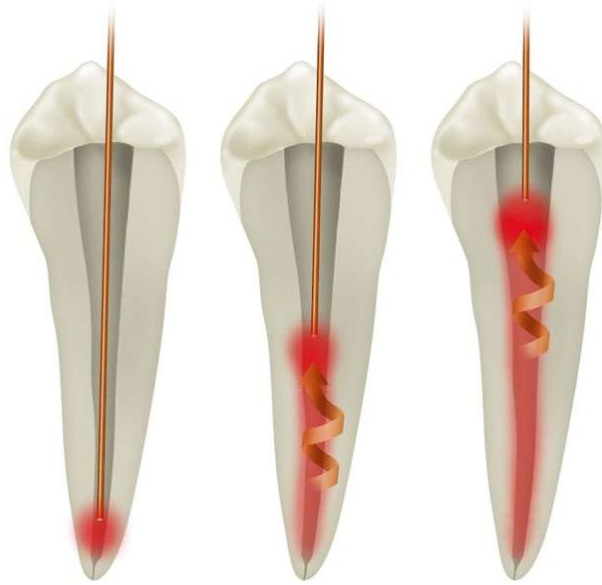


Figure 2 : Mouvements d'irradiation pour le Conventional laser endodontics, la fibre est positionnée dans un canal sec à 1 mm de l'apex et puis il est retrait de façon hélicoïdal (2 mm/s) (Image courtesy of Giovanni Olivi, Rome Italy)

*Tiré de: Lasers in Endodontics – Specific Background and Clinical Application;
Giovanni Olivi, Roeland De Moor, Enrico DiVito, Springer, 2016; Ch. 6 Conventional
Laser Endodontics, pag. 112*

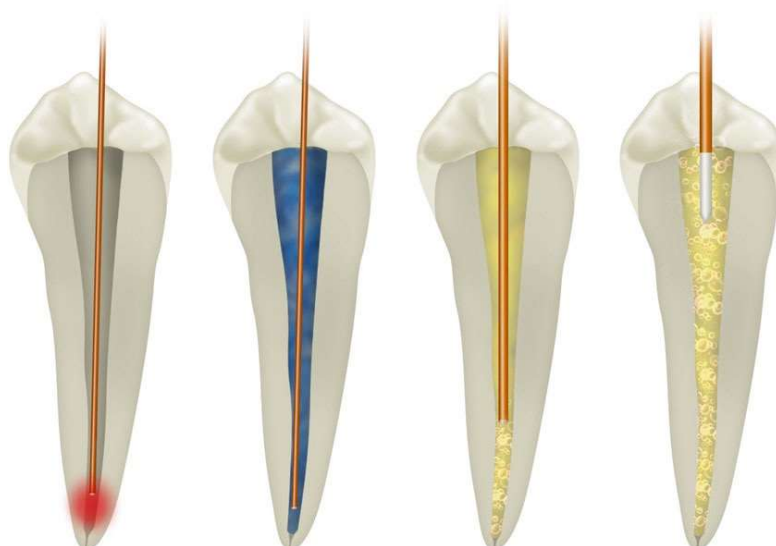


Figure 3 : Représentation des différentes techniques laser en endodontie. De gauche à droite : endodontie laser conventionnelle, PAD, LAI et PIPS

*Tiré de: Lasers in Endodontics – Specific Background and Clinical Application ;
Giovanni Olivi, Roeland De Moor, Enrico DiVito, Springer, 2016; Ch. 5 Different
Lasers Used in Endodontics, pag. 93*

Suit un tableau qui résume les différentes techniques avec leur différent aspect discuté avant :

Longueur d'onde	Technique laser	Cible chromophore	Interaction laser tissulaire	Effets laser
Visible	Conventionnel	Pigment bactérien	Diffusion	Photothermique
Proche infrarouge	Irradiation directe			
Medium infrarouge	Conventionnel	Contenu aqueux des bactéries dans la dentine	Absorption	Photothermique
	Irradiation directe			
Visible	PAD	Photosensibilants	Absorption	Photochimique
Proche infrarouge	Irradiation indirecte			
Medium infrarouge	LAI	Contenu aqueux des irrigants	Absorption	Photothermique cavitation
	Irradiation indirecte			

Medium infrarouge	PIPS Irradiation indirecte	Contenu aqueux des irrigants	Absorption	Photothermique photoacoustique cavitation
-------------------	-----------------------------------	------------------------------	------------	---

Tableau 1: Classification des techniques laser utilisé en endodontie

Tiré et traduit de : Lasers in Endodontics – Specific Background and Clinical Application ; Giovanni Olivi, Roeland De Moor, Enrico DiVito, Springer, 2016; Ch. 5 Different Lasers Used in Endodontics, pag. 92

Le but de cette étude était d'évaluer l'effet photothermique d'un laser diode de 970 nm sur un biofilm d'*Enterococcus faecalis*, en tenant compte à la fois de son potentiel antibactérien et des variations de température induites. Deux modes d'application du laser ont été testés : l'onde continue (CW) et l'onde pulsée (PW), avec une puissance comprise entre 1 et 2 W. L'hypothèse de l'étude était que l'irradiation par des lasers NIR, capables de pénétrer jusqu'à 1 mm de profondeur dans les tissus dentinaires, pourrait atteindre les zones inaccessibles aux irrigants et aux instruments, offrant ainsi un avantage complémentaire dans la désinfection des canaux radiculaires [67].

SIROLaser Blue



Figure 4: SIROLaser Blue (Sirona Dental System GmbH, Bensheim, Germany); tiré de: image de Dentsply Sirona

Le SIROLaser Blue (Sirona Dental System GmbH, Bensheim, Germany) est un instrument qui est doté de la technologie laser à diode. Il dispose de 3 spectres de longueur d'ondes différentes : bleue, infrarouge et rouge.

Le laser à diode a plusieurs indications, notamment la réduction des germes en implantologie, endodontie et parodontologie. Ses autres indications cliniques incluent les utilisations chirurgicales, l'hémostase, ainsi que des effets de biostimulation, tels que la stimulation de la cicatrisation des lésions aphteuses ou le traitement de l'hypersensibilité dentaire. Plusieurs types de traitements sont déjà prédéfinis dans le programme du laser, mais il est possible de modifier les réglages et d'en créer de nouveaux en fonction de l'effet clinique recherché.

Selon l'application, des longueurs d'onde et des puissances différentes seront utilisées, ainsi que des modes de fonctionnement et des fréquences variables. Le protocole lors d'un traitement endodontique est très similaire au traitement

conventionnel, avec l'ajout du laser avant l'obturation canalaire :

1. Cavité d'accès
2. Digue
3. Mise en forme radiculaire à la longueur de travail à un diamètre 030
4. Rinçage
5. Séchage
6. Thérapie Laser
7. Obturation radiculaire et coronaire

Selon les recommandations du fabricant le laser doit être appliqué avec un déplacement de la fibre du bas (apex) vers le haut en formant des cercles concentriques sans oublier la chambre pulpaire, ceci permettra de toucher le plus de zones canalaire possible.

Discussion

Discussion de la méthode

Les dents sélectionnées pour cette étude étaient des dents humaines extraites, récoltées à la suite d'extractions pour des raisons de pronostic, prothétiques ou économiques. Trois critères étaient nécessaires pour l'inclusion dans l'étude. Le premier critère était que la dent devait être monoradiculée, le deuxième qu'elle ne devait pas avoir reçu de traitement endodontique préalable, et le troisième qu'elle devait avoir un apex fermé/intact, afin de permettre une mise en forme reproductible dans tous les échantillons. Le protocole de mise en forme canalaire et d'irrigation a été mis en place selon les critères standards de qualité d'un traitement endodontique, comme discuté dans l'introduction, afin d'obtenir une simulation proche des conditions cliniques.

Les dents ont ensuite été préparées avec le système ProTaper Gold (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Suisse) pour atteindre un diamètre apical 0,3mm, permettant l'utilisation du SIROLaser Blue. Comme recommandé par le fabricant du laser, une préparation d'un diamètre minimum de 030 à 045 est nécessaire pour permettre l'insertion de la fibre jusqu'à l'apex.

Par la suite, nous avons effectué un rinçage final avec du NaOCl à 3 % et de l'EDTA à 17 %. Comme discuté précédemment, la combinaison de ces solutions d'irrigation est considérée comme le *gold standard* dans le protocole de désinfection canalaire. [3, 68]. De ce fait, nous cherchons à reproduire des critères d'irrigation équivalents aux conditions cliniques.

Les dents ont ensuite été coupées à l'aide d'une fraise diamantée (NeoDiamond, Kennesaw, GA, USA) à une longueur de 12 mm, afin d'obtenir des échantillons de longueur homogène. Cela dans le but d'avoir des échantillons standardisés pouvant être sélectionnés de façon aléatoire ; toutes les racines ont été placées dans un seul bocal et choisies de façon aléatoire par groupe de 6.

Par la suite, les racines ont été introduites dans un tube en silicone (Semadeni, Ostermundigen, Switzerland) par groupe de 6. Cela étant, les racines ont été soumises à une activation sonique par ultrasons (Vevor, Digital Ultrasonic Cleaner, Nanjing, China), puis placées dans un autoclave (Tomy, SX-500E, Tokyo, Japan). L'objectif était de stériliser les échantillons avant de pouvoir les réinfecter avec la bactérie *E. faecalis*.

Cette bactérie a été choisie car elle est souvent retrouvée lors des échecs endodontiques [41, 42]. *E. faecalis* est une bactérie qui a la capacité de coloniser en profondeur les tubulis dentinaires et de former un biofilm sur les parois des canaux radiculaires, ceci sans le soutien synergique d'autres bactéries. Elle peut aussi survivre dans des environnements extrêmement difficiles, en conditions de famine. Cela la rend très résistante aux traitements antimicrobiens conventionnels (comme le CaOH_2), et donc très difficile à éradiquer [69, 70].

Le biofilm bactérien de *E. faecalis* a été cultivé et préparé pour être introduit par la suite à l'intérieur des racines. Pour cela, les racines ont été placées dans un tube en silicone (Semadeni, Ostermundigen, Switzerland) relié des deux côtés afin de créer un système fermé. D'un côté, une pompe péristaltique était connectée, et de l'autre, une fiole Erlenmeyer, comme illustré dans le schéma suivant. Le système complet a ensuite été placé dans un incubateur. Ce modèle de biofilm avait déjà été utilisé et

décrit dans un autre article par Provoost et al. [71]. Le biofilm en question a été cultivé pendant deux semaines.

