



HAL
open science

**Desulfovibrio spp. dans la maladie parodontale :
Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité
de l'amoxicilline libre ou complexée sur ces formes
extracellulaires et intracellulaires**

Catherine Boutelliez Bisson-Bouteillez

► **To cite this version:**

Catherine Boutelliez Bisson-Bouteillez. Desulfovibrio spp. dans la maladie parodontale : Interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ces formes extracellulaires et intracellulaires. Sciences agricoles. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10113 . tel-01748305

HAL Id: tel-01748305

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748305>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Thèse
Présentée et soutenue publiquement
pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy-1
Mention Pharmacologie

par

Catherine BISSON-BOUTELLIEZ

***Desulfovibrio* spp. dans la maladie parodontale :
Interactions avec les cellules épithéliales KB et
activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ses
formes extracellulaires et intracellulaires.**

Le 5 novembre 2009

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs :	Professeur Danièle DUFFAUT	Université de Toulouse
	Professeur Henri TENENBAUM	Université de Strasbourg
Examineurs :	Professeur Jacques DOURY	Université de Lyon
	Professeur Alain LOZNIEWSKI	UHP Nancy I (directeur de thèse)
	Docteur Francine KEDZIEREWICZ	UHP Nancy I (codirecteur de thèse)
	Docteur Neal MILLER	UHP Nancy I

Remerciements

A Monsieur le Professeur Alain Lozniewski,

Professeur de la faculté de Médecine de l'UHP, Nancy 1.

Vous avez très gentiment accepté de nous ouvrir les portes de votre laboratoire. Recevez nos plus sincères remerciements pour les moyens mis à notre disposition durant ces années passées au sein de votre équipe. Votre expérience, vos grandes compétences et vos précieux conseils ont permis l'accomplissement de ce travail. Nous avons particulièrement apprécié votre enthousiasme et votre dynamisme communicatif. Trouvez ici le témoignage de notre profonde admiration et de nos remerciements les plus sincères.

A Madame le Docteur Kedzierewicz,

Maître de conférences de la faculté de Pharmacie de l'UHP, Nancy 1.

Recevez nos plus vifs remerciements pour nous avoir accueillis dans votre laboratoire. Nous avons toujours pu compter sur votre disponibilité et vos précieux conseils qui ont permis la réalisation de ce travail. Nous tenons à vous exprimer toute notre reconnaissance pour votre patience et votre sérénité jamais en défaut. Que ce travail soit pour vous l'expression de notre profond respect et de l'estime que nous vous portons.

A Madame le Professeur Duffaut

Professeur de la faculté d'Odontologie de Toulouse

Nous sommes particulièrement honorée de votre présence dans ce jury de thèse. Nous vous remercions d'avoir accepté de juger ce travail en qualité de rapporteur.

A Monsieur le Professeur Tenenbaum

Professeur de la Faculté d'Odontologie de Strasbourg

Nous sommes très sensible à l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Nous apprécions tout particulièrement vos qualités humaines et votre droiture.

A Monsieur le Professeur Doury

Professeur de la faculté d'Odontologie de Lyon.

Nous sommes particulièrement honorée de votre présence dans ce jury. Votre participation en tant que membre de jury s'inscrit dans une continuité logique puisque vous nous avez soutenue tout au long de notre cursus universitaire. Trouvez ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Docteur Miller

Maître de conférences de la faculté d'Odontologie de l'UHP, Nancy 1.

Veillez trouver dans ce travail l'expression de notre plus profonde reconnaissance. Vous nous avez prodiguée tout au long de notre cursus un soutien sans faille. Nous vous remercions tout particulièrement pour votre droiture, votre patience et votre sérénité. Nous avons toujours pu compter sur votre disponibilité, vos conseils et vos encouragements chaleureux, mêmes dans les moments les plus difficiles. Les mots semblent vains pour vous exprimer toute l'estime et l'infini respect que nous vous témoignons.

A Madame le Professeur Chantal Finance pour nous avoir reçu dans votre laboratoire, à toute l'équipe de l'Unité Mixte de Recherche 7565 et surtout au Groupe d'Etude des Vecteurs Supramoléculaires des Médicaments, recevez nos plus vifs remerciements,

Un pensée toute particulièrement aux personnes qui m'ont soutenue et suivie dans ce travail, qu'elles trouvent ici toute ma reconnaissance :

A Anne-Marie, pour ton aide technique, tes gâteaux et ta gentillesse,

A Stéphane, pour tes idées géniales et tes précieux conseils techniques,

A Corentine, compagne des moments difficiles et de doute, merci pour ton humour et tes encouragements,

A Isabelle, pour ton travail rigoureux et ta disponibilité,

A Fred, pour ta patience, ton aide technique et scientifique, ton investissement dans ce travail, ton soutien moral dans les moments difficiles, mille mercis.

A Marc, pour ton aide informatique et ta bonne humeur,

A Hélène, pour ta disponibilité et ton aide,

A toutes les techniciennes du secteur de Culture Cellulaire, un grand merci pour vos conseils et votre aide,

A Anne-Marie, pour ta bonne humeur,

A Pascal, Sébastien, recevez tous deux mes remerciements les plus sincères pour votre soutien et pour m'avoir permis de terminer ce travail en toute sérénité, que ce manuscrit soit pour vous l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre amitié.

A ma famille, qu'elle trouve par ce travail l'expression de mon immense gratitude pour son soutien sans faille et la confiance qu'elle m'a accordée,

A Franck, pour m'avoir permis de me libérer du temps afin de me consacrer à ce travail,

A mes enfants, à qui je dédie ce manuscrit.

PREAMBULE

Environ 15% de la population mondiale sont atteints d'une maladie parodontale (Pilot et Miyazaki 1991; Pilot et al. 1992; Miyazaki et al. 1991). Une étude récente a montré que cette maladie touche 22% des français (Bourgeois et al. 2007). Parmi les maladies parodontales, les parodontites sont caractérisées par la destruction des tissus de support des dents, notamment à l'origine des troubles de la mastication et de la phonation. De nombreuses bactéries sont impliquées dans l'étiologie de la maladie parodontale (Haffajee et Socransky 1994, Socransky et al. 1998). Ces microorganismes colonisent la muqueuse buccale et y induisent des réactions inflammatoires. Les principaux parodontopathogènes tels que *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, sont également capables d'envahir les cellules épithéliales et/ou endothéliales. Ces bactéries intra-cellulaires peuvent représenter des réservoirs à l'origine de recontamination des tissus gingivaux et de ce fait contribuer à la persistance voire à l'exacerbation de la réponse inflammatoire responsable de destruction des tissus sous jacents.

Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) incluant certaines espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* peuvent faire partie de la flore buccale mais colonisent préférentiellement les poches parodontales des patients atteints de parodontite sévère (Langendijk et al. 1999, Bisson-Boutelliez 2003, Boopathy et al. 2002). De ce fait, les BSR et en particulier les *Desulfovibrio* spp. pourraient être impliquées dans l'éthiopathogénie de la maladie parodontale. Ceci nous a conduit à étudier *in vitro* les interactions de *Desulfovibrio fairfieldensis* et *Desulfovibrio desulfuricans* avec des cellules épithéliales (cellules KB). Nous avons étudié la capacité de ces bactéries à envahir ces cellules voire à s'y multiplier et avons évalué en parallèle la réponse cytokinique des cellules eucaryotes infectées. Il a été montré que certaines souches de *Desulfovibrio* spp. étaient productrices de bêta-lactamases et de ce fait étaient devenues résistantes à certaines bêta-lactamines dont l'amoxicilline. Ces molécules peuvent être protégées de l'action de ces enzymes par complexation avec des macrocycles glucosidiques tels que les cyclodextrines. Dans ce travail, nous avons évalué la capacité des β -cyclodextrines à protéger l'amoxicilline de l'activité des bêta-lactamases produites par *Desulfovibrio* spp. et d'autres parodontopathogènes, après caractérisation physico-chimique du complexe amoxicilline- β -cyclodextrine.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES.....	3
LISTE DES TABLEAUX.....	5
SITUATION DU SUJET.....	6
I. MALADIE PARODONTALE.....	7
1. Définition et classification.....	8
1.1. Définition.....	8
1.2. Classification.....	9
2. Epidémiologie.....	11
2.1. Prévalence.....	11
2.2. Impact des maladies parodontales sur la santé générale.....	12
3. Parodontopathogènes.....	14
3.1. Bactéries impliquées dans la maladie parodontale.....	14
3.1.1. Déséquilibre hôte- bactéries.....	14
3.1.2. Postulats de Koch.....	14
3.1.3. Parodontopathogènes reconnus.....	16
3.2. Facteurs de colonisation.....	17
3.2.1. Facteurs métaboliques.....	17
3.2.2. Adhésines.....	19
3.2.3. Coagrégation.....	19
3.2.4. Relation interbactérienne au sein du biofilm.....	22
3.3. Facteurs de virulence.....	22
3.3.1. Facteurs de destruction tissulaire : enzymes et autres molécules.....	22
3.3.2. Pouvoir invasif.....	23
3.3.2.1. Mécanismes généraux.....	24
3.3.2.2. Autre mécanisme.....	26
3.3.2.3. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	27
3.3.2.4. <i>Porphyromonas gingivalis</i>	28
3.3.2.5. Autres bactéries parodontales.....	30
3.3.3. Autres facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte.....	31
3.3.4. Facteurs induisant un dysfonctionnement de la réponse de l'hôte.....	33
II. <i>DESULFOVIBRIO</i> spp.....	36
1. Taxonomie.....	36
2. Caractères bactériologiques.....	36
3. Habitat.....	37
4. Pouvoir pathologique chez l'homme.....	37
4.1. Infection intra-abdominale et systémique.....	37
4.2. Maladie inflammatoire chronique intestinale.....	38
4.3. Maladie parodontale et caries.....	38
5. Facteurs de virulence.....	40
5.1. Facteurs de colonisation.....	40

5.2.	<i>Facteurs provoquant des lésions cellulaires et tissulaires</i>	41
6.	Identification et sensibilité aux antibiotiques des principales espèces de <i>Desulfovibrio</i> pathogènes	45
6.1.	<i>Culture et identification</i>	45
6.2.	<i>Sensibilité aux antibiotiques</i>	46
III.	AMOXICILLINE DANS LES MALADIES PARODONTALES	46
1.	Composition chimique	46
2.	Mécanisme d'action antibactérienne	47
3.	Spectre d'activité	47
4.	Pharmacocinétique	48
5.	Indications cliniques actuelles de l'amoxicilline en parodontologie	50
5.1.	<i>Antibiothérapie prophylactique</i>	50
5.2.	<i>Antibiothérapie curative</i>	50
6.	Résistance bactérienne à l'amoxicilline	51
6.1.	<i>Généralités</i>	51
6.2.	<i>β-lactamases et bactéries impliquées dans les infections bucco-dentaires</i>	51
IV.	CYCLODEXTRINES	53
1.	Définition et préparation	53
2.	Structure	54
2.1.	<i>Cyclodextrines natives</i>	54
2.2.	<i>Cyclodextrines modifiées</i>	57
3.	Propriétés physicochimiques	58
4.	Toxicité des cyclodextrines	60
4.1.	<i>Cyclodextrines natives</i>	60
4.2.	<i>Cyclodextrines modifiées</i>	62
5.	Intérêts de la complexation avec la cyclodextrine	64
5.1.	<i>Dans le domaine pharmaceutique</i>	67
5.2.	<i>Autres domaines</i>	67
6.	Spécialités à base de cyclodextrines actuellement commercialisées	68
7.	Les techniques de préparation de complexe avec la cyclodextrine	70
7.1.	<i>La coprécipitation</i>	70
7.2.	<i>Extrusion</i>	71
7.3.	<i>Le mélange sec</i>	71
8.	Séchage des complexes	71
9.	Méthodes de caractérisation des complexes	72
9.1.	<i>Chromatographie liquide à haute performance</i>	72
9.2.	<i>Etude par spectrométrie</i>	72
9.3.	<i>Méthodes thermo analytiques : thermogravimétrie, calorimétrie différentielle à balayage, spectrométrie de masse</i>	74

OBJECTIFS.....	75
MATERIEL ET METHODES.....	77
I. POUVOIR INVASIF de <i>DESULFOVIBRIO</i> spp.....	78
1. Culture cellulaire.....	78
2. Culture bactérienne.....	79
3. Protocole d'invasion des cellules KB et détermination des concentrations des bactéries intracellulaires viables.....	79
4. Inhibition de l'internalisation.....	81
5. Etude ultra structurale des cellules KB infectées.....	81
5.1. <i>Microscopie électronique à balayage.....</i>	81
5.2. <i>Microscopie électronique à transmission.....</i>	82
5.3. <i>Microscopie confocale.....</i>	83
5.3.1. Obtention et étendue de la réactivité et de la spécificité des anticorps anti- <i>Desulfovibrio</i>	83
5.3.2. Etude en microscopie confocale proprement dite.....	84
II. ETUDE DES SECRETIONS CYTOKINIQUES DES CELLULES EPITHELIALES APRES INFECTION BACTERIENNE.....	86
1. Généralités.....	86
2. Kit RayBio®.....	88
3. Kit « Instant ELISA™ ».....	89
III. ETUDES PHYSICOCHIMIQUES DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β -CYCLODEXTRINE.....	90
1. Matériel et préparation des complexes	90
1.1. <i>Produits chimiques et tampon.....</i>	90
1.2. <i>Préparation des complexes.....</i>	90
2. Caractérisation des complexes.....	90
2.1. <i>Détermination de la constante de complexation.....</i>	90
2.2. <i>Etude par spectrométrie.....</i>	91
2.2.1. Infrarouge.....	91
2.2.2. Résonance magnétique nucléaire.....	92
2.3. <i>Méthodes thermo analytiques : Thermogravimétrie, calorimétrie, spectrométrie de masse.....</i>	92
IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β -CYCLODEXTRINE.....	93
1. Détermination de l'activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou des complexes amoxicilline-β-cyclodextrine.....	93
1.1 <i>Microorganismes et conditions de culture bactérienne.....</i>	93
1.2 <i>Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé.....</i>	94
2. Détermination de l'activité de l'amoxicilline libre ou des complexes amoxicilline-β-cyclodextrine.....	95
V. ANALYSES STATISTIQUES.....	95