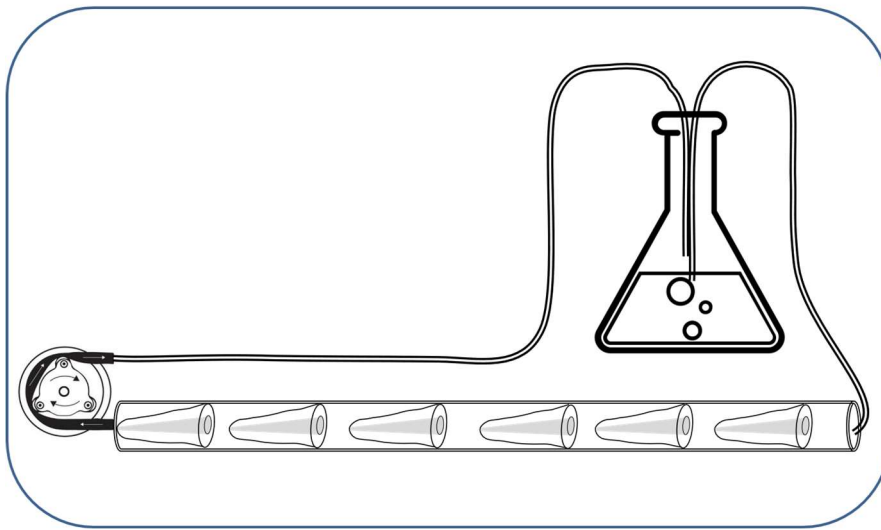


Figure 5: Modèle utilisé pour l'infection des racines avec le biofilm bactérien. Afin d'éliminer les bactéries mortes et les débris, la culture a été mise en circulation à l'aide d'une pompe péristaltique et changée à plusieurs reprises. Schéma tiré de l'article de Provoost et al. (2022).

Une fois cette étape terminée, le tube en silicone a été coupé pour séparer les 6 racines. Un segment de 5 mm de silicone en amont (côté coronaire) a été laissé afin de créer un réservoir pour les liquides, dans le but de mimer une couronne (avec 4 parois). Pour reproduire un système fermé, du silicone a été placé au niveau du foramen apical lors des expériences, afin de simuler la réalité clinique.

La sélection des dents pour les groupes a été effectuée de manière aléatoire, c'est-à-dire qu'elles ont été choisies de façon randomisée, étant donné que les dents ont été standardisées.

Dans le but de valider le protocole, le premier groupe a subi un simple rinçage avec du PBS, afin de vérifier que les racines étaient bien infectées par des bactéries. Une

fois cette confirmation obtenue, le deuxième groupe a été traité par un rinçage avec du NaOCl à 1 % pour évaluer la quantité de bactéries restantes. Pour les groupes restants, seul le laser a été utilisé avec différentes longueurs d'onde, dans le but de déterminer laquelle est la plus efficace pour éradiquer le plus de bactéries possibles, sans effets secondaires. Les expériences ont été répétées deux fois afin d'obtenir des résultats reproductibles.

Toutes les manipulations ont été effectuées par la même opératrice, qui avait suivi une formation sur l'utilisation du laser dispensée par le fabricant, afin d'obtenir des résultats reproductibles.

Une limitation à considérer pour cette fibre laser est son émission unidirectionnelle. C'est pourquoi elle doit être utilisée plusieurs fois dans le canal, avec un mouvement hélicoïdal, afin de couvrir l'intégralité du canal. Cependant, il existe toujours un risque de ne pas atteindre certaines zones [66].

Le choix du laser à diode a été fait car il est de petite taille, moins cher que les autres, et il montre des résultats prometteurs [58, 72].

Les paramètres utilisés étaient :

- Une longueur d'onde de 970 nm (proposé par le fabricant)
- Irradiation pendant 80 secondes
- 1.5 W en PF, 2 W en PF, 1.5 W en CW et 2 W en CW

L'utilisation des deux modalités (pulsée et continue) permet d'évaluer s'il existe une différence en termes de désinfection. La principale différence théorique est que la modalité pulsée permet des pauses lors de l'application du laser, offrant ainsi un meilleur contrôle de la température, car celle-ci diminue entre chaque cycle.

Afin d'évaluer la composition bactérienne résiduelle (mortes et vivantes), l'intérieur des canaux a été collecté à l'aide d'un instrument manuel (K file 30), mis en solution dans

du PBS puis marqué à l'aide des réactifs du BackLight . Les solutions ont été introduites dans le cytomètre (Accuri C6) et la viabilité bactérienne mesurée.

La prise de température a été réalisée dans le but de vérifier si l'utilisation de ces paramètres d'irradiation est cliniquement acceptable pour les tissus environnants. Étant donné que l'action du laser sur les bactéries se fait par l'augmentation de la température, il était important de mesurer la variation de celle-ci au niveau de la dentine externe de la racine.

Afin de reproduire une situation proche de la clinique, la température a été mesurée lorsque la racine était immergée dans un tube étroit en polyéthylène remplis d'eau, puis placé dans un bain-marie à 37 °C (Grant Instrument, Optima T100, Cambridge, Royaume-Uni), afin de se rapprocher de la situation clinique de la cavité buccale. Ce dispositif expérimental avait le but de maintenir l'hydratation de la racine pendant l'irradiation laser et à simuler au mieux la conductivité thermique in vivo. Les valeurs de conductivité thermique du système tube/eau (0,6 W/m K) étaient similaires à celles de l'os (0,58–1,2 W/m K). Un thermocouple (B+B, Thermo-Technik GmbH, Allemagne) a mesuré la température à la surface de la racine, jusqu'à la portion apicale, avec des relevés effectués toutes les 5 secondes, jusqu'à ce que la température revienne à 37 °C (Thermomètre 306, Voltcraft, Allemagne). La température a été mesurée en apical car c'est l'endroit où la couche de dentine est la plus fine et aussi car plusieurs études ont utilisé cette méthode [73-75].

Le modèle est illustré à l'image 7. Les données ont été analysées statistiquement à l'aide d'une ANOVA à un facteur et du test de comparaison multiple de Tukey ($p = 0,05$) dans IBM SPSS Statistics 27.0.1.0 (utilisateur académique autorisé, 5725-A54). Chaque expérience a été réalisée en triplicat et répétée quatre fois ($n = 12$).

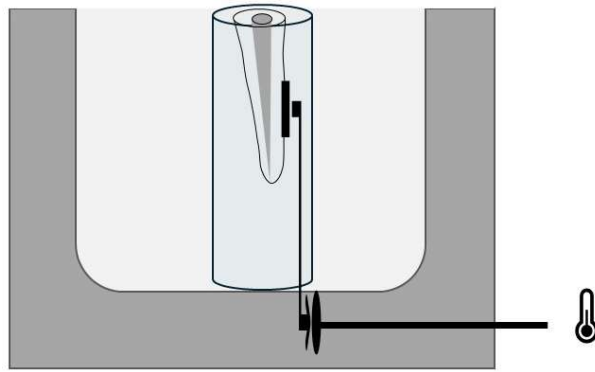


Figure 6 : Modèle pour la prise de température avec le thermocouple positionné au niveau du tiers apical. Ce thermocouple était relié à un thermomètre affichant directement la température à l'écran. Les relevés de température étaient effectués toutes les 5 secondes, jusqu'à ce qu'elle revienne à 37 °C.

Discussion des résultats

En ce qui concerne les résultats, le pourcentage de bactéries vivantes et mortes a été calculé dans chaque groupe et comparé. Dans un premier temps, un contrôle négatif (rinçage avec du PBS – sans laser) et un contrôle positif (rinçage avec du NaOCl 1 % – sans laser) ont été réalisés. Afin de vérifier que les racines étaient bien infectées par la bactérie *E. faecalis*, un rinçage avec du PBS (contrôle négatif) a été effectué, ce qui a révélé 77 % de bactéries vivantes. Ensuite, le nombre de bactéries encore vivantes après un rinçage à NaOCl 1 % a été déterminé, laissant 8 % de bactéries vivantes. Les groupes ayant reçu l'application du laser ont montré une diminution significative de la viabilité bactérienne après irradiation en mode continu, avec 21 % de bactéries vivantes à 1,5 W et 14 % à 2 W. En revanche, en mode pulsé, la réduction de la viabilité

était moins marquée, avec une survie moyenne de 53 % à 1,5 W et 29 % après une irradiation à 2 W (Figure 8).

On peut conclure que le groupe ayant le moins de bactéries vivantes était celui ayant reçu le rinçage avec NaOCl 1 % ; ce résultat est proche de celui obtenu avec le laser à 2 W en mode continu (CW). Le mode CW offre une réduction des germes supérieure à celle du mode pulsé (PF).

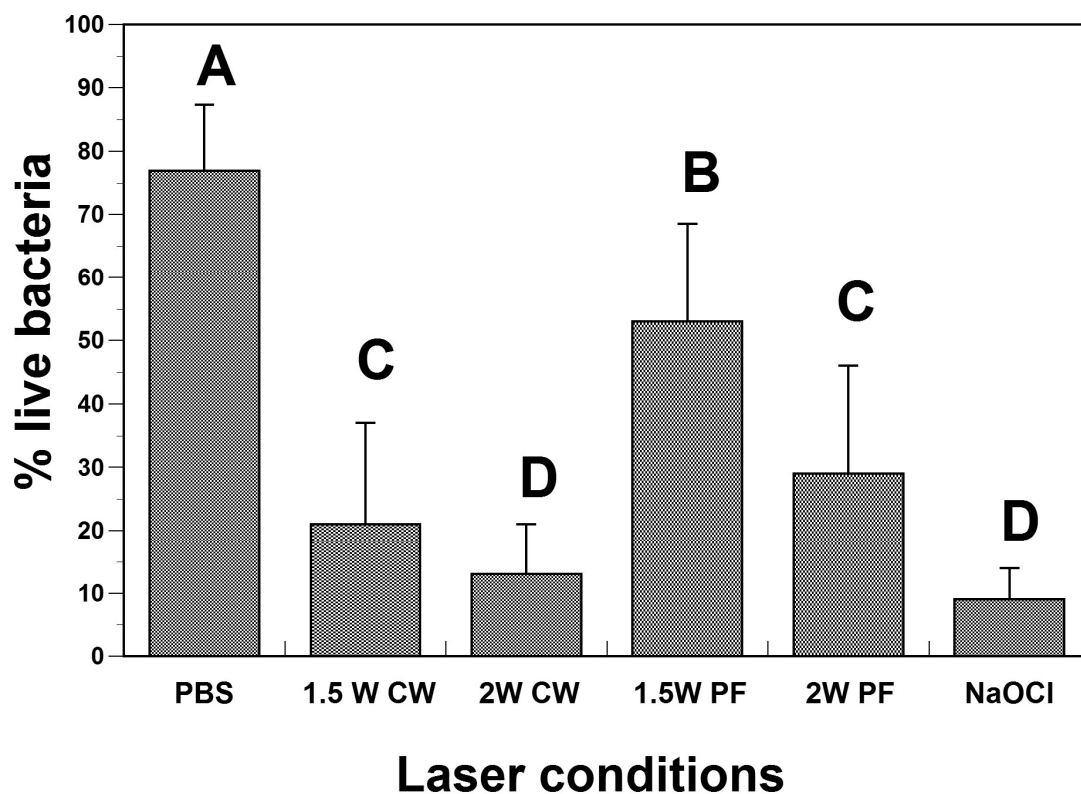


Figure 7 : Survie bactérienne après l'application du laser. Les lettres indiquent des différences statistiques significatives entre les groupes (ANOVA, test de Tukey, $\alpha = 0,05$). CW correspond au mode continu (Continuous Wave) et PF au mode pulsé (Pulse Frequency).

Il est également important de prendre en compte que les effets thermiques indésirables peuvent affecter la dent et les tissus environnants. Concernant la dent, il

est évident que des brûlures ont été observées lors de l'application du laser en mode continu à 2 W (CW) (Image 9).

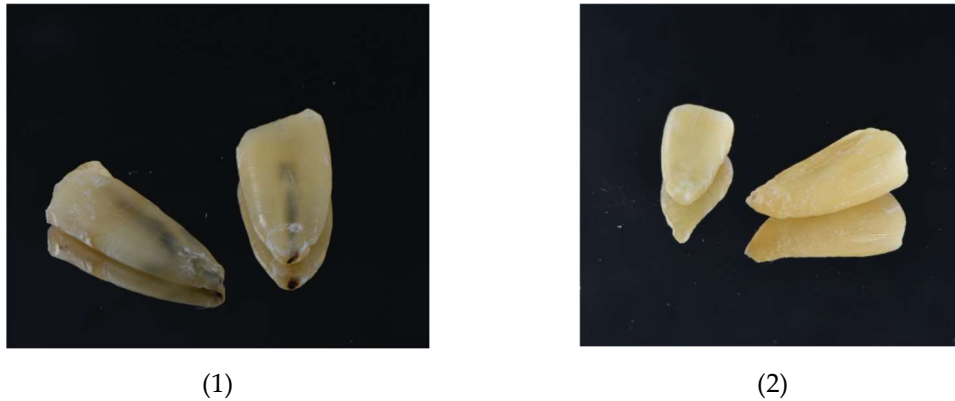


Figure 8: Une observation morphologique des échantillons exposés à 2 W en mode continu (1) ou pulsé (2) a révélé une légère carbonisation à l'intérieur des canaux radiculaires dans le groupe exposé au mode continu à 2 W (1).

L'élévation moyenne de la température à 1,5 W en mode continu était de 7,1 °C, tandis que l'augmentation de température à la portion apicale de la racine après une irradiation à 2 W était de 7,9 °C. En mode pulsé, l'augmentation moyenne de la température était de $4 \pm 1,6$ °C à 1,5 W PF et de $5,9 \pm 2,3$ °C à 2 W PF. Une observation morphologique des échantillons exposés à 2 W en mode continu a révélé la présence d'une légère carbonisation à l'intérieur du canal radiculaire, phénomène qui n'a pas été observé dans les autres groupes.

L'élévation moyenne de la température pendant l'irradiation laser est rapportée dans le tableau 2.

Frequency Mode	Power	ΔT °C
Pulse Frequency	1.5 W	4 ± 1.6
	2 W	5.96 ± 2.3

Continuous Wave	1.5 W	7.14 ± 2.8
	2 W	7.94 ± 3.1

Tableau 2 : Moyenne des températures lors de l'irradiation laser

L'utilisation du mode pulsé (PF) s'est avérée avantageuse par rapport au mode continu, car elle permet des périodes de repos, ce qui favorise un refroidissement et une diminution de la température, évitant ainsi des effets secondaires sur les tissus parodontaux et la dent.

Des études ont mis en évidence des effets indésirables liés aux variations de température sur les tissus environnants [65, 66, 76]. Ceci est un point important à noter, car il existe un risque de surchauffe pour la dent et les structures avoisinantes, ainsi qu'un risque d'altération des parois canalaire. Cela pourrait entraîner des fissures, susceptibles de provoquer des douleurs, des dommages à la couche cémentaire, ainsi que des résorptions et des nécroses osseuses [77].

La température limite critique pour le ligament parodontal est de 47°C [78], il est donc essentiel que la température n'augmente pas de plus de 10°C par rapport à la température corporelle de 37°C. Dans cette étude, aucun groupe laser n'a montré une augmentation supérieure à 10°C.

Il est important de souligner que dans un environnement ex vivo, les dents sont isolées du corps humain, ce qui entraîne l'absence des interactions systémiques. Des études ont montré que le flux sanguin peut jouer un rôle d'absorbeur de chaleur [79]. De plus, l'absence de rétroaction des nerfs neuro-sensoriels face aux variations de température peut limiter les risques de surchauffe in vivo.

Comparaison avec d'autres études

Il existe un manque de matériel et de méthodes dans la littérature, ainsi que de protocoles spécifiques concernant les lasers en général, et en particulier les lasers à diode. Les différentes études n'utilisent pas le même temps d'application du laser et aussi les mêmes paramètres.

Dans cette étude, il a été démontré une réduction significative d'*E. faecalis* à l'intérieur des canaux (14 % de bactéries vivantes) après irradiation à 2 W en mode continu, un résultat comparable à celui obtenu avec le groupe NaOCl ($p > 0,05$). En revanche, les autres groupes ont été moins efficaces ($p < 0,05$), malgré l'application du laser pendant 80 secondes, et ce indépendamment du mode d'émission choisi (CW vs. PW).

Néanmoins, la durée d'irradiation totale est plus longue que celle utilisée par Gutknecht et al., qui ont irradié des disques de dentine pendant 32 secondes avec une puissance de 2,8 W, et ont rapporté une diminution de 97 % du nombre de bactéries [80]. En 2019, Sarda et al. ont observé une réduction moyenne de 76 % du nombre d'*E. faecalis* après une irradiation de 4×5 secondes avec une puissance de sortie de 1,5 W [81].

Une étude réalisée par Borges et al. en 2017 [82] a montré que l'irradiation de disques de dentine avec un laser diode de 970 nm (0,5 W pendant 4 s) n'a réduit la viabilité bactérienne que de 68 %. Cela suggère que l'augmentation des doses d'irradiation laser de 970 nm, en prolongeant les périodes d'irradiation, n'améliore pas forcément l'efficacité de la désinfection des canaux radiculaires. Toutefois, la divergence entre nos résultats et ceux rapportés dans d'autres études pourrait s'expliquer par l'utilisation de biofilms matures, cultivés pendant 2 semaines à l'intérieur des canaux radiculaires, contrairement aux disques de dentine ou aux racines contaminées sur une période plus courte.

Conclusion

Compte tenu des limites de cette étude, il peut être conclu que l'irradiation au laser à diode de 970 nm, réglée à 2 W en mode continu (CW), a le potentiel de diminuer la viabilité des biofilms matures de *E. faecalis* dans les canaux radiculaires, de manière similaire à l'irrigation à l'hypochlorite de sodium, sans provoquer de hausse de température inacceptable à la surface externe de la racine. Cependant, une légère carbonisation a été observée à la suite de cette irradiation. En conséquence, pour une utilisation clinique, le réglage du laser le plus approprié est de 1,5 W en mode continu, car c'est celui qui n'a pas entraîné de carbonisation, représentant ainsi un bon compromis entre efficacité et sécurité.

Bibliographie

1. Schilder, H., *Cleaning and shaping the root canal*. Dent Clin North Am, 1974. **18**(2): p. 269-96.
2. Schilder, H., *Filling root canals in three dimensions*. 1967. J Endod, 2006. **32**(4): p. 281-90.
3. Zehnder, M., *Root canal irrigants*. J Endod, 2006. **32**(5): p. 389-98.
4. Haapasalo, M., et al., *Irrigation in endodontics*. Dent Clin North Am, 2010. **54**(2): p. 291-312.
5. Zehnder, M., et al., *Chelation in root canal therapy reconsidered*. J Endod, 2005. **31**(11): p. 817-20.
6. Mohammadi, Z., *Sodium hypochlorite in endodontics: an update review*. Int Dent J, 2008. **58**(6): p. 329-41.
7. McDonnell, G. and A.D. Russell, *Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance*. Clin Microbiol Rev, 1999. **12**(1): p. 147-79.
8. McKenna, S.M. and K.J. Davies, *The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes*. Biochem J, 1988. **254**(3): p. 685-92.
9. Hulsmann, M., M. Heckendorff, and A. Lennon, *Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use*. Int Endod J, 2003. **36**(12): p. 810-30.
10. Pashley, E.L., et al., *Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue*. J Endod, 1985. **11**(12): p. 525-8.
11. Zandi, H., et al., *Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial*. J Endod, 2019. **45**(9): p. 1089-1098 e5.
12. Wikstrom, A., et al., *Microbiological assessment of success and failure in pulp revitalization: a randomized clinical trial using calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate in traumatized immature necrotic teeth*. J Oral Microbiol, 2024. **16**(1): p. 2343518.
13. Rodrigues, R.C.V., et al., *Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis*. J Endod, 2017. **43**(7): p. 1058-1063.
14. Vianna, M.E., et al., *Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens*. Oral Microbiol Immunol, 2007. **22**(6): p. 411-8.
15. Berutti, E., R. Marini, and A. Angeretti, *Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules*. J Endod, 1997. **23**(12): p. 725-7.
16. Gulabivala K, P.B., Evans G, Ng *Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces*. Endodontic Topics, 2005. **Volume 10**,(1): p. 103-122.
17. Siqueira Junior, J.F., et al., *Unprepared root canal surface areas: causes, clinical implications, and therapeutic strategies*. Braz Oral Res, 2018. **32**(suppl 1): p. e65.
18. Peters, O.A., K. Schonenberger, and A. Laib, *Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography*. Int Endod J, 2001. **34**(3): p. 221-30.
19. Kouchi, Y., et al., *Location of Streptococcus mutans in the dentinal tubules of open infected root canals*. J Dent Res, 1980. **59**(12): p. 2038-46.