RESULTATS.....	96
I. ETUDE DU POUVOIR INVASIF DE <i>DESULFOVIBRIO</i> spp.....	97
1. Entrée et survie de <i>Desulfovibrio</i> dans les cellules KB.....	98
2. Localisation intracytoplasmique de <i>Desulfovibrio</i> dans les cellules KB.....	99
3. Implication des microtubules dans l'internalisation de <i>Desulfovibrio</i> dans les cellules KB.....	102
II. EVALUATION DES SECRETIONS CYTOKINIQUES PAR LES CELLULES EPITHELIALES STIMULEES OU NON PAR <i>DESULFOVIBRIO</i> spp.....	103
III. ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β - CYCLODEXTRINE.....	105
1. Détermination de la constante de complexation.....	105
2. Etude spectrométrique.....	107
2.1. <i>Infrarouge</i>	107
2.2. <i>RMN H¹</i>	108
3. DSC et thermogravimétrie.....	110
IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β - CYCLODEXTRINE.....	112
1. Activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou complexée en milieu gélifié.....	112
2. Activité amoxicilline complexée sur les bactéries internalisées.....	113
DISCUSSION.....	115
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVE.....	127
BIBLIOGRAPHIE.....	130
PUBLICATION.....	151

LISTE DES ABREVIATIONS

AI.....	Auto Inducer
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
ADN.....	Acide Désoxyribonucléique
AFSSAPS.....	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de santé
Amox.....	Amoxicilline
ATCC.....	American Type Cell. Collection
β -CD.....	β -Cyclodextrine
BHI.....	Brain Heart Infusion
BSA.....	Bovine Sérum Albumine
BSR.....	Bactéries Sulfato Réductrices
CGTase.....	Glycosyltransférase
CLHP.....	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CLSI.....	Clinical and Laboratory Standard Institute
CMI.....	Concentration Minimale Inhibitrice
CSV.....	Composé sulfuré Volatile
Dd.....	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> 29577 ATCC
Df.....	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i>
<i>D. piger</i>	<i>Desulfovibrio piger</i>
DMSO.....	Diméthylsulfoxyde
DiIC ₁₆	Di-Octadecyl-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DL.....	Dose Létale
DOSY.....	Diffusion-ordered Spectroscopy
DSC.....	Differential Scanning Calorimetry
<i>E. corrodens</i>	<i>Eikenella corrodens</i>
ELISA.....	Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay
FDA.....	Food and Drug Agency
FITC.....	Fluorescein Isothiocyanate
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
HP- β -CD.....	Hydroxyl Propyl - β - cyclodextrine
H ₂ S.....	Hydrogène sulfuré
INERIS.....	Institut National Environnement Industriel et des Risques
IR- TF.....	Infrarouge Transformé de Fourier
Ig.....	Immunoglobuline
IL.....	Interleukine
Kc.....	Constante de complexation
LBN.....	Laboratoire de Bactériologie de Nancy
LPS.....	Lipopolysaccharide
MEC.....	Matrice extracellulaire
MOI.....	Multiplicity of Infection
MMP.....	MétalloProtéinase Matricielle
m/v.....	rapport masse/ volume
MS.....	Spectrométrie de Masse
PBS.....	Phosphate Buffer Saline
PLP.....	Protéine Liant les Pénicillines
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE2.....	Prostaglandine E2
PMN.....	Polymorphonucléaire neutrophile

RAMEB.....	Randomly Methylated - β - Cyclodextrine
RANTES.....	Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
RMN.....	Résonance Magnétique Nucléaire
RMN-ROESY.....	Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
SFV.....	Sérum de Veau Foetal
SBE- β -CD.....	Sulfobutylether - β - Cyclodextrine
SM.....	Spectrométrie
<i>T. denticola</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>T. forsythia</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
TG.....	Thermogravimétrie
TMB.....	TétraMéthyl Benzidine
TNF α	Tumor necrosis factor α
UFC.....	Unité Formant Colonie
UV.....	Ultra-Violet
VCAM-1.....	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Dent et parodonte sain	17
Figure 2. Parodontite avancée	18
Figure 3. Mécanismes d'internalisation généraux dits « Trigger » et « Zipper »	35
Figure 4. Modèle d'internalisation bactérienne via des intégrines.....	35
Figure 5. Modèle schématique des interactions d' <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (anciennement <i>Actinobacillus</i>) et de <i>Porphyromonas gingivalis</i> avec les cellules épithéliales.	39
Figure 6. Schéma de l'amoxicilline.....	57
Figure 7. Schéma des cyclodextrines natives.....	65
Figure 8. Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine.	65
Figure 9. Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leur cavité respective.	69
Figure 10. Validation de l'anticorps anti- <i>Desulfovibrio</i>	94
Figure 11. Technique <i>ELISA</i> en sandwich.	97
Figure 12. Plaque de microtitrage 96 puits.	97
Figure 13. Kit de détection rapide d'IL-6 : Instant <i>ELISA</i> TM	99
Figure 14. Viabilité intracellulaire de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 29577, <i>D. fairfieldensis</i> et <i>P.</i> <i>gingivalis</i> ATCC 33277.....	108
Figure 15. <i>D. desulfuricans</i> adhérant à la surface de cellules KB après 2 heures d'incubation visualisé par microscopie électronique à balayage.....	108
Figure 16. Interactions de <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> (a) et de <i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> (b) et (c) avec les prolongements membranaires de cellules KB	109
Figure 17. Formes intracellulaires de <i>D. desulfuricans</i> ATCC 29577.....	110
Figure 18. Bactéries internalisées dans les cellules épithéliales KB.....	111
Figure 19. Localisation intracellulaire de <i>D. fairfieldensis</i> et mise en évidence des vésicules intracytoplasmiques dans les cellules KB par microscopie confocale.	111
Figure 20. Concentration moyenne d'IL-8 dans le surnageant des cellules KB après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection par <i>D. fairfieldensis</i> et <i>D. desulfuricans</i> 29577 ATCC..	114
Figure 21. Concentration moyenne d'IL-6 dans le surnageant des cellules KB après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection par <i>D. fairfieldensis</i> et <i>D. desulfuricans</i> 29577 ATCC.	114
Figure 22. Schéma de l'amoxicilline.....	115
Figure 23. Les temps de rétention de l'amoxicilline observés en CLHP en fonction des différentes concentrations de β -CD dans la phase mobile.	116
Figure 24. Détermination de K_c à l'aide du temps de rétention du système binaire	116
Figure 25. Spectres d'IR –TF superposés de l'amoxicilline, de la β -CD et du complexe [amox- β - CD] (1 :1) et du mélange physique de l'amoxicilline et de la β -CD.....	117
Figure 26. Spectres superposés de l'amoxicilline, β -CD et du complexe [amox- β -CD] (1:5).	118
Figure 27. Thermogramme et spectre DSC de l'amoxicilline.	121
Figure 28. Spectre de masse d'ions moléculaires sélectionnés de l'amoxicilline.....	121

Figure 29. Comparaison des spectres de DSC de l'amox, de la β -CD, du complexe amox- β - CD et du mélange physique amox et β -CD.....	122
Figure 30. Nombre de <i>P.gingivalis</i> ATCC 33277 présents à l'intérieur des cellules KB après 2 heures d'incubation avec de l'amoxicilline seule ou complexée avec des β -cyclodextrines	124
Figure 31. Hypothèse d'inclusion de l'amoxicilline dans la β -cyclodextrine.....	133

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des maladies parodontales	20
Tableau 2. Les postulats de Koch revisités pour satisfaire au particularisme des infections parodontales	26
Tableau 3. Capacité de différentes bactéries à stimuler la synthèse de diverses cytokines par divers types cellulaires	44
Tableau 4. Caractéristiques pharmacocinétiques systémiques et diffusion gingivo-crêviculaire de l'amoxicilline et de différents antibiotiques.	59
Tableau 5. Caractéristiques et voies d'administration des différentes β -cyclodextrines modifiées	66
Tableau 6. Solubilités et monographies à la pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition des produits pharmaceutiques commercialisés.	67
Tableau 7. Principales caractéristiques des cyclodextrines natives	69
Tableau 8. Doses létales des cyclodextrines natives selon leur mode d'administration chez le rat	71
Tableau 9. Tableau récapitulatif de la toxicité des cyclodextrines modifiées	73
Tableau 10. Liste des spécialités pharmaceutiques incluant dans leur composition une cyclodextrine commercialisées en France	78
Tableau 11. Liste des spécialités pharmaceutiques commercialisées dans le monde incluant dans leur composition une cyclodextrine	79
Tableau 12. Comparaison de la capacité d'invasion dans les cellules KB des différentes souches bactériennes.....	107
Tableau 13. Effets du nocodazole et de la cytochalasine D sur l'invasion des cellules KB par <i>Desulfovibrio</i> spp.....	112
Tableau 14. Attribution des bandes d'absorption majeures de l'amoxicilline et des systèmes binaires de l'amoxicilline- β -CD en IR- TF.	117
Tableau 15. Déplacements chimiques des protons de l'amoxicilline pour les systèmes binaires issus des spectres de RMN H^1	119
Tableau 16. Déplacements chimiques des protons de la β -CD pour les systèmes binaires issus des spectres de RMN H^1	120
Tableau 17. Activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou complexée avec des β -cyclodextrines sur <i>Desulfovibrio</i> spp. et d'autres souches anaérobies productrices ou non de β -lactamases.....	123

SITUATION DU SUJET

I. LA MALADIE PARODONTALE

Le parodonte, du grec para, « à côté de » et odontos, « dent », est constitué par l'ensemble des tissus qui entourent et soutiennent la dent. Il comprend la gencive, l'os alvéolaire, le ligament alvéolo-dentaire ou desmodonte, l'attache épithéliale et le cément (fig.1).



Figure 1. Dent et parodonte sain

La flore buccale constitue un écosystème complexe riche en bactéries composé de plus de 500 espèces. Dès la naissance, la flore buccale, inexistante *in utero* sauf en cas d'édentement, va se constituer à partir de l'environnement et au contact de la mère. Un sujet adulte peut être colonisé par 150 espèces différentes. Le nombre de bactéries supra-gingivales peut dépasser 10^9 sur une seule surface dentaire. Ainsi, des centaines de millions ou de milliards de bactéries colonisent continuellement les surfaces dentaires et établissent entre elles des relations de coopération ou d'antagonisme. La flore commensale d'un sujet avec un parodonte sain est essentiellement constituée de *Capnocytophaga* sp., *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, les spirochètes (*Treponema* sp.), *Actinomyces naeslundii*, *A. viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* sp., *Neisseria* sp., *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis* et *Veillonella* sp. (AFSSAPS, 2001).

1. Définition et classification

1.1. Définition

Les maladies parodontales sont des infections bactériennes mixtes qui déclenchent des réactions immuno-inflammatoires aboutissant à la destruction des tissus du parodonte (Houle et Grenier 2003).

Les affections parodontales se divisent en deux grands groupes :

- ❖ les gingivites dans lesquelles l'inflammation est localisée et limitée à la gencive marginale,
- ❖ les parodontites qui s'étendent au parodonte profond, correspondent à la destruction de l'ensemble des tissus de support de la dent (fig.2).

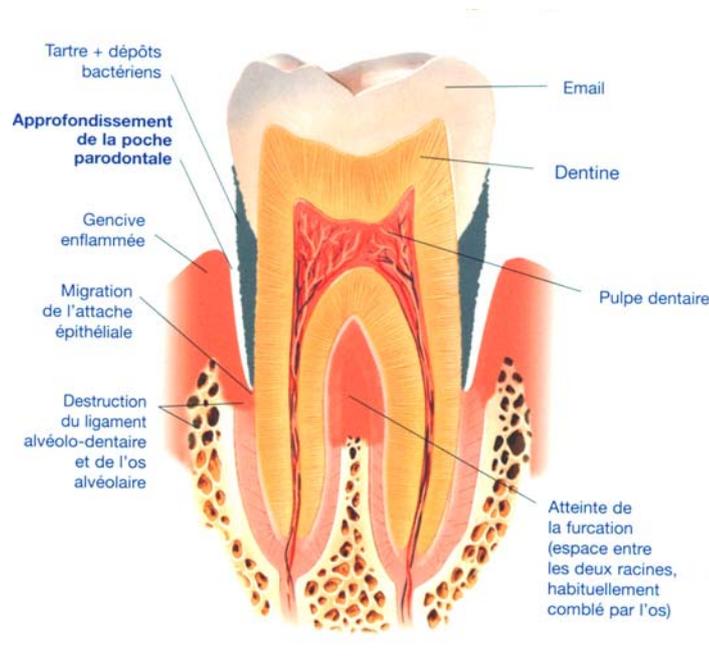


Figure 2. Parodontite avancée

On définit les parodontopathies comme des lésions à composante inflammatoire résultant d'une agression bactérienne au niveau de l'espace gingivo-dentaire, modulées par des facteurs immunologiques de l'hôte qui en déterminent l'évolution. Cette interaction bactéries-hôte peut aboutir :

- soit à une guérison, dans ce cas les défenses immunitaires sont protectrices et permettent une cicatrisation tissulaire

- soit à une exacerbation due à un dysfonctionnement des facteurs immunitaires, dans ce cas les lésions progressent et induisent une destruction majeure des tissus profonds pouvant conduire à la perte de l'organe dentaire (Mouton, 1994).