20. Huang, T.Y., K. Gulabivala, and Y.L. Ng, *A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation*. Int Endod J, 2008. **41**(1): p. 60-71.
21. Caron, G., et al., *Effectiveness of different final irrigant activation protocols on smear layer removal in curved canals*. J Endod, 2010. **36**(8): p. 1361-6.
22. Sirtes, G., et al., *The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy*. J Endod, 2005. **31**(9): p. 669-71.
23. Ahmad, M., T.J. Pitt Ford, and L.A. Crum, *Ultrasonic debridement of root canals: acoustic streaming and its possible role*. J Endod, 1987. **13**(10): p. 490-9.
24. Paragliola, R., et al., *Final rinse optimization: influence of different agitation protocols*. J Endod, 2010. **36**(2): p. 282-5.
25. Weller, R.N., J.M. Brady, and W.E. Bernier, *Efficacy of ultrasonic cleaning*. J Endod, 1980. **6**(9): p. 740-3.
26. Lee, S.J., M.K. Wu, and P.R. Wesselink, *The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls*. Int Endod J, 2004. **37**(10): p. 672-8.
27. Nusstein, J., *Ultrasonic dental device*. 2005: Washington, DC: U.S.
28. Gutarts, R., et al., *In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand-rotary instrumentation in human mandibular molars*. J Endod, 2005. **31**(3): p. 166-70.
29. Burleson, A., et al., *The in vivo evaluation of hand/rotary/ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars*. J Endod, 2007. **33**(7): p. 782-7.
30. Carver, K., et al., *In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotary instrumentation in human mandibular molars*. J Endod, 2007. **33**(9): p. 1038-43.
31. Sabins, R.A., J.D. Johnson, and J.W. Hellstein, *A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals*. J Endod, 2003. **29**(10): p. 674-8.
32. Gu, L.S., et al., *Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices*. J Endod, 2009. **35**(6): p. 791-804.
33. Kimura, Y., P. Wilder-Smith, and K. Matsumoto, *Lasers in endodontics: a review*. Int Endod J, 2000. **33**(3): p. 173-85.
34. Bystrom, A., R. Claesson, and G. Sundqvist, *The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals*. Endod Dent Traumatol, 1985. **1**(5): p. 170-5.
35. Mohammadi, Z. and P.M. Dummer, *Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology*. Int Endod J, 2011. **44**(8): p. 697-730.
36. Chong, B.S. and T.R. Pitt Ford, *The role of intracanal medication in root canal treatment*. Int Endod J, 1992. **25**(2): p. 97-106.
37. Manfredi, M., et al., *Single versus multiple visits for endodontic treatment of permanent teeth*. Cochrane Database Syst Rev, 2016. **12**(12): p. CD005296.
38. Sjogren, U., et al., *Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. Int Endod J, 1997. **30**(5): p. 297-306.
39. Soares, J.A., et al., *Elimination of intracanal infection in dogs' teeth with induced periapical lesions after rotary instrumentation: influence of different calcium hydroxide pastes*. J Appl Oral Sci, 2006. **14**(3): p. 172-7.

40. Hargreaves KM, B.L., *Cohen's Pathway of the pulp*. 11th Ed ed. 2016, St.Louis (Mo.): Mosby Elsevier
41. Prada, I., et al., *Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2019. **24**(3): p. e364-e372.
42. Stuart, C.H., et al., *Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment*. J Endod, 2006. **32**(2): p. 93-8.
43. Meire, G.O.a.M., *Photoactivated Disinfection*, in *Lasers in Endodontics: Scientific Background and Clinical Applications*, G.O.e. al., Editor. 2016, Springer: Switzerland. p. 145-155.
44. Fimple, J.L., et al., *Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro*. J Endod, 2008. **34**(6): p. 728-34.
45. Bonsor, S.J., et al., *Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an in vivo study)*. Br Dent J, 2006. **200**(6): p. 337-41, discussion 329.
46. Blanken, J., et al., *Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 1: a visualization study*. Lasers Surg Med, 2009. **41**(7): p. 514-9.
47. de Groot, S.D., et al., *Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualization*. Int Endod J, 2009. **42**(12): p. 1077-83.
48. De Moor, R.J., et al., *Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 2: evaluation of the efficacy*. Lasers Surg Med, 2009. **41**(7): p. 520-3.
49. Matsumoto, H., Y. Yoshimine, and A. Akamine, *Visualization of irrigant flow and cavitation induced by Er:YAG laser within a root canal model*. J Endod, 2011. **37**(6): p. 839-43.
50. DiVito, E., O.A. Peters, and G. Olivi, *Effectiveness of the erbium:YAG laser and new design radial and stripped tips in removing the smear layer after root canal instrumentation*. Lasers Med Sci, 2012. **27**(2): p. 273-80.
51. Peters, O.A., et al., *Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming*. J Endod, 2011. **37**(7): p. 1008-12.
52. Do, Q.L. and A. Gaudin, *The Efficiency of the Er: YAG Laser and PhotonInduced Photoacoustic Streaming (PIPS) as an Activation Method in Endodontic Irrigation: A Literature Review*. J Lasers Med Sci, 2020. **11**(3): p. 316-334.
53. George, R. and L.J. Walsh, *Apical extrusion of root canal irrigants when using Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers with optical fibers: an in vitro dye study*. J Endod, 2008. **34**(6): p. 706-8.
54. Helvacioğlu Kivanc, B., et al., *Apical extrusion of sodium hypochlorite activated with two laser systems and ultrasonics: a spectrophotometric analysis*. BMC Oral Health, 2015. **15**: p. 71.
55. Olivi G, D.E., *Advanced laser-activated irrigation: PIPSTM technique and clinical protocols*, in *Lasers in endodontics. Scientific Background and Applications*, D.M.R. Olivi G, DiVito E, Editor. 2016, Springer. p. pp 219–292.
56. Olivi, G., *Laser use in endodontics: evolution from direct laser irradiation to laser-activated irrigation*. J Laser Dent, 2013. **21** (2): p. 58-71.
57. Schoop, U., et al., *Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin*. Lasers Surg Med, 2004. **35**(2): p. 111-6.

58. Beer, F., et al., *Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals--an in vitro study*. Lasers Med Sci, 2012. **27**(2): p. 361-4.
59. Schoop, U.K., W; S. Dervisbegovic, S. et al, *Innovative wavelengths in endodontic treatment*. Lasers in Surgery and Medicine, 2006. **38**(6): p. 624–630.
60. Beltes, C., et al., *Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green and Near-Infrared Diode Laser Against Enterococcus faecalis in Infected Human Root Canals*. Photomed Laser Surg, 2017. **35**(5): p. 264-269.
61. Pirnat, S., M. Lukac, and A. Ihan, *Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria*. Lasers Med Sci, 2011. **26**(6): p. 755-61.
62. Beltes, C., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy using Indocyanine green and near-infrared diode laser in reducing Enterococcus faecalis*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2017. **17**: p. 5-8.
63. Katalinic, I., et al., *The photo-activated and photo-thermal effect of the 445/970 nm diode laser on the mixed biofilm inside root canals of human teeth in vitro: A pilot study*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2019. **26**: p. 277-283.
64. Benedicenti, S., et al., *Decontamination of root canals with the gallium-aluminum-arsenide laser: an in vitro study*. Photomed Laser Surg, 2008. **26**(4): p. 367-70.
65. Lan, W.H., *Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal*. J Endod, 1999. **25**(3): p. 155-6.
66. Stabholz, A., S. Sahar-Helft, and J. Moshonov, *Lasers in endodontics*. Dent Clin North Am, 2004. **48**(4): p. 809-32, vi.
67. Klinke, T., W. Klimm, and N. Gutknecht, *Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin*. J Clin Laser Med Surg, 1997. **15**(1): p. 29-31.
68. Haapasalo, M., et al., *Irrigation in endodontics*. Br Dent J, 2014. **216**(6): p. 299-303.
69. Alghamdi, F. and M. Shakir, *The Influence of Enterococcus faecalis as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review*. Cureus, 2020. **12**(3): p. e7257.
70. Estrela, C., et al., *Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against Enterococcus faecalis--a systematic review*. J Appl Oral Sci, 2008. **16**(6): p. 364-8.
71. Provoost, C., et al., *Influence of Needle Design and Irrigant Flow Rate on the Removal of Enterococcus faecalis Biofilms In Vitro*. Dent J (Basel), 2022. **10**(4).
72. Schoop, U., et al., *Innovative wavelengths in endodontic treatment*. Lasers Surg Med, 2006. **38**(6): p. 624-30.
73. Alfredo, E., et al., *Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal*. J Dent, 2008. **36**(7): p. 529-34.
74. da Costa Ribeiro, A., et al., *Effects of Diode Laser (810 nm) Irradiation on Root Canal Walls: Thermographic and Morphological Studies*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(3): p. 252-255.
75. Gutknecht, N., et al., *Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment*. Lasers Med Sci, 2005. **20**(2): p. 99-103.
76. da Costa Ribeiro, A., et al., *Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies*. J Endod, 2007. **33**(3): p. 252-5.
77. Saunders, E.M., *In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. 1. Temperature levels at the external surface of the root*. Int Endod J, 1990. **23**(5): p. 263-7.

78. Eriksson, A.R. and T. Albrektsson, *Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: a vital-microscopic study in the rabbit*. J Prosthet Dent, 1983. **50**(1): p. 101-7.
79. Saunders, E.M., *In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. 2. Histological response to temperature elevation on the external surface of the root*. Int Endod J, 1990. **23**(5): p. 268-74.
80. Gutknecht, N., et al., *Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth*. J Clin Laser Med Surg, 2004. **22**(1): p. 9-13.
81. Sarda, R.A., et al., *Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, diode laser, and sodium hypochlorite and their combinations on endodontic pathogens*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 2019. **28**: p. 265-272.
82. Borges, C.C., et al., *Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with Enterococcus faecalis*. J Photochem Photobiol B, 2017. **176**: p. 1-8.



Article

Photothermal Effect of 970 nm Diode Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* Biofilms in Single-Rooted Teeth Ex Vivo

Soraya Tanner*, Anna Thibault, Julian Grégoire Leprince and Serge Bouillaguet

Division of Cariology and Endodontology, CUMD—University Clinics of Dental Medicine, University of Geneva, 1205 Geneva, Switzerland; anna.thibault@unige.ch (A.T.); julian.leprince@unige.ch (J.G.L.); serge.bouillaguet@unige.ch (S.B.)

* Correspondence: soraya.tanner@unige.ch

Abstract: Objective: The aim of this study was to evaluate the photothermal effect of a 970 nm diode laser on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Methods:** 72 extracted human single-rooted teeth were prepared, sterilized, and inoculated with *Enterococcus faecalis* to establish a two-week-old biofilm. The specimens were divided into six groups (n = 12): Group 1 (G1)—negative control (PBS—no laser), Group 2 (G2)—positive control (1% NaOCl rinse—no laser), Group 3 (G3)—a 970 nm laser in 1.5 W pulse mode, Group 4 (G4)—a 970 nm laser in 2 W pulse mode, Group 5 (G5)—a 970 nm laser in 1.5 W continuous mode, Group 6 (G6)—a 970 nm laser in 2 W continuous mode. Bacterial viability was evaluated using the LIVE/DEAD BacLight kit and analyzed by flow cytometry (FCM). Temperature changes on the root surface during irradiation were analyzed using a K-type thermocouple. Data were statistically analyzed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$). **Results:** Bacterial viability was significantly reduced after laser irradiation in continuous mode using 1.5 W (21% of live bacteria) and 2 W (14% of live bacteria). When the pulsed mode was applied, the reduction in bacterial viability was less, with a mean survival of 53% (1.5 PF, whereas 29% of bacteria survived after 2 W irradiation). **Conclusions:** The 970 nm diode laser at 2 W continuous mode effectively reduced the viability of *E. faecalis* biofilms in root canals without causing unacceptable temperature rises at the root surface.

Keywords: *Enterococcus faecalis*; endodontic disinfection; 970 nm diode laser; root canal therapy



Citation: Tanner, S.; Thibault, A.; Leprince, J.G.; Bouillaguet, S. Photothermal Effect of 970 nm Diode Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* Biofilms in Single-Rooted Teeth Ex Vivo. *Dent. J.* **2024**, *12*, 308. <https://doi.org/10.3390/dj12100308>

Academic Editor: Jorge N. R. Martins

Received: 18 July 2024

Revised: 4 September 2024

Accepted: 25 September 2024

Published: 27 September 2024



Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The treatment of necrotic teeth requires the elimination of microorganisms that form a bacterial biofilm adherent to the root canal walls, then the root canal space is filled to avoid subsequent reinfection [1,2]. The treatment involves three critical steps known as shaping, disinfection, and filling. Mechanical shaping using endodontic files enables the elimination of infected tissues from the main canal(s), the debriement of biofilm from the root canal walls and the enlargement of the root canal to facilitate the penetration of irrigating solutions to the apical portion of the root canal space [3]. The chemical effect of the mainly used solutions, i.e., sodium hypochlorite (NaOCl) and ethylenediamine tetra acetic (EDTA), complements the mechanical action of shaping instruments during disinfection [4].

NaOCl is a strong antimicrobial agent which—among other actions—also has the advantage over other irrigants of dissolving organic tissues, whereas EDTA acts as a chelating agent for calcium ions, dissolving inorganic debris and eliminating the smear layer formed during the shaping of the root canal [5,6]. However, even though these two irrigant agents are the two most recommended, it is known that hypochlorite accidents can occur during endodontic treatment, resulting in the extrusion of NaOCl beyond the apex. This can lead to significant tissue damage, as contact between hypochlorite and vital tissues may cause ulceration, hemolysis, and, in some cases, scarring or nerve injury [7]. This may lead to looking for alternative strategies to eradicate bacteria.

While it is not straightforward to determine the bacterial load threshold under which a favorable treatment outcome can be expected [8–10], it has been clearly demonstrated that it should be reduced as much as possible to increase the probability of treatment success [8,9]. Both the instrumentation and disinfection of the root canal contribute to a decrease in bacterial load within the canal [11], but it is extremely challenging, if at all possible, to remove all bacteria and their derivatives from a contaminated root canal system [12]. A substantial percentage of the root canal walls remains unaffected by rotary instruments, thereby leaving a substantial amount of potentially infected dentin [13]. These untouched dentin areas may harbor bacteria that diffuse into dentin tubules, deep within the dentin, up to 1150 μm [14]. The complex structure of root canal systems, which often include fins, deltas, isthmus, and lateral canals, adds complications to the process of achieving a complete disinfection. Bacteria in these areas remain protected from the direct action of disinfectants, and irrigating solutions have limited penetration into dentin [15,16]. Also, there is evidence showing that several pathogens, such as *E. faecalis*, are harder to eliminate from infected root canals [17]. This bacterium can survive extremely harsh environments, even under starvation conditions. Its ability to form strong biofilm on root canal walls and to deeply colonize dentin tubules, without requiring synergistic support from other bacteria, makes it highly resistant to conventional antimicrobial treatments such as CaOH_2 and a particularly challenging pathogen to eradicate [18–20].

For this reason, various alternative strategies including laser irradiation have been proposed to optimize endodontic disinfection [21].

Lasers can be used to directly irradiate root canals or to activate photoactive substances (PAD—photoactivated disinfection) and irrigating solutions (LAI—Laser-Activated Irrigation, PIPS-SWEEPS—Photon-Induced Photoacoustic Streaming; Shock Wave-enhanced emission photoacoustic streaming) [22].

PAD targets photoactive molecules (photosensitizers) that produce reactive oxygen species with antibacterial action upon light irradiation (photochemical effect). The combination of red lasers (630–700 nm), and methylene blue has shown promise against cariogenic, endodontic, and periodontal bacteria [23–26]. LAI and PIPS-SWEEPS target the water content of irrigating solutions where cavitation bubbles are produced upon irradiation, and PIPS/SWEEPS combine the laser-induced cavitation with shock-wave enhancement [27–29]. Laser-induced photoacoustic waves produced by Er:YAG lasers (2940 nm) were shown to promote fluid streaming inside root canals [27,28,30] and to remove bacterial biofilms [31]. However, there are concerns about the risks of irrigant extrusion when using LAI and PIPS-SWEEPS, mostly because NaOCl extruded past the root apex may induce tissue necrosis [32–34]. Also, the cost of these instruments remains elevated.

More recently, near-infrared diode lasers (810–980 nm), have been suggested as an alternative for endodontic disinfection among other laser types. These wavelengths, which are strongly absorbed by water and dental hard tissues, have the potential to reach deeper layers of dentin where the heat generated (photothermal effect) can contribute to the elimination of microorganisms. These lasers can be coupled to thin (200 μm in diameter) conducting fibers, which are directly applied inside the root canal. Previous reports have shown promising antibacterial activity against several endodontic bacteria [35–37], whereas other studies report no noticeable effect on the bacterial viability [38–42]. Further, the risk of thermal injury to periodontal tissues after long and continuous exposure to NIR laser irradiation has been advocated [43,44]. Borges et al. found that a 970 nm diode laser in continuous mode only reduced the viability of *E. faecalis* biofilms grown on dentin blocks by 68% [45]. Schoop et al. found that, above a power of 1.5 W, the increase in bactericidal effect was also accompanied by changes in the surface of slices of root dentin after irradiation [37]. Alfredo et al. 2008 reported a 12 °C temperature rise when root canals were irradiated with 5.0 W [46], underlining the need to carefully control the laser parameters to balance the antimicrobial activity with the risks of adverse effects to surrounding tissues [47,48]. It is therefore hypothesized that pulsed waves (PW) of a near-infrared 970 nm laser wavelength,

which can be used to modulate the total energy applied, may be more appropriate for the elimination of bacteria with limited risks of adverse thermal effects.

The purpose of this study was, therefore, to assess the antibacterial effect of a 970 nm diode laser against *Enterococcus faecalis* biofilms using continuous-wave (CW) and pulsed-wave (PW) modes, with a power output ranging from 1 to 2 W, while monitoring temperature changes inside root canals during laser irradiation. The hypothesis tested in the current study was that the irradiation of NIR lasers, which can penetrate 1 mm deep inside dentin tissues, might reach the areas untouched by irrigants and instruments, thereby providing a complementary advantage in terms of root canal disinfection [49].

2. Materials and Methods

In this current study, a biofilm model that was previously described by Provoost et al. 2022 was employed [50].

2.1. Teeth Selection

Seventy-two single-rooted human teeth were collected after extraction at the University clinics of dental medicine, University of Geneva, Switzerland. In accordance with the Swiss Federal Act on Research involving Human Beings, ethical approval is not necessary, since the use of anonymized extracted teeth for research purposes falls outside the scope of the legislation (<https://www.fedlex.admin.ch/eli/cc/2013/617/en> accessed on 1 September 2023).

2.2. Specimen Preparation

Teeth were cleaned from external tissue remains and access cavities were opened. To measure the root canal length, a #10 K-File was inserted into the canal until the end of the file emerged through the major apical foramen, as observed under a stereomicroscope (Leica MZ6 Leica, Heidelberg, Germany). The working length was set 1 mm shorter and teeth were mechanically enlarged to an apical diameter ISO 030 using ProTaper Gold rotatory files (Dentsply Sirona Endodontics, Ballaigues, Switzerland). A 3% NaOCl solution was used during shaping and the final irrigation was performed using 17% EDTA, which was finally neutralized with normal saline. Each crown was cut using a water-cooled diamond fissure bur (NeoDiamond, Kennesaw, GA, USA) to obtain a 12-mm-long root segment. Root segments were sonicated 2 × 15 min (Vevor, Digital Ultrasonic Cleaner, Nanjing, China) in distilled sterile water, then placed in a thick-walled transparent silicone tube (Semadeni, Ostermundigen, Switzerland) into which distilled water was added, and then sterilized by autoclaving at 121 °C for 40 min (Tomy, SX-500E, Tokyo, Japan).