Bien que les maladies parodontales aient des aspects communs avec d'autres types d'infections, elles ont des caractères qui leur sont propres. En effet, la dent, structure minérale située d'une part au contact du milieu extérieur et d'autre part « enfouie » dans des tissus conjonctifs fournit une surface pour la colonisation de diverses espèces bactériennes. Celles-ci peuvent tout d'abord adhérer à l'émail, à l'épithélium gingival et aussi à d'autres bactéries déjà fixées sur ces tissus, jusqu'à atteindre les tissus sous-jacents. Contrairement à toutes les couches tissulaires externes du corps, la couche superficielle de l'émail ne s'exfolie pas et fournit aux bactéries une surface relativement stable, proche des tissus mous permettant leur adhésion et leur développement.

1.2. Classification

Suite à un consensus de l'American Association of Periodontology, Armitage en 1999, une classification purement nosologique des maladies parodontales a été élaborée. La précédente classification se basait sur l'âge d'apparition de la maladie et sur les tissus atteints, étant donné qu'aucune flore bactérienne spécifique n'existe pour chacune de ces maladies, sauf pour les parodontites juvéniles localisées (aujourd'hui classée dans les parodontites agressives) qui sont associées avec la présence d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Cette nouvelle classification ne prend plus en considération l'âge comme principal facteur de classification, mais plutôt les symptômes cliniques, le type de tissus atteint, l'étendue et le degré de ces atteintes tissulaires, avec un âge limite de 35 ans qui détermine le passage d'une parodontite agressive vers une parodontite chronique à un stade avancé. Elle prend en compte l'impact de maladies générales (maladie systémique, maladie génétique, hémopathies,...) sur le parodonte, et distingue les gingivites causées par la plaque bactérienne et celles qui ne sont pas causées par la plaque (tableau 1).

Tableau 1. Classification des maladies parodontales (Armitage, 1999).

I. Maladie gingivale

A-Maladie gingivale induite par la plaque

1. **Gingivite associée avec la plaque uniquement**
 - a) sans facteurs locaux
 - b) avec facteurs locaux (voir VIII A)
2. **Maladie gingivale associée à des facteurs systémiques**
 - a) Associée à des modifications endocriniennes
 - 1) Gingivite liée aux hormones (puberté, cycles menstruels, grossesse)
 - 2) Gingivite associée au diabète sucré
 - b) Associée à un trouble de la crasse sanguine : leucémie, autres troubles.
3. **Maladie gingivales et médicaments**
 - 1) Hypertrophie gingivale induite par des médicaments
 - 2) Gingivite aggravée par des médicaments : contraceptifs oraux et gingivite, autres médicaments
4. **Gingivites et malnutritions**
 - a) gingivite et carence en acide ascorbique
 - b) autres

B- Lésion gingivale non induites par la plaque

1. **Pathologie gingivale liée à une bactérie spécifique**
Neisseria gonorrhoea, Treponema pallidum, Streptocoques.
2. **Maladie gingivale d'origine virale**
 - a) Infection à herpès virus (gingivostomatite lors de primo infection, herpès buccal récidivant, varicelle-zona)
 - b) autres
3. **Maladie gingivale d'origine fongique**
 - a) Infection à Candida : candidose gingivale généralisée
 - b) Erythème gingival linéaire
 - c) Histoplasmose
 - d) autres
4. **Lésions gingivales d'origine génétique**
 - a) Gingivite au cours de fibromatoses
 - b) autres
5. **Gingivite au cours de manifestations générales**
 - a) Atteintes cutanéomuqueuses (lichen plan, pemphigoïde, érythème polymorphe, lupus érythémateux, induites par des médicaments, autres)
 - b) Réactions allergiques (biomatériaux d'obturation dentaire : mecure-nickel-acrylique- autres, composants des pâtes dentifrices, bains de bouche, et chewing-gum, aliments, autres)
6. **Lésions traumatiques** (factices, iatrogènes, accidentelles) chimique, physique, thermique
7. **Réactions auto-immunes**
8. **Non spécifiques**

II. Parodontites chroniques

A-Localisée, B- Généralisées

III. Parodontites agressives

A-Localisée, B- Généralisées

IV. Parodontites comme manifestations d'une maladie générale

A- Associées à une hémopathies

Neutropénie acquise, leucémie, autres

B- Associées à une anomalie génétique

- 1) Neutropénie familiale cyclique
- 2) Syndrome de Down
- 3) Syndrome de déficience d'adhésion des leucocytes
- 4) Syndrome de Papillon-Lefèvre
- 5) Syndrome de Chediak- Higashi
- 6) Hystiocytose
- 7) Maladie de stockage du glycogène
- 8) Agranulocytose de l'enfant
- 9) Syndrome de Cohen
- 10) Syndrome de Ehlers-Danlos (type IV et VIII)
- 11) Hypophosphatasie
- 12) Autres

C- Non spécifiées

V. Parodontopathies ulcéro-nécrotiques

Gingivites ulcéronécrotiques, parodontites ulcéronécrotiques

VI. Abscessus parodontal

Abscessus gingival, abscessus parodontal, abscessus péricoronaire

VII. Parodontite associée à une pathologie endodontique

Lésions combinées endo-parodontales

VIII. Anomalies bucco-dentaires acquises ou congénitales en rapport avec les maladies parodontales

A- Facteurs locaux liés à la dent prédisposant aux gingivites ou aux parodontites induites par la plaque

Facteurs liés à l'anatomie de la dent, obturation et restauration dentaire, fractures de racines, résorptions cervicales et fissures du ciment

B- Malformations muco-gingivales au voisinage des dents

- 1) Récessions gingivales au niveau des surfaces linguales ou vestibulaires, interproximales
- 2) Défaut de kératinisation de la gencive
- 3) Réduction de la profondeur du vestibule
- 4) Frein aberrant, anomalie de l'insertion musculaire
- 5) Excès de gencive : pseudo poche, gencive marginale inconsistante, excès de gencive visible, hypertrophie gingivale
- 6) Anomalie de la coloration

C- Malformation mucogingivale et édentation

- 1) Déficit horizontal ou vertical de la crête alvéolaire
- 2) Déficit de kératinisation de la gencive
- 3) Hypertrophie gingivale
- 4) Frein aberrant, anomalie de l'insertion musculaire
- 5) Réduction de la profondeur du vestibule
- 6) Anomalie de la coloration

D- Traumatisme occlusal : occlusal primaire, secondaire

2. Epidémiologie des maladies parodontales

2.1. Prévalence

L'état parodontal des français a été récemment évalué au niveau d'un échantillon randomisé de la population consultant dans 26 caisses nationales d'assurance maladie des travailleurs salariés, sélectionnées au hasard par région (Bourgeois et al. 2007). D'après cette étude, la prévalence des français présentant une perte d'attache de 5 mm ou plus et une poche de profondeur de 5mm sont respectivement de 46.68% et de 10.21%. Néanmoins, cette perte d'attache ne touche que 0.88 sites par individu. La profondeur des poches de la parodontite chronique, forme la plus fréquente, est légère (1 à 3 mm) pour 78%, modérée (4 à 5 mm) pour 18% et sévère (≥ 6 mm) pour 4% des français examinés, ces chiffres confortent les résultats obtenus lors de l'évaluation des maladies parodontales aux USA (Papapanou. 1999 ; Stoltenberg et al. 1993). L'évolution de la prévalence des maladies parodontales, durant ces trente dernières années, a été étudiée lors du dernier World Workshop en 2008. Hugoson et Norderyd (2008a) ont examiné l'épidémiologie de la maladie parodontale, selon le système de classification actuel et en utilisant une méthode de diagnostic clinique et radiologique similaire pour l'ensemble des études sélectionnées. Ces différents travaux regroupent l'examen clinique complet de population européenne (allemande, suédoise et norvégienne) et

nord-américaine. Il semble que d'après ces auteurs, la prévalence des parodontites ait diminué partiellement en Europe et aux USA. La gingivite évaluée chez des patients de 20 à 80 ans, a significativement diminué de 1973 à 2003. De même, le nombre de patients présentant une parodontite chronique modérée est moins important de nos jours. Néanmoins, il y a trop peu de publications scientifiques traitant de la prévalence de la maladie parodontale pour tirer des conclusions plus précises. L'étude épidémiologique menée par Hugoson et al. (2008 b) montre qu'une hygiène buccale permet d'améliorer significativement l'apparition des maladies parodontales, sur l'ensemble de la population. Même si plusieurs études ont montré des différences ethniques, il est difficile de déterminer si elles sont dues à des spécificités génétiques ou à des particularités économique-socio-culturelles.

2.2. Impact des maladies parodontales sur la santé générale

Le rapport consensuel du sixième groupe de travail européen en parodontologie, a permis d'évaluer les données récentes de l'impact des maladies parodontales sur la santé générale (Kinane et Bouchard, 2008). Les interférences causales entre les maladies parodontales et diverses pathologies générales ont été étudiées à partir de la synthèse de données issues de diverses publications épidémiologiques (études cas-témoins, études transversales, études de cohorte prospective) qui permettent de mettre en évidence des liens entre des facteurs de risque potentiel et des impacts négatifs sur la santé.

- ***Les maladies cardiovasculaires***

Diverses études ont montré l'existence d'une association entre les parodontites et les maladies cardiovasculaires (MCV). Une revue de littérature (Persson et Persson, 2008) a permis de mettre en évidence l'impact des parodontites sur les marqueurs de l'inflammation sériques tels que la PCR (protéine C réactive), IL-6, les facteurs plasminogènes, la numération des globules blancs, sur les lipides sériques et sur le débit artère-brachiale, l'épaisseur de l'intima média. L'analyse de la variabilité de ces facteurs permet de montrer l'impact négatif des maladies parodontales sur les MCV. Des études suggèrent que les parodontites contribuent à la charge infectieuse et inflammatoire globale et peuvent participer à des événements cardiovasculaires et des accidents vasculaires chez les sujets à risque. L'impact des traitements parodontaux reste à être évalué sur l'apparition et l'évolution des MCV.

- ***Diabète de type I***

Salvi et al. (2008) ont inclus diverses études (revue systématique, méta-analyses, essais cliniques contrôlés-randomisés, essais cliniques contrôlés, des études de cohorte rétrospective et prospective et des études transversales) pour évaluer l'association entre le diabète et la maladie parodontale. Le résultat de cette étude montre une association entre la parodontite sévère et un diabète mal contrôlé et des complications liées au diabète. Les effets du traitement parodontal sur le contrôle de la glycémie et l'inflammation systémique restent à être confirmés par des essais cliniques contrôlés-randomisés comprenant un échantillon de population plus important.

- ***Les accouchements prématurés***

Les publications traitant de l'association entre les maladies parodontales et les accouchements prématurés, utilisent des critères cliniques variables pour définir ces maladies, et rendent les données épidémiologiques difficilement exploitables. Néanmoins, s'il existe des indications d'une association entre les maladies parodontales et le risque accru d'issues défavorables de la grossesse, il n'y a pas de preuves concluantes montrant que le traitement des maladies parodontales limite la fréquence de naissances prématurées. D'autres études, multi-centriques contrôlées randomisées larges, seraient nécessaires pour déterminer si la prévention ou le traitement des maladies parodontales, combinée avec d'autres interventions, permettraient d'améliorer les accouchements prématurés chez les femmes concernées (Wimmer et al. 2008).

- ***Autres***

- ***Pneumopathie par aspiration du sujet âgé :***

Différentes études montrent que les bactéries présentes dans la cavité buccale sont un facteur de risque dans les pneumonies par aspiration du sujet âgé (Terpenning et al. 2001; Morris et al. 1994). Koeman et al. (2006) ont montré que la décontamination buccale avec de la chlorhexidine seule ou associée avec de la colistine réduit l'incidence des pneumopathies associées à une ventilation. D'autres auteurs concluent que l'hygiène orale permettrait de réduire approximativement de 10% le nombre de décès de patients âgés atteints de pneumonie (Sjögren et al. 2008 ; Fields 2008).

➤ *Cancer du pancréas :*

Plusieurs études de cohorte ont mis en évidence une association positive entre les parodontites et le risque de cancer pancréatique (Michaud et al. 2007 ; Stolzenberg-Solomon et al. 2003 ; Hujoel et al. 2003).