2.3. Bacteria

A 50 µL suspension of *E. faecalis* (HUG 135737) from frozen stocks was cultured in 5 mL of BHI broth (BHI, Becton Dickinson, Allschwil, Switzerland) and incubated at 37 °C for 4 h. The bacterial concentration was adjusted to an $OD_{600nm} = 0.2$ ($\sim 3.0 \times 10^7$ bacteria/mL, Biowave II, Biochrom WPA, Cambridge, UK, CG) [50] and the solution injected into the silicone tubing containing 6 roots.

The tube was connected to an airtight Erlenmeyer flask on one side and to a peristaltic pump on the other, thus producing a closed circuit (Figure 1). The silicone tube was installed in an incubator (HeraCell 150, Thermo Fisher Scientific, Inc., Reinach, Switzerland) at 37 °C.

With a flow rate of at least 100 µL/min, the bacterial culture was circulated twice a day for 48 h, after which it was replaced with fresh BHI and recirculated twice a day for one week. Over the next week period, phosphate-buffered saline (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Reinach, Switzerland) was introduced in the circuit and circulated twice a day, for 2 min. Finally, fresh PBS was used to eliminate dead bacteria and debris and the peristaltic pump disconnected. The 6 roots were separated by cutting the silicone tube 5 mm above the coronal access of every root.

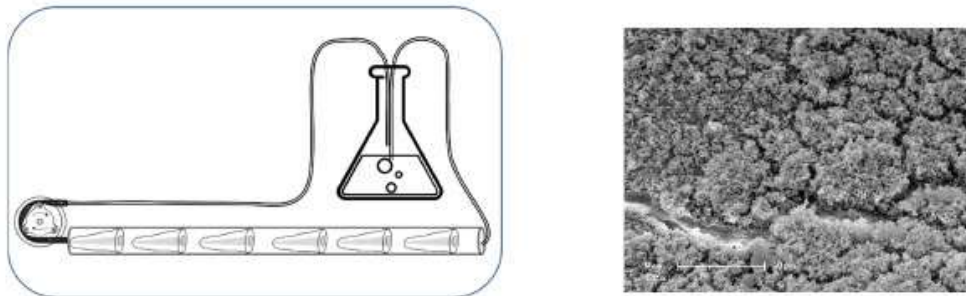


Figure 1. Bacterial biofilms were grown for 2 weeks. In order to eliminate dead bacteria and debris, the bacterial culture was passed through a peristaltic pump and refreshed at regular intervals. Scanning electron microphotography of the bacterial biofilm grown on dentin root canals (mag. $\times 1200$).

The apex of each root was wiped with sterile gauze impregnated with sodium hypochlorite and sealed with a light-body silicon material, to avoid bacterial loss during and after laser treatment.

2.4. Groups

Teeth were randomly selected from a jar containing all specimens. This approach was considered appropriate, since standardized, single-rooted teeth were used. The specimens were divided into six groups, two control and four experimental ones, the latter exposed to laser irradiation with various parameters (see below). The control groups consisted of either a mere PBS rinse, or an irrigation with 3 mL of 1% NaOCl, without laser use. For experimental groups, a 970 nm wavelength of the SIROLaser Blue coupled to the 200 μm EasyTip Endo (both from Sirona Dental System GmbH, Bensheim, Germany) was used to irradiate root canals. Each root canal was treated for 80 s. The EasyTip Endo fiber was inserted to the working length and then retracted in the coronal direction with a helical movement, to increase the area exposed. The laser settings used were as follows: 1.5 W in pulsed-wave mode, 1.5 W in continuous-wave mode, and 2 W in the pulsed- and continuous-wave modes. All experiments were repeated twice by the same operator, who had undergone laser training from the manufacturer. After irradiation, root canal content was collected using a manual #30 K-File (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) that was employed to scrub the dentin wall for 30 s. A total of 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) solution at pH 7.4 was used to irrigate the root canals, and the solution was then collected into a sterile tube along with the K-File. The tube was sonicated for 20 s (Vortex-Genie 2, Scientific Industry, Bohemia, NY, USA) to detach bacterial aggregates from the K-File and to make single-cell suspensions [51].

Bacterial viability was assessed using the LIVE/DEAD BacLight Kit (Life Technologies Europe BV, Zug, Switzerland), which employs two fluorescent dyes—SYTO-9 (green) and propidium iodide (red)—to evaluate cell membrane integrity. Flow cytometry was conducted using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Accuri Cytometers, Ann Arbor, MI, USA) equipped with a 488 nm laser for the excitation of both dyes. SYTO-9 fluorescence was detected in the FL1 channel (BP 533/30), while propidium iodide fluorescence was captured in the FL3 channel (LP > 670) [52]. Data analysis was performed using FlowJo software (FlowJo for Windows, version 10.0.06, 2014, Tree Star Inc., Ashland, OR, USA), and results were reported as the percentage of viable cells relative to the total number of cells in the suspension.

2.5. Temperature

For temperature measurements, root canals were immersed in a narrow polyethylene tube filled with water, which was introduced in a water bath with a constant temperature

of 37 °C (Grant Instrument, Optima T100, Cambridge, UK). This experimental setup was designed to keep the root hydrated during laser irradiation and to simulate in vivo thermal conductivity as effectively as possible. The thermal conductivity values of the tube/water system (0.6 W/m K) approached that of bone (0.58–1.2 W/m K). A thermocouple (B+B, Thermo-Technik GmbH, Germany) was used to measure the temperature on the root surface to the apical portion of the root; it was recorded every 5 s, until returning to 37 °C (Thermometer 306, Voltcraft, Germany). The setup is illustrated in Figure 2.

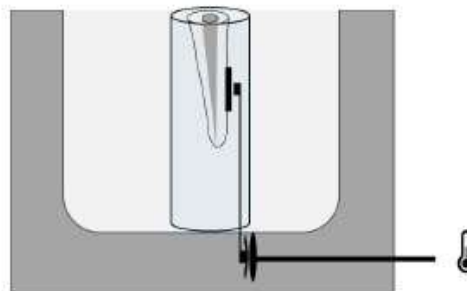


Figure 2. Illustration of the experimental configuration for heat control in the root canal, showing thermocouple placement in the apical third. The thermocouple was connected to a thermometer that displayed the temperature directly on the screen. The temperature was recorded every 5 s, until returning to 37 °C.

Data were statistically evaluated using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test ($p = 0.05$) in IBM SPSS Statistics 27.0.1.0 (Academic authorized user, 5725-A54). Each experiment was performed in triplicate and repeated four times ($n = 12$).

3. Results

After two weeks in the culture, the PBS control group showed an average of 77% viable bacteria. (Figure 3). For specimens exposed to sodium hypochlorite irrigation, the bacterial viability was significantly reduced, with only 8% of bacteria surviving after treatment. A marked decrease in bacterial viability was noted after laser irradiation in continuous mode at 1.5 W (21% of live bacteria) and 2 W (14% of live bacteria) (Figure 3). When the pulsed mode was applied, the reduction in bacterial viability was less, with a mean survival of 53% (1.5 PF, whereas 29% of bacteria survived after 2 W irradiation (Figure 3).

Mean temperature rise during laser irradiation is reported in Table 1. The mean temperature rise at 1.5 W in continuous mode was 7.1 °C, whereas the temperature increase at the apex of the root following 2 W irradiation was 7.9 °C. For the pulsed emission mode, the mean temperature increase was 4 ± 1.6 °C with the 1.5 W PF, and 5.9 ± 2.3 °C with 2 W PF. A morphological observation of specimens exposed to 2 W in continuous mode revealed the presence of a slight carbonization inside the root canal, but this pattern was not observed in the other groups (Figure 4).

Table 1. Mean temperature rise after laser application. Letters represent statistical differences between groups (ANOVA, Tukey, $p = 0.05$).

Emission Mode	Power	ΔT °C	$p < 0.05$
Continuous mode	1.5 W	7.1 ± 2.8	A,a
	2 W	7.9 ± 3.1	A
Pulsed mode	1.5 W	4 ± 1.6	B,b
	2 W	5.9 ± 2.3	B

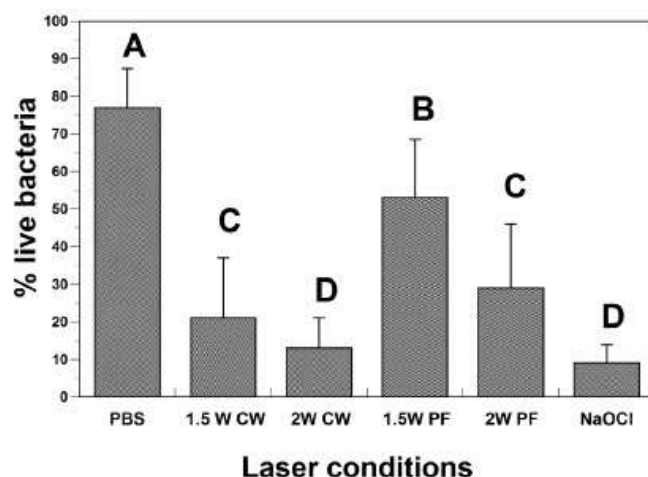


Figure 3. Bacterial survival after laser application. Letters represent statistical differences between groups (ANOVA, Tukey, $p = 0.05$). CW indicates continuous wave and PF indicates the pulse frequency in pulse mode.



Figure 4. A morphological observation of specimens exposed to 2 W in continuous (a) or pulsed mode (b). A slight carbonization was observed inside the root canals exposed to 2 W continuous mode (a).