3. Parodontopathogènes

3.1. Bactéries impliquées

3.1.1. Déséquilibre hôte- bactéries

Le nombre de bactéries présentes dans le sillon gingivo-dentaire est d'environ 10^3 en situation saine et peut atteindre 10^8 au sein de poches profondes. Parmi toutes les bactéries colonisant les surfaces dentaires et les tissus gingivaux, certaines sont impliquées dans la pathogénie des parodontopathies. Une des difficultés majeures est d'identifier les bactéries responsables des parodontites. Un déséquilibre de la relation hôte- bactéries commensales a pour effet de favoriser la prédominance de certaines populations bactériennes suite à une diminution des défenses locales et/ou générales de l'hôte ou par augmentation importante d'un apport nutritionnel exogène favorisant une espèce donnée dans sa compétition au sein de l'écosystème. On a observé dans les années 90 que de nombreuses bactéries anaérobies Gram négatives, parmi lesquelles certaines sont des bactéries potentiellement parodontopathogènes, étaient déjà présentes dans la cavité buccale de nouveau-nés prédentés. Les microorganismes responsables des parodontopathies semblent être des bactéries opportunistes profitant d'un environnement favorable pour proliférer et développer leur pouvoir pathogène.

3.1.2. Postulats de Koch

Si les maladies parodontales sont des maladies infectieuses, elles obéissent à la règle de la spécificité de bactéries pathogènes, où les bactéries exogènes proviennent d'un réservoir et obéissent aux postulats de Koch. Pour déterminer quels sont les agents pathogènes responsables des parodontopathies, les bactériologistes utilisent la méthodologie de l'isolement et de la culture. Des échantillons de plaque prélevés dans des poches parodontales sont mis en culture pour isoler et identifier les microorganismes présents. L'objectif est de lister les espèces bactériennes typiques retrouvées dans les poches de chaque maladie parodontale. Un raisonnement déductif permettrait ensuite d'attribuer à telle espèce bactérienne issue de telle forme clinique un rôle de cause à effet dans l'étiologie de la maladie.

Cependant, une compilation de toutes les études bactériologiques des poches parodontales faites à ce jour révélerait que toutes les bactéries connues dans la cavité buccale ont été détectées au moins une fois dans des poches, et ne permet donc pas de mettre en évidence une espèce bactérienne isolée : cette approche est donc insuffisante pour identifier les agents étiologiques des parodontopathies. Pour tenir compte de la particularité des maladies parodontales, les bactériologistes ont modifié le postulat de l'association : ainsi seront reconnus comme agents étiologiques les plus probables ceux qui seront retrouvés en grande quantité dans une majorité de sites malades, et qui sont absents ou en faible quantité dans les sites sains. En plus du postulat d'association, les postulats de Koch revisités par Socransky et Haffajee en 1992, comptent ceux de l'élimination, de la pathogénicité chez l'animal, de la réponse immunitaire et de l'expression de facteurs de virulence (Tableau 2).

Les parodontopathies ne sont pas des maladies infectieuses à germes spécifiques, selon le principe « une maladie, un germe », mais il s'agit d'une infection pluribactérienne, de type mixte (avec des bactéries aérobies ou facultatives, et anaérobies) à prédominance anaérobie. Dans ces infections polymicrobiennes, le pouvoir pathogène n'est pas dévolu exclusivement à l'une ou l'autre des espèces bactériennes; au contraire, une coopération entre bactéries est indispensable. Cette coopération est rendue possible grâce à la formation du biofilm tant sur la dent que sur la surface épithéliale. Le biofilm fournit un environnement protecteur pour la colonisation des organismes et favorise :

- le métabolisme de certaines bactéries qui ne pourraient pas survivre à l'état planctonique,
- les transferts génétiques de résistance à certains antibiotiques,
- un pouvoir pathogène plus important (meilleure efficacité métabolique, augmentation de la tolérance à l'environnement,..),
- modifications phénotypiques (gestion de l'O₂, taux de croissance,...).

Tableau 2. Les postulats de Koch revisités pour satisfaire au particularisme des infections parodontales (d'après Socransky et Haffajee, 1992).

Postulat N°1 : Association	Les agents pathogènes étiologiques les plus probables sont les bactéries retrouvées en plus grande quantité dans une majorité de sites atteints, et absentes ou présentes en faible quantité dans les sites sains.
Postulat N°2 : Elimination	L'éradication de l'agent étiologique suspecté s'accompagne d'une rémission des signes cliniques.
Postulat N°3 : Pathogénicité chez l'animal	L'agent étiologique suspecté doit pouvoir recréer la lésion sur modèle animal
Postulat N°4 Réponse immunitaire	La réponse cellulaire ou humorale de l'hôte à l'agent étiologique suspecté doit être augmentée ou diminuée.
Postulat N°5 Facteur de virulence	L'agent étiologique suspecté doit posséder une capacité à détruire les tissus.

Ce n'est pas un facteur de virulence unique qui, comme c'est le cas pour de nombreuses pathologies générales, permet d'expliquer la pathogénie des maladies parodontales. Les bactéries à potentiel parodontopathique présentent de multiples facteurs de virulence qui peuvent être répartis en 3 catégories :

1. des facteurs assurant la colonisation de l'espace parodontal de l'hôte, où l'adhérence joue un rôle déterminant,
2. des facteurs intervenant dans le processus de destruction tissulaire,
3. des facteurs participants à la neutralisation des défenses immunitaires de l'hôte.

3.1.3. Parodontopathogènes reconnus

Conformément au rapport consensuel du World Workshop en Parodontologie (1996) Socransky et Haffaje (2003) ont désigné *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) et *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) comme les principaux pathogènes des maladies parodontales répondant aux postulats de Koch revisités. Il existe bien d'autres bactéries que l'on peut rencontrer dans les maladies parodontales qui participent à un écosystème local d'un point de vue nutritionnel et de l'adhésion, mais dont le rôle pathogène n'a pas été retenu. Cependant, on peut tout de même considérer d'autres microorganismes comme étant des pathogènes potentiels, au vue de

la littérature abondante qui leur est consacrée : *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*), *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *Spirochètes*, *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) et *Campylobacter rectus*. Leur nombre varie selon les symptômes cliniques et les individus. Seule la parodontite juvénile localisée (aujourd'hui classée dans les parodontites agressives) est associée fortement avec *A. actinomycetemcomitans*, toutes les autres pathologies ont une flore qui varie. En période d'activité de la parodontite chronique de l'adulte, on retrouve plus particulièrement trois espèces: *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* et *P. intermedia* (AFSSAPS 2001).

3.2. Facteurs de colonisation

De nombreuses bactéries, pathogènes reconnus ou subodorés, ont la capacité d'envahir et de survivre à l'intérieur de cellules épithéliales et/ou endothéliales. Cependant, il existe un pré requis à cette colonisation, l'aptitude des microorganismes à adhérer.

Pour qu'un parodontopathogène provoque une maladie, il est essentiel que cette bactérie soit capable de coloniser la zone sous-gingivale et de produire des facteurs directement néfastes pour les tissus ou induisant une destruction tissulaire par l'hôte lui-même. Pour coloniser l'espace sous-gingivale, les bactéries doivent pouvoir adhérer à une ou plusieurs surfaces libres, puis se multiplier et combattre pour s'imposer dans un habitat où d'autres espèces désirent se développer, mais aussi se défendre contre le système immunitaire de l'hôte (Socransky et Haffaje, 2003).

3.2.1. Facteurs métaboliques

Le sillon gingivo-dentaire et/ou la poche parodontale peuvent être considéré comme une zone propice au développement des bactéries, mais c'est en fait un environnement austère. La température moyenne de cette zone est d'environ 35°C, cela élimine toutes les classes de colonisateurs potentiels tels que les bactéries thermophiles et psychrophiles. La zone de pH est plutôt restreinte et varie de 7.0 à 8.5 et empêche le développement de nombreuses espèces microbiennes. La mesure du potentiel d'oxydo-réduction (Eh) varie de -300 à +300 mv à pH 7.0. La moyenne d'Eh fournit un microenvironnement propice à de nombreuses bactéries, tandis que les extrêmes d'Eh sont moins favorables.

L'environnement physique sélectif du sillon gingivo-dentaire s'accompagne d'une disponibilité nutritionnelle limitée créant une compétition entre les espèces. Trois sources de nutriments sont accessibles aux bactéries sous-gingivales : l'alimentation, l'hôte et les autres espèces sous-gingivales. Certains nutriments essentiels pour certaines espèces doivent être

métabolisés par d'autres espèces présentes dans cette zone. D'autres substances comme les facteurs de croissance tels que l'hémine doivent être fournies par l'hôte.

3.2.2. Adhésines

La colonisation implique un accès à un site vulnérable suivi d'une multiplication sur ce site. La pénétration des germes pathogènes non motiles dans la poche parodontale est mal expliquée. Il est possible qu'elle soit due à la prolifération de la plaque dentaire supra-gingivale et que certains germes soient transportés dans l'espace sous-gingival par des micro-organismes motiles ou alors implantés par les forces masticatrices, par les mesures d'hygiène ou par l'utilisation d'instruments dentaires. L'aptitude d'une bactérie à investir une surface buccale dépend surtout de sa capacité à s'y fixer : le rôle de structures comme les fimbriae ou la capsule, ou des molécules telles que les adhésines est primordial.

Pour s'établir dans un site parodontal, les espèces doivent être capables de s'accrocher à une ou plusieurs surfaces : soit à la dent (ou des substances dérivées de l'hôte se liant à la dent), à l'épithélium sulculaire ou épithélium de poche, ou à d'autres bactéries attachées à ces surfaces. Cette adhésion est possible grâce à des interactions spécifiques de type ligand-récepteur. Le ligand bactérien correspond à une adhésine dont la plus connue est la lectine, protéine capable de se fixer à un sucre spécifique. Ainsi, les colonisateurs primaires, tels que *Streptocoque sanguis* peuvent adhérer à l'acide sialique, aux protéines riches en proline de la pellicule exogène acquise. *Actinomyces* spp., autre colonisateur primaire, présente deux types de fimbriae. La fimbriae de type 1 adhère à la stathérine, aux protéines riche en proline de la pellicule exogène acquise alors que le type 2 s'accroche aux cellules buccales épithéliales. Certaines adhésines de la surface bactérienne ont été identifiées sur des espèces sous-gingivales, au niveau des fimbriae. Une compétition entre ces deux genres bactériens existe pour coloniser la surface dentaire (Gracieux et al. 2006). *S. gordonii* dégrade les protéines riches en proline empêchant l'adhésion de *A. naeslundii*. Certaines molécules d'adhérence de l'organisme constituent des récepteurs pour les adhésines bactériennes. Celles-ci présentent des homologies de structure avec les protéines eucaryotes (Finlay et Falkow 1997).

Une autre forme d'interactions spécifiques est celle de type enzyme-substrat. *S. mutans* présente une enzyme intégrée à sa surface, la glycosyl-transférase, qui synthétise des polymères de type glycane en présence de saccharose. Ces glycanes sont fortement adhésifs à la surface dentaire et maintiennent la bactérie fixée (Gracieux et al. 2006).

3.2.3. Coagrégation

Certaines espèces adhèrent directement aux surfaces de l'hôte et permettent à d'autres espèces de s'accrocher sur elles. Ce phénomène est appelé la coagrégation. Des auteurs ont montré *in vitro* et *in vivo* qu'il existait une spécificité dans l'attachement d'une espèce à une autre. Le mécanisme d'adhésion des cellules pour une espèce donnée semble être médiée par des interactions spécifiques adhésine- récepteur. Ainsi les streptocoques peuvent présenter des co-agrégation bactériennes homotypiques (co-adhérence de streptocoque entre eux) et hétérotypiques (co-adhérence avec d'autres genres). Des lectines associées à des fimbriae de *A. naeslundii* adhèrent avec un polysaccharide de *S. sanguis*. Il a été montré que la même adhésine liant le galactose de *F. nucleatum* à *P. gingivalis* et à *A. actinomycetemcomitans* peut aussi accrocher les cellules épithéliales et les fibroblastes humains.

Ainsi, des colonisateurs primaires permettent à d'autres bactéries de s'accrocher à leur surface et conduisent à la formation d'un biofilm qui contient différents genres bactériens. *P. gingivalis* et *A. actinomycetemcomitans* adhèrent au niveau de récepteur membranaire de *F. nucleatum* qui joue le rôle de pont entre les colonisateurs primaires et tardifs.

3.2.4. Relations interbactériennes au sein du biofilm

Le biofilm se définit comme un film de microorganismes, d'une ou plusieurs espèces, adhérant à une surface submergée ou soumise à un environnement aqueux. Ces cellules microbiennes se développent dans une matrice formée de biopolymères, soit des polysides, des protéines et des acides nucléiques, excrétés par certains microorganismes à divers moments de leur cycle cellulaire. Cette matrice piège des nutriments et ainsi permet la survie et le développement des microorganismes. Au sein du biofilm, les microorganismes forment plusieurs couches successives résultant des affinités de co-adhésion des différentes bactéries entre elles. Le biofilm est une structure dynamique dont l'évolution varie selon les conditions physico-chimiques externes et les métabolismes bactériens. Celui-ci forme un environnement protecteur face aux facteurs physico-chimiques (variation de pH et O₂, déshydratation, fortes pressions osmotiques, actions d'agents anti-microbiens). Il favorise la coopération métabolique, l'échange de matériel génétique codant des facteurs de virulence mais aussi codant des résistances à des antibiotiques (Gracieux et al. 2006).

Les interactions bactériennes jouent un rôle important pour la survie des espèces. Certaines relations inter- espèces sont favorables, certaines bactéries fournissent des facteurs de croissance ou facilitent l'adhésion d'autres bactéries. D'autres relations sont antagonistes :

compétition des nutriments et des sites de liaison, production de substances limitant ou empêchant la croissance d'autres espèces.

- Rôle dans l'adhésion

De nombreux types d'interactions bactériennes sont décrits. L'attachement des bactéries peut être influencé par la production d'enzymes extracellulaires par un ensemble d'organismes qui découvrent des sites de liaison favorisant l'attachement d'un deuxième ensemble de bactéries. Par exemple, *S. mitis* et *S. sanguis* se lient en quantité égale aux cellules épithéliales, tout comme les souches *P. gingivalis* et *P. intermedia*. Cependant, *P. gingivalis* et *P. intermedia* secrètent une neuraminidase qui dégrade l'acide sialique des cellules épithéliales et révèle des résidus galactosyl favorable à l'adhésion de ces pathogènes aux dépens de celle des streptococci. Ce mécanisme permet d'expliquer que ces pathogènes sont en plus grande quantité dans les poches parodontales que dans les sulci sains.

- Rôle dans le métabolisme bactérien

D'autres interactions bénéfiques sont favorisées par des espèces fournissant des conditions de croissance favorables à d'autres. De telles conditions incluent les paramètres physico-chimiques altérés tels que l'Eh, température, pH. Un des paramètres environnementaux le plus important est l'oxygène. Les espèces sous-gingivales ont des capacités différentes de croître avec ou sans oxygène (les bactéries aérobies ont besoin d'oxygène, les anaérobies sont détruites par une très faible quantité d'oxygène, tandis que les facultatives peuvent survivre dans les deux situations). La plaque dentaire fournit divers environnements. A l'extérieur de celle-ci, et au niveau des tissus parodontaux sains, le niveau d'oxygène disponible est important. En revanche à l'intérieur de la plaque et au sein des poches parodontales, la quantité d'oxygène et le potentiel d'oxydoréduction sont faibles. Ces différences d'environnement sont dues d'une part à la localisation dans la poche parodontale et d'autre part à la capacité de réduction de nombreuses espèces sous-gingivales, mais aussi au phénomène de biofilm qui permet de créer des gradients d'oxygène différents (zone d'aérobiose à l'extérieur et d'anaérobiose à l'intérieur). La survie de certaines espèces anaérobies est possible grâce à la présence d'espèces aérobies ou facultatives qui utilisent l'oxygène. Les espèces sous-gingivales fournissent aussi des facteurs de croissance incluant des chaînes branchées d'acides gras, des polyamines, des analogues de vitamine K, du lactate, du formate ou de l'hydrogène, qui sont utilisés

par d'autres espèces. La co-agrégation favorise les échanges nutritionnels et métaboliques. Le genre *Veillonella* peut utiliser comme source de carbone les acides lactiques fournis par les streptocoques et les actinomyces. L'utilisation de cet acide par *Veillonella* permet de produire de la vitamine K ou ménadione nécessaires à la croissance de bactéries à gram négatif telles que *P. gingivalis*.

En plus des interactions conventionnelles, les bactéries communiquent les unes avec les autres par le biais de molécules diffusibles qui informent celles-ci de la densité cellulaire. Ce système appelé « Quorum sensing » est considéré comme un mécanisme de régulation dans l'adaptation écologique et dans la pathogénicité. Les molécules responsables du quorum sensing sont des « auto-inducers » (AI) qui diffusent à travers l'enveloppe bactérienne et quand elles atteignent un certain seuil, elles provoquent l'activation de régulateurs transcriptionnels déclenchant l'expression de gènes cibles. Le biofilm favorise ce quorum sensing car il permet la concentration au sein de la matrice de ces AI. Ainsi, l'exposition de *S. gordinii* à la salive stimule l'expression de gène codant pour des adhésines qui se lient à des glycoprotéines salivaires (Dû et Kolenbrander, 2000). Le quorum sensing régule aussi la tolérance à l'acide de *S. mutans* par expression de gène codant pour une CSP (Competence Stimulating Peptide). En cas de pH bas, cette bactérie excrète des CSP qui initient une réponse protectrice pour lutter contre l'acidité (Li et al. 2002). L'étude du quorum sensing présent au niveau des biofilms buccaux est récente et reste largement inexploree.

La colonisation des espèces pathogènes en présence d'espèces productrices de substances antagonistes à leur survie induit une compétition. Les substances antagonistes sont différentes des substances affectant l'adhérence et de celles qui tuent les espèces. Les substances qui détruisent les microorganismes sont des bactériocines, H₂O₂ et des acides organiques. Ces facteurs peuvent être considérés comme des facteurs de virulence dès lors qu'ils suppriment la croissance des espèces en compétition ou de divers types de clones d'une même espèce. Il existe plusieurs systèmes de défenses contre ces facteurs :

1. la colonisation de sites où il n'y a pas d'espèces antagonistes,
2. la production de facteurs qui détruisent les espèces antagonistes. Par exemple, *S. sanguis* produit H₂O₂ qui inhibe la croissance d'*A. actinomycetemcomitans*, pendant que *A. actinomycetemcomitans* synthétise une bactériocine qui inhibe *S. sanguis* (Socransky et Haffaje, 2003).

3.3. Facteurs de virulence

Certaines bactéries anaérobies à Gram négatif possèdent de nombreux facteurs de virulence : capacité de dégrader les tissus parodontaux, d'envahir les tissus et les cellules, et de favoriser une réponse destructrice de l'hôte. Ces différents facteurs jouent un rôle majeur dans l'apparition et le développement de la maladie parodontale.

3.3.1. Facteurs de destruction tissulaire : enzymes et autres facteurs

De nombreuses molécules issues du métabolisme bactérien (H_2S , NH_3 , acides gras ou indole...) sont capables d'affecter la croissance et/ou le métabolisme des cellules mammaliennes en culture (Van Steenberg et al. 1983). L' H_2S peut induire une apoptose et causer des dégradations de l'ADN des cellules épithéliales (Calenic et al. 2009). De nombreuses bactéries produisent des métabolites cytotoxiques pour les fibroblastes tels que l'ammoniaque, les amines et les composés sulfurés volatils. Le lipopolysaccharide de surface des bactéries à Gram négatif a la capacité, démontrée *in vitro*, d'induire une résorption osseuse (Yip et al. 2004).

P. gingivalis, *T. denticola* et *T. forsythia* possèdent un fort pouvoir protéolytique qui joue de multiples rôles dans la pathogenèse des parodontites. En effet, les protéases produites par ces bactéries sont impliquées dans l'adhérence, la nutrition (Kadowaki et al. 2000) et la dissémination des microorganismes, mais participent également à la perturbation des défenses de l'hôte et à la destruction des tissus parodontaux. *P. gingivalis* est une des bactéries parodontopathogènes qui possède le plus grand pouvoir protéolytique grâce à trois cystéines protéases (gingipaines).

- *P. gingivalis* produit des collagénases dégradant le collagène de type I, constituant majeur du tissu conjonctif gingival (Imamura 2003). Les gingipaines de *P. gingivalis* et la dentilisine de *T. denticola* dégradent de nombreux composants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (MEC) comme le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine.
- Les gingipaines peuvent cliver le syndécane-1 qui est exprimé à la surface des cellules épithéliales gingivales et est un corécepteur de différentes molécules de croissance et de ligands permettant l'adhésion de ces cellules à la matrice extracellulaire. *P. gingivalis* et *T. denticola* secrètent des protéinases qui dégradent les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales affectant la perméabilité de la barrière épithéliale. Ces deux phénomènes provoquent une désorganisation du tissu gingival et

favorisent de ce fait la dissémination des bactéries dans les tissus plus profonds (Andrian et al. 2006 ; Katz et al. 2000).

- *P. gingivalis* et *T. denticola* dégradent de nombreux inhibiteurs des protéases de l'hôte (α 1-antitrypsine, antichymotrypsine, α 2-macroglobuline, antithrombine III, antiplasmine et cystatine) dont la fonction est de réguler l'activité d'enzymes protéolytiques de la réponse inflammatoire. *P. gingivalis* active le plasminogène en plasmine, enzyme qui dégrade certains composants de la MEC (laminine et fibronectine) et qui activent des métalloprotéinases matricielles (MMP). Tous ces facteurs concourent à une destruction non contrôlée des tissus parodontaux et interfèrent avec la réparation des tissus détruits. De plus, les collagénases de l'hôte, impliquées dans le "turnover" physiologique des tissus, se mêlent à celles d'origine bactérienne et renforcent les dommages tissulaires (Bodet et al. 2007).

3.3.2. Pouvoir invasif

Le pouvoir d'invasion de bactéries parodontales dans des cellules non phagocytaires professionnelles a été découvert dans les années 1990. Les bactéries dont on a pu détecter la présence dans les cellules épithéliales sont des microorganismes anaérobies à Gram négatif : *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* et *T. forsythia*. Cette internalisation permet à certains d'entre eux de survivre à l'intérieur des cellules hôtes et pour d'autres de s'y multiplier; ces microorganismes profitent ainsi d'un apport nutritionnel et échappent non seulement aux mécanismes de défense de l'hôte (anticorps et système du complément), mais aussi à l'action de certains antibiotiques qui diffusent peu ou pas dans les cellules. Cet aspect de la virulence bactérienne joue un rôle important dans la pathogénicité de la parodontite et peut expliquer la survenue de parodontites ne répondant pas aux thérapeutiques habituelles. En effet, les microorganismes internalisés représentent un réservoir bactérien à l'origine de la recolonisation des poches parodontales non cicatrisées après traitement.

Après une rapide présentation des modèles d'invasion classiques et d'un mécanisme d'internalisation dépendant des microtubules, nous détaillerons plus particulièrement le pouvoir invasif de *A. actinomycetemcomitans* et de *P. gingivalis*.

3.3.2.1. Mécanismes généraux

Pour coloniser le corps humain, les pathogènes opportunistes doivent attendre l'apparition d'une lésion ou d'une brèche au niveau de certaines niches (peau, nez, cavité buccale et tractus intestinal), mais certains pathogènes ont développé des mécanismes permettant leur entrée à l'intérieur de celles-ci.

Il existe deux mécanismes reconnus par lesquels les bactéries pathogènes induisent leur internalisation dans des cellules épithéliales et dans d'autres cellules non phagocytaires. Il s'agit des mécanismes « zipper » ou « trigger ». L'ensemble de ces mécanismes est dépendant de l'actine et nécessite que la bactérie extracellulaire provoque une polymérisation et une réorganisation des filaments d'actine de la membrane plasmique. Dans les deux cas, la bactérie manipule la transduction du signal de la cellule hôte pour induire des réponses du cytosquelette similaires à celles occasionnées lors des réponses à des stimuli naturels. Le mécanisme « zipper » exploite la voie normale impliquant l'adhérence cellulaire et la motilité, tandis que le mécanisme « trigger » ressemble à la réponse dans laquelle il y a un renflement membranaire provoqué par les facteurs de croissance de la cellule eucaryote (fig. 3).

- **Le mécanisme « zipper ».**

Listeria monocytogenes et des bactéries appartenant au genre *Yersinia* sont capables d'envahir de nombreuses cellules en utilisant le mécanisme « zipper ». Ce terme fait référence à la capacité de la bactérie à induire des modifications locales dans l'organisation de l'actine qui résulte en une apposition rapprochée de la bactérie à la membrane plasmique de l'hôte. La bactérie semble creuser dans la cellule, ou pousser la membrane plasmique autour d'elle, par un processus qui n'implique pas la formation d'un renflement membranaire comme le mécanisme d'internalisation « trigger » et ne semble pas avoir besoin d'un réarrangement local de l'actine du cytosquelette (Cossart et al. 2005) (fig. 4).

Ces bactéries sont capables d'exploiter des mécanismes physiologiques impliqués dans l'adhésion de la cellule hôte ou de la motilité cellulaire. Les cadhérines (récepteur pour InlA de *Listeria*) et les intégrines (récepteurs pour l'invasine de *Yersinia*) sont des récepteurs qui permettent l'attachement des cellules épithéliales entre elles, leur déploiement vers leur voisine et sur la matrice extra-cellulaire sous-jacente. L'engagement de ces récepteurs avec leurs ligands normaux induit une cascade de signaux qui provoque un renforcement des contacts cellules-cellules et cellules-matrice, et une différenciation cellulaire. Quand la protéine de surface bactérienne se fixe sur une protéine d'adhérence de la cellule hôte, cette cellule répond de la même manière par un recrutement des éléments du cytosquelette au

niveau de la zone d'adhérence et essaie de renforcer son attachement. Néanmoins, comme la bactérie est plus petite que la cellule stimulée, celle-ci tente de se déployer rapidement contre la surface bactérienne qui finalement l'enveloppe.

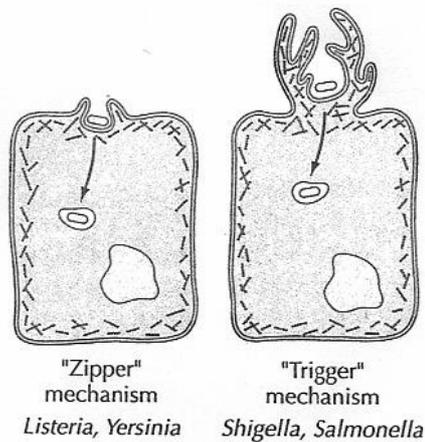


Figure 3. Mécanismes d'internalisation généraux dits « Trigger » et « Zipper ». (Cossart et al. 2005).