4. Discussion

The present study's results show that intracanal irradiation at 2 W in continuous mode effectively reduced the *E. faecalis* content inside root canals (86% reduction in viability) in a comparable manner to the NaOCl control group ($p > 0.05$), while the other laser conditions were considerably less effective ($p < 0.05$), independent of the emission mode selected (CW vs. PF) and despite the 80 s of irradiation applied. However, the cumulated irradiation time is much longer than that used by Gutknecht et al. who irradiated dentin disks for 32 s with an output power of 2.8 W and reported a 97% reduction in bacterial counts [53]. An average percentage decrease of 76% in *E. faecalis* count post-irradiation 4×5 s using an output power of 1.5 W was observed by Sarda et al. 2019 [54]. Another study by Borges et al. 2017 [45], indicated that irradiating dentin disks with a 970 nm diode (0.5 W for 4 s) only reduced bacterial viability by 68%. It is therefore suggested that increasing doses of 970 nm laser irradiation by multiplying irradiation periods does not necessarily improve root canal disinfection. However, the difference between our results and those previously reported

by others may be related to the use of mature biofilms cultivated for 2 weeks inside root canals rather than dentin disks or roots contaminated within a shorter timeframe.

The present study used a biofilm model previously developed for evaluating procedures applied during endodontic irrigation by Provoost et al. 2022 [50]. This model relies on the use of mature biofilms of *E. faecalis* grown on root canal dentin, because *Enterococcus faecalis* are known to invade dentinal tubules [55] and mature biofilms were shown to be more resistant to antibacterial treatments [56]. In mature biofilms, nutrient-deprived cells maintain their viability while becoming more resistant to UV irradiation, heat, and treatment with sodium hypochlorite and other disinfecting solutions [57].

Fortunately, *E. faecalis* remains susceptible to heat, and exposure to temperatures of 60 °C and higher can irreversibly denature proteins and cellular structures, with both parameters being critical for its survival and replication [58]. However, the persistence of viable bacteria after laser application underscores the necessity for developing alternative or supplementary disinfection methods. Whereas the activation of sodium hypochlorite solutions with lasers [59,60] has shown promising results, the use of alternative irrigating solutions such as 2'-fucosyllactose and lacto-N-neotetraose remains to be confirmed [61].

Particular care was given to the sampling method, which relied on two separate steps to collect bacteria that may have survived after treatment. The first step involved a 30 K-File which was rotated in a reaming motion to scrub the canal walls and to retrieve bacteria potentially embedded in dentine, including at the apical level. In a second step, a sterile paper point was inserted at working length to pump out remaining fluids, then transferred into a sterile tube along with the K-File to generate a suspension used for assessing bacterial viability.

In the present study, temperature changes during lasing were measured close to the apex of the root, because dentin thickness is substantially lower at this level of the root and because this location has been previously used by others [46,62,63]. Previous research indicates that the critical temperature for bone and periodontal ligament damage is 10 °C above body temperature [64]. Our results show that this critical threshold was never reached, independent of the irradiation conditions. This agrees with Zou et al. 2020, who observed a temperature rise of 7.8 °C when an output power of 2.5 W was used [65]. Alfredo et al. 2008 showed much higher temperature rises (11 °C), but in specimens irradiated with an output power of 3 W in the continuous mode [46]. However, signs of carbonization were observed inside the root canals exposed to the 2 W continuous mode, thereby indicating that local excessive temperature rises may have occurred. Excessive temperature elevation after laser application have been shown to contribute to crack formation in root canal dentin [66], which may in turn lead to pain, damage to the cement layer and periodontal ligament, root resorption, and alveolar bone necrosis [67]. Although the purpose of the study was not to analyze carbonization in detail, but rather to identify its occurrence from a macroscopic perspective, it must be noted that structural alterations in dentine after irradiation were identified by others through scanning electron microscope analysis [46,68].

However, it must be noted that in an ex vivo setting, the teeth are disconnected from the human body, resulting in the loss of all systemic interactions. There is evidence showing that blood flow may serve as a heat absorber [69]. Also, there is no feedback from neuro-sensory nerves regarding temperature changes, which may prevent the risks of over-heating in vivo.

The clinical implications of this study suggest the need for careful laser application, and the necessity for further studies to establish a clear protocol.

5. Conclusions

Within the limitations of this study, it can be concluded that 970 nm diode laser irradiation at a setting of 2 W CW has the potential to decrease the viability of mature *E. faecalis* biofilms within root canals, similar to sodium hypochlorite irrigation, without causing unacceptable temperature rises at the outer root surface. However, slight carbonization was observed at this setting. Therefore, the laser setting most suitable for clinical use is

1.5 W CW, since it did not result in any carbonization and therefore represents a good compromise between efficiency and safety.

Author Contributions: Conceptualization S.B.; methodology S.B., S.T. and A.T.; investigation S.T.; data curation A.T.; writing—original draft preparation S.T.; writing—review and editing S.B. and J.G.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: In accordance with the local regulations, this study did not require ethical approval for the use of anonymous extracted teeth.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

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

References

1. Kakehashi, S.; Stanley, H.R.; Fitzgerald, R.J. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol.* **1965**, *20*, 340–349. [\[CrossRef\]](#)
2. Sundqvist, G. Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulp. Ph.D. Thesis, University of Umea, Umea, Sweden, 1976.
3. Schilder, H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent. Clin. N. Am.* **1974**, *18*, 269–296. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Siqueira, J.F., Jr.; Rocas, I.N.; Santos, S.R.; Lima, K.C.; Magalhaes, F.A.; de Uzeda, M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J. Endod.* **2002**, *28*, 181–184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 299–303. [\[CrossRef\]](#)
6. Zehnder, M. Root canal irrigants. *J. Endod.* **2006**, *32*, 389–398. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Pashley, E.L.; Birdsong, N.L.; Bowman, K.; Pashley, D.H. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J. Endod.* **1985**, *11*, 525–528. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Wikstrom, A.; Romani Vestman, N.; Rakhimova, O.; Lazaro Gimeno, D.; Tsilingaridis, G.; Brundin, M. Microbiological assessment of success and failure in pulp revitalization: A randomized clinical trial using calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate in traumatized immature necrotic teeth. *J. Oral. Microbiol.* **2024**, *16*, 2343518. [\[CrossRef\]](#)
9. Zandi, H.; Petronijevic, N.; Mdala, I.; Kristoffersen, A.K.; Enersen, M.; Rocas, I.N.; Siqueira, J.F., Jr.; Orstavik, D. Outcome of Endodontic Retreatment Using 2 Root Canal Irrigants and Influence of Infection on Healing as Determined by a Molecular Method: A Randomized Clinical Trial. *J. Endod.* **2019**, *45*, 1089–1098.e5. [\[CrossRef\]](#)
10. Peters, L.B.; Wesselink, P.R. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. *Int. Endod. J.* **2002**, *35*, 660–667. [\[CrossRef\]](#)
11. Rodrigues, R.C.V.; Zandi, H.; Kristoffersen, A.K.; Enersen, M.; Mdala, I.; Orstavik, D.; Rocas, I.N.; Siqueira, J.F., Jr. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J. Endod.* **2017**, *43*, 1058–1063. [\[CrossRef\]](#)
12. Vianna, M.E.; Horz, H.P.; Conrad, G.; Zaia, A.A.; Souza-Filho, F.J.; Gomes, B.P. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral. Microbiol. Immunol.* **2007**, *22*, 411–418. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Peters, O.A.; Schonenberger, K.; Laib, A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int. Endod. J.* **2001**, *34*, 221–230. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kouchi, Y.; Ninomiya, J.; Yasuda, H.; Fukui, K.; Moriyama, T.; Okamoto, H. Location of *Streptococcus mutans* in the dentinal tubules of open infected root canals. *J. Dent. Res.* **1980**, *59*, 2038–2046. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Berutti, E.; Marini, R.; Angeretti, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J. Endod.* **1997**, *23*, 725–727. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gulabivala, K.; Patel, B.; Evans, G.; Ng, Y. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod. Top.* **2005**, *10*, 103–122. [\[CrossRef\]](#)
17. Prada, I.; Mico-Munoz, P.; Giner-Lluesma, T.; Mico-Martinez, P.; Collado-Castellano, N.; Marzano-Saiz, A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal* **2019**, *24*, e364–e372. [\[CrossRef\]](#)
18. Alghamdi, F.; Shakir, M. The Influence of *Enterococcus faecalis* as a Dental Root Canal Pathogen on Endodontic Treatment: A Systematic Review. *Cureus* **2020**, *12*, e7257. [\[CrossRef\]](#)
19. Estrela, C.; Silva, J.A.; de Alencar, A.H.; Leles, C.R.; Decurcio, D.A. Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis*—A systematic review. *J. Appl. Oral. Sci.* **2008**, *16*, 364–368. [\[CrossRef\]](#)
20. Safavi, K.E.; Spangberg, L.S.; Langeland, K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J. Endod.* **1990**, *16*, 207–210. [\[CrossRef\]](#)
21. Meire, M.; de Moor, R.J.G. Principle and antimicrobial efficacy of laser-activated irrigation: A narrative review. *Int. Endod. J.* **2024**, *57*, 841–860. [\[CrossRef\]](#)