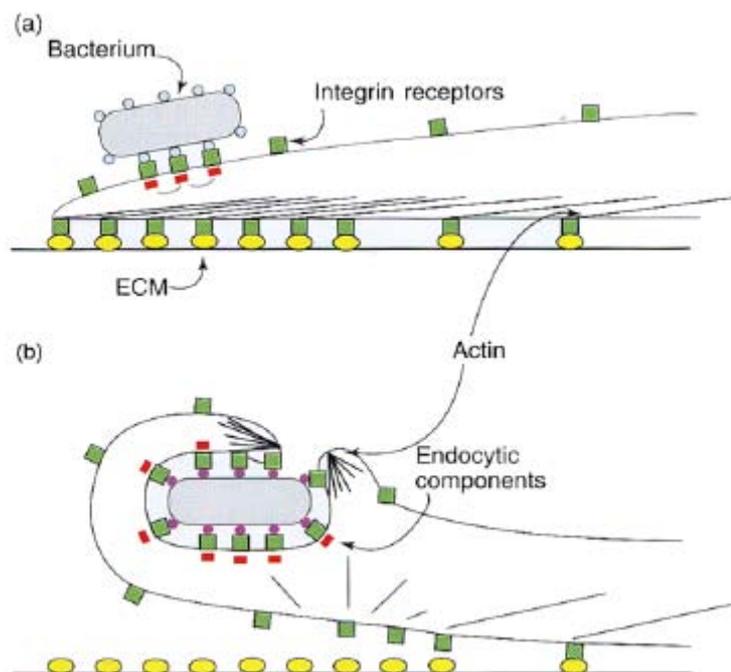


Figure 4. Modèle d'internalisation bactérienne via des intégrines.

(a) Les cellules mammaliennes adhérentes présentent un nombre de récepteurs insuffisant pour permettre l'internalisation de bactéries car la plupart des intégrines sont liées à la matrice extra cellulaire. Les bactéries restent liées à la surface de la cellule eucaryote dans la limite de récepteurs disponibles. (b) Quand la bactérie occupe suffisamment de récepteurs, une internalisation commence. Le contact entre le cytosquelette et les intégrines est rompu, permettant aux facteurs d'endocytose de concentrer les récepteurs au niveau du site de contact avec la bactérie. La réorganisation du cytosquelette permet de regrouper les microfilaments d'actine au niveau du phagosome naissant autour de la surface bactérienne (Isberg et al. 1995).

- **Le mécanisme « trigger ».**

Les pathogènes les plus étudiés utilisant le mécanisme « trigger » appartiennent aux genres *Salmonella* et *Shigella*. Ces entérobactéries contournent les voies classiques d'activation, par la stimulation de récepteurs de surface, et interfèrent directement avec la machinerie cellulaire qui régule la dynamique de l'actine et la fonction d'adhésion moléculaire. Le mécanisme « trigger » est très différent du mécanisme « zipper » d'un point de vue morphologique et de part la nécessité d'une machinerie bactérienne plus complexe. Un bref contact entre la bactérie et la surface de la cellule hôte résulte en une réponse du cytosquelette rapide et très large où la polymérisation des filaments d'actine sous la membrane plasmique forme un énorme bourrelet qui fuse et se rabat en arrière de la surface cellulaire. Après fusion des membranes, ces bactéries se retrouvent dans une vacuole spécialisée qui est suffisamment hospitalière pour permettre leur réplication. Les cellules hôtes leur fournissent un environnement protecteur riche en nutriments. Grâce à un organe spécial nommé système de sécrétion de type III, ces bactéries injectent, après avoir transpercé la membrane des cellules hôte, de nombreuses protéines effectrices à l'intérieur du cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, ces protéines ont des cibles spécifiques qui ensemble induisent un réarrangement massif du cytosquelette nécessaire à l'internalisation de la bactérie par renflement membranaire. Ces protéines injectées qui n'ont pas de séquences similaires avec les composants de l'hôte, trompent la cellule en exploitant des similarités de structure avec des molécules ayant des fonctions physiologiques telles que les facteurs de croissance.

Les réarrangements de la membrane et du cytosquelette permettant l'entrée de la bactérie, par le mécanisme « zipper » ou « trigger », ne nécessitent pas de consommation d'énergie issue de la bactérie.

3.3.2.2. Autre mécanisme : exemple de *Campylobacter jejuni*

L'invasion des cellules épithéliales par *C. jejuni* a été longuement étudiée et nécessite la polymérisation des microfilaments d'actine et/ou des microtubules. En 1993, Oelschlaeger et al. ont montré que l'invasion d'une souche particulière de *C. jejuni*, la souche 81-176 (responsable de colite inflammatoire) dans des cellules intestinales humaines nécessitait des microtubules intacts, mais n'était pas affecté par la dépolymérisation spécifique des microfilaments d'actine. L'hypothèse de l'existence d'un mécanisme d'internalisation strictement dépendant de la polymérisation des microtubules fut confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs interférant avec la polymérisation des microtubules au niveau de différents sites (colchicine, demecolcine, nocodazole, orthovanadate, vincristine ou vinblastine). Tous ces

inhibiteurs induisent une réduction de 90% de l'internalisation de *C. jejuni* 81-179. L'influence des microtubules dans l'internalisation de *C. jejuni* 81-176 a été confirmée par l'existence d'une forte association, visualisée par microscopie à fluorescence, entre cette bactérie, tout au long de son processus d'internalisation, et les microtubules (Hu et Kopecko, 1999). Il semble que *C. jejuni* interagisse avec la cellule hôte au niveau de protrusions «finger-like» créées par une réorganisation locale du cytosquelette de la cellule hôte (dépolymérisation des microfilaments d'actine et formation de projections membranaires sous le contrôle des microtubules) en réponse à des signaux de *C. jejuni* 81-179. Bacon et al. (2000) ont montré que des gènes codant un système de sécrétion de type IV, portés par un plasmide, sont nécessaires à l'invasion de *C. jejuni* 81-179, indiquant que ce système de sécrétion pourrait être un acteur de ce mécanisme d'invasion microtubule-dépendant (Konkel et al. 1992). Après internalisation, cette bactérie reste dans une vacuole qui se déplace à l'intérieur du cytoplasme le long des microtubules.

3.3.2.3. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Le potentiel invasif de cette bactérie a été mis en évidence dans les cellules épithéliales non phagocytaires par Meyer et al. (1991). Selon ces auteurs (1996), *A. actinomycetemcomitans* s'internalise dans les cellules par un processus dynamique. L'invasion de cette bactérie débute par l'attachement d'adhésines fimbriales (Finlay. 1990), identifiées comme étant l'Omp100 (Outer Membrane Protein 100) pour *A. actinomycetemcomitans* Y4 (Asakawa et al. 2003), au récepteur de la transferrine ou à des intégrines de la cellule eucaryote (Fives-Taylor et al. 1999, Meyer et al. 1997, Sreenivasan et al. 1993). La liaison du récepteur et de son ligand provoque l'effacement des microvillosités et l'entrée de la bactérie. Cette invasion est un processus actif qui nécessite la synthèse de nouvelles protéines issues tant de la bactérie que de la cellule (Fives-Taylor et al. 1995). A l'exception de la souche *A. actinomycetemcomitans* SUNY 523, dont l'internalisation est dépendante de la polymérisation des microtubules (Brissette et al. 1999), la plupart de ces bactéries envahissent les cellules par un mécanisme mettant en jeu la polymérisation des microfilaments d'actine. Ces microfilaments se transloquent de la périphérie de la cellule au point focal entourant la bactérie (Fives-Taylor et al. 1995). Les bactéries intracellulaires sont initialement confinées dans une vacuole dont elles s'échappent rapidement (après destruction de la membrane par une hypothétique phospholipase C) et résident dans le cytoplasme où elles se multiplient. La propagation de ces bactéries d'une cellule épithéliale à une autre s'effectue par transcytose au niveau des protrusions membranaires de deux cellules voisines

(Meyer et al. 1996). Ces protrusions membranaires se forment après interaction bactérienne avec les terminaisons des microtubules (fig. 5).

3.3.2.4. *Porphyromonas gingivalis*

Il a été montré que *P. gingivalis* était capable d'envahir les cellules épithéliales buccales et les cellules endothéliales (Lamont et al. 1992, Duncan et al. 1993; Sandros et al. 1994, Lamont et al. 1995, Dorn et al. 2000; Amornchat et al. 2003). Pour déclencher le processus d'internalisation, un contact intime par une adhérence spécifique entre *P. gingivalis* et la surface épithéliale est nécessaire. L'adhérence de cette bactérie aux récepteurs membranaires épithéliaux est multimodale. Cette bactérie adhère aux récepteurs épithéliaux (intégrine β_1 , sucres) par le biais d'adhésines fimbriales, d'hémagglutinines et de protéinases (Weinberg et al. 1997; Yilmaz et al. 2002, Hellström et al. 2004, Lamont et Jenkinson 2000, Chen et al. 2001). Ces protéinases trypsine-like, appelées gingipaines, ont la capacité d'exposer des récepteurs exposant des récepteurs cryptiques de l'hôte (Andrian et al. 2006).

L'internalisation de *P. gingivalis* est à la fois dépendante de la polymérisation des microtubules et de celle des microfilaments d'actine, favorisée par la formation de protéines d'adhésion focale du cytosquelette, elle-même stimulée par l'interaction entre les adhésines et les intégrines (Clark et Brugge, 1995). De nombreuses études ont montré que *P. gingivalis* survit et se multiplie dans des cellules épithéliales *in vitro*. Les bactéries semblent rester viables après internalisation (Houalet-Jeanne et al. 2001). Pour se protéger de la fusion lysosomiale, *P. gingivalis* inhibe la pompe à proton, afin d'empêcher une acidification de la vacuole, ou possède des mécanismes qui lui permettent de survivre dans un environnement avec un pH bas.

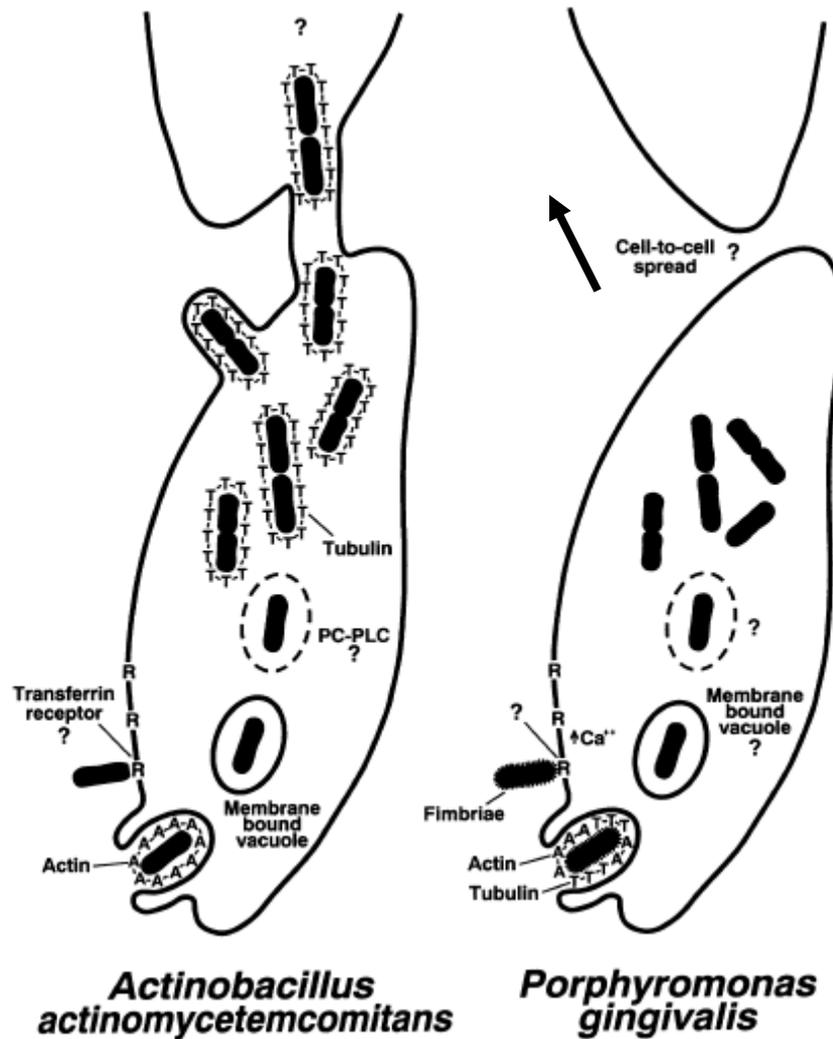


Figure 5. Modèle schématique des interactions d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anciennement *Actinobacillus*) et de *Porphyromonas gingivalis* avec les cellules épithéliales (Meyer et Fives-Taylor, 1997). R, récepteur ; T, tubuline, A, microfilaments d'Actine, PC-PLC, phosphatidylcholine- phospholipase C.

Les études en microscopie montrent *P. gingivalis* inclus dans une vacuole cytoplasmique ou libre dans le cytosol. Les formes intracytoplasmiques résultent de leur libération des vacuoles d'endocytose après dégradation de la membrane de ces vacuoles par l'hémolysine bactérienne (Deshpande et al. 1998). La translocation intercellulaire de *P. gingivalis* s'effectue par relargage de bactéries au niveau de protrusions (créées par remodelage de l'actine) dans le milieu extracellulaire suivi de l'envahissement des cellules épithéliales voisines (Li et al. 2008; Yilmaz et al. 2006) (fig. 5).

Les mécanismes impliqués dans l'internalisation et le devenir intracellulaire de *P. gingivalis* dans les cellules non phagocytaires peuvent varier selon la nature des cellules infectées. Ceci pourrait expliquer, au moins en partie, le fait que dans les cellules endothéliales, à l'inverse de ce qui est observé dans les cellules épithéliales primaires envahies, *P. gingivalis* persiste au sein d'autophagosomes et peut s'y multiplier (Dorn et al. 1999, 2001).

3.3.2.5. *Fusobacterium nucleatum* et autres bactéries parodontales

- ***Fusobacterium nucleatum***

D'après Han et al. (2000), *F. nucleatum* semble avoir un pouvoir invasif aussi important que *P. gingivalis*. Le mécanisme de type "zipper" est utilisé par *F. nucleatum* pour s'internaliser dans les cellules épithéliales primaires et dans les cellules KB. L'adhérence de *F. nucleatum* (*F. nucleatum* 12230) était du au moins en partie à la fixation de lectines aux récepteurs galactosiques des cellules KB. D'autres adhésines semblent également impliquées dans les interactions de *F. nucleatum* avec les cellules hôte. L'internalisation de cette bactérie nécessite des réarrangements des microfilaments d'actine et des microtubules de l'hôte, et dépend également de la synthèse des protéines par la cellule épithéliale et le *F. nucleatum*.

Récemment, il a été montré que *F. nucleatum* permet à des souches non invasives, telle que *Streptococcus cristatus*, de pénétrer dans des cellules épithéliales (Edwards et al. 2006). Un phénomène similaire a été rapporté pour *P. gingivalis* qui augmente le pouvoir invasif de bactéries faiblement internalisées telles que *Tannerella forsythia* (Inagaki et al. 2006). De même, il a été mis en évidence que *F. nucleatum* favorisait l'internalisation de *P. gingivalis* dans un modèle de culture cellulaire (Saito et al. 2008).

- **Autres bactéries parodontales**

D'autres parodontopathogènes potentiels sont décrits comme étant capables d'envahir des cellules épithéliales et d'autres cellules non phagocytaires. Ainsi *Eikenella corrodens* et *Prevotella intermedia* ont été observés à l'intérieur de cellules épithéliales primaires, ainsi que dans les cellules endothéliales et musculaires lisses d'artères coronaires humaines (Dorn et al. 1999, Han et al. 2000). *Bacteroides forsythus*, aujourd'hui appelé *Tannerella forsythia* a la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales (Rudney et al. 2005) mais son pouvoir invasif semble inférieur à celui de *P. gingivalis* 381 (Han et al. 2000).

3.3.3. Autres facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte

Les bactéries parodontales ont à leur disposition un ensemble de moyens leur permettant de contourner les barrières de protection et de systèmes de défenses locales que leur oppose l'hôte infecté. En établissant un rapide répertoire des éléments de la défense antimicrobienne dans l'espace gingivo-dentaire, il est possible d'obtenir un aperçu des facteurs bactériens destinés à les contrer.

- L'épithélium du sillon gingivo-dentaire est fragile de par sa faible épaisseur et de l'absence de kératinisation, l'épithélium de jonction en est la zone la plus vulnérable. Cet épithélium, facilement perméable aux bactéries et à leurs produits, permet de par sa desquamation régulière d'évacuer le plus grand nombre des bactéries fixées à sa surface. Mais certains microorganismes, tels que *P. gingivalis* et *F.nucleatum*. sont capables de se fixer aux cellules et tissus sous-jacents à l'épithélium et ainsi adhérer à la membrane basale, au collagène (type IV et I) et aux fibroblastes du tissu conjonctif (Amano 2003). Par contre la surface dentaire de l'espace gingivo-dentaire (émail, dentine ou cément) est non desquamante, et ne permet pas l'élimination des bactéries qui y sont fixées, cependant certaines bactéries sont capables de pénétrer dans les tubuli dentinaires.
- Les espèces bactériennes doivent surmonter le flux continu de salive et de fluide gingivo- crévulaire, ainsi que le frottement mécanique des joues lors de l'élocution et la mastication. Des substances présentes dans la salive et le fluide gingivo-crévulaire peuvent prévenir la colonisation en bloquant la liaison des cellules bactériennes aux surfaces mammaliennes : ce sont des molécules salivaires telles que les agglutinines et les IgA sécrétoires. *P. gingivalis* secrète une protéase capable de dégrader les IgA. Cependant, les défenses salivaires ne sont efficaces qu'à l'entrée de l'espace gingivo-dentaire, et l'effet de lavage n'est possible que sur des bactéries non fixées. Des substances bactéricides issues de la salive telles que le lysozyme et la lactoferrine, sont inhibées par certaines bactéries.
- Les protéases des bactéries parodontopathogènes (gingipaines de *P. gingivalis* et dentilisine de *T. denticola*) possèdent la capacité de dégrader les immunoglobulines, certains récepteurs membranaires, les protéines du complément, les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , TNF α et l'IL-6 et les chimiokines telles que l'IL-8 et le RANTES (Imamura, 2003; Miyamoto et al. 2006; Sela, 2001). La dégradation des cytokines induit une perturbation des réactions inflammatoires locales et une diminution du gradient de chimiokines qui en conséquence limite l'afflux des

leucocytes vers le site infecté. En effet, la dégradation de l'IL-8 par les protéases bactériennes ne permet pas la sortie du lit vasculaire des leucocytes circulants (non expression d'intégrine), et ne permet pas de guider la migration des neutrophiles vers le site infecté (absence d'un gradient de concentration de cette chimiokine dans les tissus). Les IgA, IgG et IgM sont dégradées par certaines bactéries (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. melanogenica* et *Capnocytophaga*) qui échappent ainsi à l'opsonisation et à la phagocytose par les cellules phagocytaires. Cette opsonisation est d'autant plus inefficace que le facteur C3 est aussi décomposé par les enzymes bactériennes. *P. gingivalis* inactive le récepteur de la protéine C5a exprimé à la surface des polynucléaires neutrophiles (Jagels et al. 1996). La destruction de ce récepteur empêche la reconnaissance du facteur C5a par le polynucléaire neutrophile et empêche la migration de celui-ci vers le site lésé. Cette migration est d'autant plus compromise que les protéases de *P. gingivalis* dégradent le facteur C5 (Discipio et al. 1996). D'autres espèces sont capables d'évincer les anticorps en modifiant leur antigène de surface, ou en copiant les antigènes de l'hôte.

- Les leucocytes participent activement à la réponse de l'hôte face à la colonisation bactérienne. Les polymorphonucléaires neutralisent les espèces sous-gingivales par deux voies: en phagocytant et en détruisant les bactéries ou en excréant leurs enzymes lysosomiales dans le sillon gingivo-dentaire ou dans la poche. L'inhibition du fonctionnement des polynucléaires neutrophiles et la neutralisation des enzymes lysosomiales par les bactéries permettent de contourner ces effets. *A. actinomycetemcomitans* secrète deux types d'exotoxine. Une leucotoxine qui inhibe les fonctions des polynucléaires neutrophiles et détruit les cellules B et T matures, et la « Cytoléthale distending toxin » qui empêche l'activité des lymphocytes par arrêt de leur cycle cellulaire (Venketaraman et al. 2008). *T. forsythia* produit aussi une cytotoxine qui provoque l'apoptose des lymphocytes. *P. gingivalis* synthétise une capsule pour se protéger de la phagocytose. Les cellules phagocytaires détruisent moins efficacement les bactéries internalisées, par le mécanisme oxygène-dépendant. La production bactérienne de catalase et de superoxyde dismutase rend inactif le peroxyde d'hydrogène et les anions superoxydes fabriqués par les polynucléaires neutrophiles, et permet ainsi à certaines bactéries comme *Treponema denticola* et *Desulfovibrio desulfuricans* d'échapper à la bactériolyse (Gainet et al. 1999 ; Davydova et al. 2003). L'H₂S produit par les bactéries sulfato-réductrices est capable de casser le pont disulfure intra-chaîne de C3bi. De ce fait, l'adhésion de cette protéine

sur les bactéries est limitée ce qui empêche l'opsonisation du microorganisme (Granlund- Edstedt et al. 1993) (Nisengard et al. 2006).

3.3.4. Facteurs induisant un dysfonctionnement de la réponse de l'hôte

L'accumulation bactérienne au niveau de la gencive concourt à déclencher une réponse inflammatoire qui met en jeu des mécanismes de défense anti-infectieuse par stimulation de l'immunité naturelle puis de l'immunité spécifique. Les cellules de l'immunité en association avec les cellules résidentes (fibroblastes, cellules épithéliales) génèrent une production excessive de cytokines, de prostaglandines et de MMP en réponse à la stimulation continue provoquée par les bactéries parodontales. L'immunité innée ne parvenant pas à contrôler les bactéries, l'immunité spécifique se met en place avec la synthèse d'Anticorps spécifiques et une réponse à médiation cellulaire se développe. Les bactéries utilisent les mêmes systèmes d'échappement aux défenses de l'hôte que précédemment décrits. Les bactéries n'étant pas neutralisées, la stimulation des processus inflammatoires perdure et induit des destructions cellulaires et tissulaires de plus en plus sévères.

- Les molécules pro-inflammatoires et les enzymes
 - La destruction tissulaire observée au cours des parodontites est liée à un processus inflammatoire chronique du parodonte qui implique de nombreuses cytokines telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et le TNF α . Certaines bactéries parodontopathogènes (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum*, *E.corrodens*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*) sont capables d'induire la production de différentes cytokines dans un modèle de culture de cellules épithéliales et de macrophages (Bodet et al. 2006 ; Hasegawa et al. 2007, Nisengard et al. 2006) (Tableau 3). L'IL-6 agit sur la croissance et la maturation des lymphocytes B et la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques, et stimule la formation des ostéoclastes. Le blocage du récepteur de l'IL-6 permet de limiter la destruction osseuse (Axmann et al. 2009). L'IL-1 et le TNF α agissent en synergie avec l'IL-6 dans l'induction de la synthèse des protéines de l'inflammation. Une production excessive d'IL-1 β pourrait jouer un rôle clé dans la pathogénèse des parodontites car cette cytokine exerce des effets pléiotropiques sur de nombreuses lignées cellulaires en induisant la production de récepteurs cellulaires, ainsi que la synthèse d'autres cytokines, de

prostaglandines E₂, de MMP et de molécules activatrices du plasminogène; favorisant ainsi le processus inflammatoire et la destruction du tissu osseux.

Tableau 3. Capacité de différentes bactéries à stimuler la synthèse de diverses cytokines par divers types cellulaires (Nisengard et al. 2006).

Type de cytokines induites	Espèces bactériennes	Cellules hôtes
IL-1	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> <i>F. nucleatum</i> <i>P. gingivalis</i>	PMN, macrophages PMN Monocytes
IL-6	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> <i>C. rectus</i> <i>E. corrodens</i>	Macrophages, fibroblastes Fibroblastes Cellules épithéliales
IL-8	<i>A. Actinomycetemcomitans</i> <i>C. rectus</i> <i>E. corrodens</i> <i>F. nucleatum</i>	Cellules épithéliales, fibroblastes Fibroblastes Cellules épithéliales Cellules épithéliales

- La Prostaglandine E₂ est un puissant inducteur de la résorption osseuse. Cette molécule est produite après stimulation par l'IL-1 mais aussi par différentes bactéries parodontopathogènes comme cela a été démontré dans des modèles de culture cellulaire in vitro (Choi et al. 2005). Cette molécule induit directement et indirectement, via la stimulation des MMP, une destruction de l'os par activation des ostéoclastes.
- Les MMP jouent un rôle important dans les destructions tissulaires et osseuses. Ces enzymes sont des endopeptidases qui sont capables de dégrader la quasi-totalité des composants de la matrice extra-cellulaire. Chez les sujets sains, les MMP participent à l'homéostasie du tissu conjonctif qui est en constant remaniement. La production des MMP est sous le contrôle de cytokines, de la PGE₂ et de la plasmine (molécule qui active les MMP par clivage protéolytique). Mais, dans des conditions pathologiques, ces enzymes sont suractivées du fait de la production excessive de tous les facteurs pré-cités induite par les bactéries.

- La libération des facteurs inflammatoires en masse attire les neutrophiles dans les sites infectés. Ces cellules phagocytaires ne peuvent neutraliser les bactéries grâce à différentes stratégies développées par celles-ci. Les bactéries parodontales échappent à l'opsonisation par les PMN et les macrophages (dégradation du C3bi, des IgG,...), à la phagocytose (capsule) et à la destruction par des enzymes lysosomiales ou par des mécanismes oxygène-dépendants (superoxyde dismutase) (cf paragraphe « Facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte »).
- Les bactéries échappant aux cellules phagocytaires, s'accumulent pour atteindre un seuil quantitatif, pendant un temps suffisant, qui déclenche une réponse immunitaire adaptative. Les cellules T naïves sont activées suite à la reconnaissance de fragments peptidiques bactériens ancrés à la surface des cellules présentatrices d'antigène (macrophages, lymphocytes B). L'expansion clonale et la différenciation des cellules T naïves aboutissent à la production de deux types de cellules effectrices : Th1 et Th2 (T helper 1 et 2). Les Th1 conditionnent la mise en place d'une immunité à médiation cellulaire (activation des monocytes/macrophages, cellules NK, cellules T CD8 cytotoxiques). Tandis que les Th2 après coopération avec les cellules B, favorisent la production d'anticorps spécifiques. Dans le cas d'une réponse Th1, les mêmes mécanismes d'échappement que précédemment décrits sont exploités par les bactéries. Dans le cas d'une réponse à médiation humorale, les Ig spécifiques aux bactéries qui colonisent les tissus présentent dans certains cas, une faible avidité pour celles-ci. Certains microorganismes sont capables de produire des enzymes dégradant les Ig. D'autres ont des leucotoxines inhibant les lymphocytes (cf paragraphe : « Facteurs d'échappement aux défenses de l'hôte »).
- Les agents agresseurs ne sont jamais totalement éliminés par les PMN. Les produits de dégradation étant continuellement renouvelé, de par la présence des microorganismes, leur détersion par les macrophages ne peut s'effectuer. La phase de cicatrisation et de réparation ne peut être déclenchée. Les phénomènes inflammatoires et la stimulation de l'immunité sont entretenus et conduisent à une dégradation toujours plus importante des tissus parodontaux du fait des dysfonctionnements de la réponse immunitaire et de la balance enzymes-inhibiteurs enzymatiques.