22. Olivi, G. Laser use in endodontics: Evolution from direct laser irradiation to laser-activated irrigation. *J. Laser Dent.* **2013**, *21*, 58–71.
23. Zanin, I.C.; Goncalves, R.B.; Junior, A.B.; Hope, C.K.; Pratten, J. Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: An in vitro study. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, *56*, 324–330. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Komerik, N.; Nakanishi, H.; MacRobert, A.J.; Henderson, B.; Speight, P.; Wilson, M. In vivo killing of *Porphyromonas gingivalis* by toluidine blue-mediated photosensitization in an animal model. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 932–940. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Soukos, N.S.; Chen, P.S.; Morris, J.T.; Ruggiero, K.; Abernethy, A.D.; Som, S.; Foschi, F.; Doucette, S.; Bammann, L.L.; Fontana, C.R.; et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J. Endod.* **2006**, *32*, 979–984. [\[CrossRef\]](#)
26. Wilson, B.C.; Patterson, M.S. The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* **1986**, *31*, 327–360. [\[CrossRef\]](#)
27. Blanken, J.; de Moor, R.J.; Meire, M.; Verdaasdonk, R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 1: A visualization study. *Lasers Surg. Med.* **2009**, *41*, 514–519. [\[CrossRef\]](#)
28. De Groot, S.D.; Verhaagen, B.; Versluis, M.; Wu, M.K.; Wesselink, P.R.; van der Sluis, L.W. Laser-activated irrigation within root canals: Cleaning efficacy and flow visualization. *Int. Endod. J.* **2009**, *42*, 1077–1083. [\[CrossRef\]](#)
29. De Moor, R.J.; Blanken, J.; Meire, M.; Verdaasdonk, R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 2: Evaluation of the efficacy. *Lasers Surg. Med.* **2009**, *41*, 520–523. [\[CrossRef\]](#)
30. Anton, Y.O.C.I.; Marger, L.; di Bella, E.; Abdelaziz, M.; Feilzer, A.; Krejci, I. Activation of endodontic irrigants using a 9.3 microm CO₂ and diode lasers: A laboratory proof of concept model. *Am. J. Dent.* **2024**, *37*, 39–46.
31. Do, Q.L.; Gaudin, A. The Efficiency of the Er: YAG Laser and PhotonInduced Photoacoustic Streaming (PIPS) as an Activation Method in Endodontic Irrigation: A Literature Review. *J. Lasers Med. Sci.* **2020**, *11*, 316–334. [\[CrossRef\]](#)
32. George, R.; Walsh, L.J. Apical extrusion of root canal irrigants when using Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers with optical fibers: An in vitro dye study. *J. Endod.* **2008**, *34*, 706–708. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Helvaciglu Kivanc, B.; Deniz Arisu, H.; Yanar, N.O.; Silah, H.M.; Inam, R.; Gorgul, G. Apical extrusion of sodium hypochlorite activated with two laser systems and ultrasonics: A spectrophotometric analysis. *BMC Oral. Health* **2015**, *15*, 71. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Olivi, G.; DiVito, E.E. Advanced laser-activated irrigation: PIPSTM technique and clinical protocols. In *Lasers in Endodontics. Scientific Background and Applications*, 1st ed.; Olivi, G., de Moor, R., DiVito, E., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2016; pp. 219–292.
35. Schoop, U.; Kluger, W.; Moritz, A.; Nedjelic, N.; Georgopoulos, A.; Spert, W. Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg. Med.* **2004**, *35*, 111–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Beer, F.; Buchmair, A.; Wernisch, J.; Georgopoulos, A.; Moritz, A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—An in vitro study. *Lasers Med. Sci.* **2012**, *27*, 361–364. [\[CrossRef\]](#)
37. Schoop, U.K.; Kluger, W.; Dervisbergovic, S.; Goharkhay, K.; Wernisch, J.; Georgopoulos, A.; Spert, W.; Moritz, A. Innovative wavelengths in endodontic treatment. *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 624–630. [\[CrossRef\]](#)
38. Beltes, C.; Economides, N.; Sakkas, H.; Papadopoulou, C.; Lambrianidis, T. Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green and Near-Infrared Diode Laser Against *Enterococcus faecalis* in Infected Human Root Canals. *Photomed. Laser Surg.* **2017**, *35*, 264–269. [\[CrossRef\]](#)
39. Pirnat, S.; Lukac, M.; Ihan, A. Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers Med. Sci.* **2011**, *26*, 755–761. [\[CrossRef\]](#)
40. Beltes, C.; Sakkas, H.; Economides, N.; Papadopoulou, C. Antimicrobial photodynamic therapy using Indocyanine green and near-infrared diode laser in reducing *Enterococcus faecalis*. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2017**, *17*, 5–8. [\[CrossRef\]](#)
41. Katalinic, I.; Budimir, A.; Bosnjak, Z.; Jakovljevic, S.; Anic, I. The photo-activated and photo-thermal effect of the 445/970 nm diode laser on the mixed biofilm inside root canals of human teeth in vitro: A pilot study. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *26*, 277–283. [\[CrossRef\]](#)
42. Benedicenti, S.; Cassanelli, C.; Signore, A.; Ravera, G.; Angiero, F. Decontamination of root canals with the gallium-aluminum-arsenide laser: An in vitro study. *Photomed. Laser Surg.* **2008**, *26*, 367–370. [\[CrossRef\]](#)
43. Lan, W.H. Temperature elevation on the root surface during Nd:YAG laser irradiation in the root canal. *J. Endod.* **1999**, *25*, 155–156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Stabholz, A.; Sahar-Helft, S.; Moshonov, J. Lasers in endodontics. *Dent. Clin. N. Am.* **2004**, *48*, 809–832. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Borges, C.C.; Estrela, C.; Lopes, F.C.; Palma-Dibb, R.G.; Pecora, J.D.; De Araujo Estrela, C.R.; Sousa-Neto, M.D. Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with *Enterococcus faecalis*. *J. Photochem. Photobiol. B* **2017**, *176*, 1–8. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Alfredo, E.; Marchesan, M.A.; Sousa-Neto, M.D.; Brugnera-Junior, A.; Silva-Sousa, Y.T. Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal. *J. Dent.* **2008**, *36*, 529–534. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Anagnostaki, E.; Mylona, V.; Parker, S.; Lynch, E.; Grootveld, M. Systematic Review on the Role of Lasers in Endodontic Therapy: Valuable Adjunct Treatment? *Dent. J.* **2020**, *8*, 63. [\[CrossRef\]](#)
48. Dawasaz, A.A. In Vivo Efficacy of Diode Laser as a Monotherapy in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Photobiomodul. Photomed. Laser Surg.* **2022**, *40*, 59–70. [\[CrossRef\]](#)

49. Klinke, T.; Klimm, W.; Gutknecht, N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1997**, *15*, 29–31. [\[CrossRef\]](#)
50. Provost, C.; Rocca, G.T.; Thibault, A.; Machtou, P.; Bouillaguet, S. Influence of Needle Design and Irrigant Flow Rate on the Removal of *Enterococcus faecalis* Biofilms In Vitro. *Dent. J.* **2022**, *10*, 59. [\[CrossRef\]](#)
51. Manoil, D.; Filieri, A.; Gameiro, C.; Lange, N.; Schrenzel, J.; Wataha, J.C.; Bouillaguet, S. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2014**, *11*, 372–379. [\[CrossRef\]](#)
52. Stocks, S.M. Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight. *Cytom. Part A J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **2004**, *61*, 189–195. [\[CrossRef\]](#)
53. Gutknecht, N.; Franzen, R.; Schippers, M.; Lampert, F. Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **2004**, *22*, 9–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Sarda, R.A.; Shetty, R.M.; Tamrakar, A.; Shetty, S.Y. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, diode laser, and sodium hypochlorite and their combinations on endodontic pathogens. *Photodiagn. Photodyn. Ther.* **2019**, *28*, 265–272. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Orstavik, D.; Haapasalo, M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod. Dent. Traumatol.* **1990**, *6*, 142–149. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Shen, Y.; Stojicic, S.; Haapasalo, M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J. Endod.* **2011**, *37*, 657–661. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
57. Giard, J.C.; Hartke, A.; Flahaut, S.; Benachour, A.; Boutibonnes, P.; Auffray, Y. Starvation-induced multiresistance in *Enterococcus faecalis* JH2-2. *Curr. Microbiol.* **1996**, *32*, 264–271. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Stuart, C.H.; Schwartz, S.A.; Beeson, T.J.; Owatz, C.B. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **2006**, *32*, 93–98. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Cimpean, S.I.; Pop-Ciutirila, I.S.; Matei, S.R.; Colosi, I.A.; Costache, C.; Nicula, G.Z.; Badea, I.C.; Colceriu Burtea, L. Effectiveness of Different Final Irrigation Procedures on *Enterococcus faecalis* Infected Root Canals: An In Vitro Evaluation. *Materials* **2022**, *15*, 6688. [\[CrossRef\]](#)
60. Kurian, A.H.; Sethi, S.; Aneja, K.; Gupta, A.; Virmani, S.; Abraham, D. Elimination of *Enterococcus faecalis* from root canal system using laser-activated nanoparticles: A systematic review. *Lasers Med. Sci.* **2023**, *38*, 81. [\[CrossRef\]](#)
61. Puleio, F.; Pirri, R.; Tosco, V.; Lizio, A.S.; Tripodi, P.; la Spina, I.; la Fauci, V.; Squeri, R. Assessment of 2'-Fucosyllactose and Lacto-N-Neotetraose Solution as an Irrigant in *E. faecalis*-Infected Root Canals: An In Vitro Study. *Clin. Pract.* **2024**, *14*, 1348–1356. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. da Costa Ribeiro, A.; Nogueira, G.E.C.; Antoniazzi, J.H.; Moritz, A.; Zetzell, D.M. Effects of Diode Laser (810 nm) Irradiation on Root Canal Walls: Thermographic and Morphological Studies. *J. Endod.* **2007**, *33*, 252–255. [\[CrossRef\]](#)
63. Gutknecht, N.; Franzen, R.; Meister, J.; Vanweersch, L.; Mir, M. Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med. Sci.* **2005**, *20*, 99–103. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Eriksson, A.R.; Albrektsson, T. Temperature threshold levels for heat-induced bone tissue injury: A vital-microscopic study in the rabbit. *J. Prosthet. Dent.* **1983**, *50*, 101–107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Zou, Z.; Bhandari, J.; Xiao, B.; Liang, X.; Zhang, Y.; Yan, G. Effect of using diode laser on *Enterococcus faecalis* and its lipoteichoic acid (LTA) in chronic apical periodontitis. *Lasers Med. Sci.* **2021**, *36*, 1059–1066. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Braun, A.; Hagelauer, E.J.; Wenzler, J.; Heimer, M.; Frankenberger, R.; Stein, S. Microcrack Analysis of Dental Hard Tissue After Root Canal Irradiation with a 970-nm Diode Laser. *Photomed. Laser Surg.* **2018**, *36*, 621–628. [\[CrossRef\]](#)
67. Saunders, E.M. In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. 2. Histological response to temperature elevation on the external surface of the root. *Int. Endod. J.* **1990**, *23*, 268–274. [\[CrossRef\]](#)
68. Faria, M.I.; Sousa-Neto, M.D.; Souza-Gabriel, A.E.; Alfredo, E.; Romeo, U.; Silva-Sousa, Y.T. Effects of 980-nm diode laser on the ultrastructure and fracture resistance of dentine. *Lasers Med. Sci.* **2013**, *28*, 275–280. [\[CrossRef\]](#)
69. Saunders, E.M. In vivo findings associated with heat generation during thermomechanical compaction of gutta-percha. 1. Temperature levels at the external surface of the root. *Int. Endod. J.* **1990**, *23*, 263–267. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.