II. *DESULFOVIBRIO* spp.

1. Taxonomie

Le genre *Desulfovibrio* forme avec les genres *Bilophila* et *Lawsonia* la famille des *Desulfovibrionaceae*, qui est placée dans l'ordre des *Desulfovibrionales*, classe des δ *Proteobacteria*, phylum des *Proteobacteria*, domaine des *Eubacteria* (Hensyl, 1994)

Au sein de la famille des *Desulfovibrionaceae*, qui comprend des bactéries mésophiles et oxydant de manière incomplète les substrats organiques pour donner de l'acétate, les espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* se caractérisent par leur capacité à utiliser les sulfates comme accepteurs d'électrons et par le fait qu'elles synthétisent, de même que *Bilophila wadsworthia*, unique espèce du genre *Bilophila*, une désulfovirdine (sulfite réductase).

Les bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio* sont des bactéries sulfato-réductrices (BSR), c'est-à-dire capables de réduire les sulfates en sulfures. En dehors des bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio* et d'autres bactéries mésophiles à Gram négatif, on retrouve parmi les BSR, des bacilles à Gram négatif ou positif thermophiles voire même des *Archaea* hyperthermophiles comme *Archaeoglobus fugidus* et *Archaeoglobus profundus*. La capacité qu'ont ces bactéries, aussi différentes, de réduire les sulfates pourrait refléter l'existence de transfert de gènes entre espèces ou l'existence d'un ancêtre commun aux *Archaea* et aux *Eubacteria*. Il est à souligner que, parmi les BSR, qui sont des bactéries essentiellement présentes dans l'environnement, seules certaines espèces ont été rapportées comme pouvant coloniser la muqueuse intestinale (espèces appartenant de manière prédominante aux genres *Desulfovibrio*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus* et *Desulfotomaculum*) (Gibson al. 1993) voire la muqueuse buccale (espèces appartenant de manière prédominante au genre *Desulfovibrio*, mais aussi aux genres *Desulfomicrobium* et *Desulfobacter*) (Langendijk-Genevaux et al. 2001, van der Hoeven et al. 1995) de l'Homme.

2. Caractères bactériologiques

Le contenu moyen en G+C varie de 49 à 66% au sein du genre *Desulfovibrio* qui est constitué d'environ 40 espèces. Il s'agit de bacilles à Gram négatif, incurvés en forme de virgule (d'où « *vibrio* ») ou plus rarement droits (*D. piger*), de 0,5 μm à 1,5 μm de large sur 2,5 μm à 10 μm de long, mobiles (en général grâce à un flagelle polaire unique sauf pour *D. africanus*, *D. gigas* et *D. intestinalis* qui possèdent une ciliature lophotriche) sauf *D. piger* et *D. carbinolicus*. La terminaison « *vibrio* » fait référence à la forme incurvée en virgule et à la

mobilité caractéristique des *Vibrio*. Il est à noter que des formes spiralées, résultant de la juxtaposition de plusieurs corps bactériens, peuvent également être observées notamment dans les cultures vieilles ou stressées (antibiotiques, déficit en Mg^{2+}).

Ces microorganismes sont mésophiles, anaérobies, parfois halophiles, synthétisent une désulfovirdine (sulfite réductase) et utilisent les sulfates ou d'autres composés soufrés comme accepteurs finaux d'électrons. Ceci explique le préfixe « *Desulfo* ». Les *Desulfovibrio* spp. oxydent de manière incomplète les composés organiques et n'hydrolysent pas la gélatine.

La croissance de ces bactéries est lente (temps de génération : 3 – 6 h) en particulier lors des primocultures. Ce phénomène est notamment expliqué par l'effet inhibiteur de l' H_2S sur la croissance et par le fait que les sulfures rendent le fer peu soluble et donc moins disponible pour le métabolisme bactérien.

3. Habitat

Les *Desulfovibrio* spp. sont des bactéries ubiquitaires, présentes dans l'environnement (sols, boues, eau). Leur isolement d'environnements oxygénés, comme les eaux superficielles et les sédiments aérés, sont le reflet de leur relative tolérance à l'oxygène due à la présence d'enzymes (catalase, superoxyde dismutase...) impliquées dans la dégradation des métabolites cytotoxiques de l'oxygène.

Chez l'Homme, les bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio* peuvent coloniser l'intestin et la cavité buccale et y représentent un genre prédominant au sein des BSR. Deux espèces, *D. fairfieldensis* et *D. piger*, n'ont jamais, du moins dans la limite de nos connaissances, été isolées en dehors de l'Homme, et peuvent donc être considérées comme étant des bactéries pouvant faire partie de la flore intestinale normale (Gibson et al. 1988, Loubinoux et al 2003, Loubinoux et al. 2002).

4. Pouvoir pathogène chez l'Homme

4.1. Infections intra-abdominales et systémiques

Chez l'Homme, les *Desulfovibrio* spp. ont été décrits comme pouvant être rarement impliqués (moins de 20 cas rapportés dans la littérature) dans des infections opportunistes plus ou moins sévères. Il est à souligner que la fréquence de ces infections est cependant peut être sous-estimée en raison de la difficulté d'isolement et d'identification de ces microorganismes. L'appartenance de ces bactéries à la flore intestinale explique sans doute que la plupart des

cas d'infections rapportés concernent la sphère intra-abdominale (abcès hépatique, autres abcès intra-abdominaux, cholécystite, appendicite). Des bactériémies associées à des foyers infectieux intra-abdominaux ou résultant de translocation *a priori* d'origine digestive voire buccale ont également été rapportées avec un cas de localisation secondaire décrit (abcès cérébral). (Beerens et Romond. 1977; Johnson et Finegold, 1987; La Scola et Raoult 1999; Loubinoux et al. 2000; Lozniewski et al.1999; Mc Dougall et al.1997; Pimentel et al. 2007; Porschen et Chan 1977; Tee et al. 1996, Goldstein et al. 2003).

4.2. Maladies inflammatoires chroniques intestinales

Il a également été suggéré que les BSR, présentes au niveau de l'intestin, pouvaient être impliquées dans l'étiopathogénie des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), et plus particulièrement dans celle des rectocolites hémorragiques (Pitcher et al. 2000, Willis et al. 1997 ; Cummings et Mc Farlane, 1997; Gibson et al.1993, Rowan et al. 2009). Dans ce contexte, Gibson et al. (1993) ont rapporté que la prévalence des *Desulfovibrio* était plus importante dans les coprocultures de patients atteints de RCH que dans celles des sujets sains. Loubinoux et al. (2002) ont observé que la prévalence de *D. piger* était significativement plus importante au niveau intestinal chez des patients avec une maladie inflammatoire intestinale que chez des sujets indemnes de toute pathologie intestinale. Le rôle des BSR, et au sein de ce groupe des *Desulfovibrio*, dans les maladies inflammatoires intestinales reste cependant encore incertain car d'autres études ont montré que ces bactéries étaient en quantité équivalente chez les patients et chez les contrôles (Pitcher et al. 2000; Fite et al. 2004).

4.3. Maladies parodontales et caries

Sefer et Calinescu (1969) ont pour la première fois mis en évidence la présence de BSR au niveau de la sphère bucco-dentaire (caries dentaires). La mise en évidence princeps des BSR au niveau des muqueuses de la cavité buccale a été réalisée par Langendijk et al. (1999). Ces auteurs ont isolé ces bactéries chez 10% des patients (sains et atteints de parodontite) au niveau des muqueuses et chez 22% de cette même population au niveau de la langue et de la plaque supragingivale. Cependant, ces auteurs ont mis en évidence ces bactéries chez 86% des patients malades au niveau d'une ou plusieurs poches parodontales. La fréquence de détection des BSR chez les patients atteints de parodontites varie de 41.2% à 84.6% (Vianna et al. 2008, Langendijk et al. 1999, Bisson-Boutelliez, 2003; Langendijk et al. 2000). Ces microorganismes sont, selon certains auteurs, majoritairement isolés de patients malades

(Langendijk et al. 1999) et plus rarement de patients sains, alors que pour d'autres ces bactéries colonisent exclusivement les patients atteints de parodontite (Vianna et al. 2008, Bisson-Boutelliez 2003). Ces résultats contradictoires peuvent s'expliquer par l'utilisation de techniques de détection différentes. Certains isolent les bactéries dans un milieu de culture pour bactéries sulfato-réductrices où l'apparition d'un précipité FeSO₄ signe la présence de ces microorganismes. Comme les BSR ne sont pas les seules bactéries à métaboliser des composés soufrés, cette technique pourrait être à l'origine de faux positifs. D'autres auteurs détectent ces bactéries à l'aide de méthodes moléculaires qui permettent une identification précise et spécifique de ces bactéries grâce à l'analyse des gènes codant l'ARNr 16S. Les auteurs ayant analysé (par biologie moléculaire) la répartition par espèce des BSR au niveau de poches parodontales ont montré que les espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* étaient prédominantes (Loubinoux et al. 2001, Langendijk et al. 2001). Langendijk-Genevaux et al. (2001) ont montré que la présence des BSR était le plus souvent associée à celle de parodontothogènes reconnus (*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* [ex *B. forsythus*] et *T. denticola*) dans les lésions parodontales. Il a été montré que la présence de BSR était significativement associée à l'existence de destruction tissulaire sévère (poches de profondeur > à 6mm) (Langendijk et al. 1999, Bisson-Boutelliez, 2003).

Pour qu'une bactérie soit considérée comme pathogène, elle doit satisfaire aux postulats de Koch (cf chapitre 3.1.2). *Desulfovibrio* n'a été isolé qu'au niveau de poches parodontales profondes, et pas (ou peu) au niveau de sites sains, ce qui répond au postulat n°1. Langendijk-Genevaux et al. (2001) ont montré que le traitement parodontal initial par surfaçage radiculaire s'accompagnait d'une diminution significative du nombre de ces bactéries et d'une amélioration des signes cliniques (réduction significative du saignement au sondage et de la profondeur des poches, gain d'attache épithéliale). Ces résultats sont en accord avec les exigences du postulat n°2, mais le surfaçage, dans le cas présent, a permis l'élimination non seulement des BSR mais aussi de nombreuses autres bactéries, ce qui introduit un biais méthodologique ne permettant pas de conclure sur ce point. Le postulat N°4 a été satisfait par l'étude de Weglarz et al. (2007) qui a montré que *Desulfovibrio* était capable de stimuler la production de cytokines par les cellules endothéliales et épithéliales coliques. Pour extrapoler ces résultats à la réponse immunitaire existante dans la parodontite, il serait nécessaire d'évaluer la réponse des cellules épithéliales buccales après stimulation par ces bactéries.

5. Facteurs de virulence

Les facteurs de virulence bactériens correspondent aux éléments qui permettent aux bactéries pathogènes de coloniser l'hôte puis d'y provoquer des lésions tissulaires et/ou des perturbations physiologiques.

5.1. Facteurs de colonisation

La colonisation d'un site par des bactéries dépend de leur capacité à se déplacer vers ce site, et donc de leur mobilité, mais aussi de leur capacité d'adhérer aux cellules de l'hôte et de survivre dans un microenvironnement physico-chimique donné.

- **Flagelles**

Le fait que la plupart des espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* soient mobiles (flagelles) leur confère une capacité leur permettant *a priori* de coloniser les muqueuses de l'organisme.

- **Adhésines**

Si la capacité des *Desulfovibrio* spp. à adhérer aux cellules épithéliales de l'hôte n'est pas connue, certains travaux suggèrent que des protéines et des sucres présents à la surface bactérienne permettent à ces microorganismes d'adhérer, au sein de biofilms, à des surfaces métalliques (Lopez- Jimenes et al. 2001 ; Beech et Gaylarde 1989). Ainsi, Lopez- Jimenes et al. (2001) ont montré que des protéines de faible poids moléculaire (21 à 37 kDa) étaient impliquées dans l'adhérence de *D. desulfuricans* et de *Desulfovibrio alaskensis* à des parois en acier. Beech et Gaylarde (1989) ont, quant à eux, montré qu'une lectine, la concanavaline, limitait de 24.3% l'attachement de *D. desulfuricans* à des parois en acier, suggérant l'implication de structures bactériennes polysaccharidiques dans ce phénomène d'adhérence. Ces auteurs ont également montré que l'utilisation de N acétylglucosaminidase en association avec la concanavaline réduisait encore plus l'adhérence de *D. desulfuricans* (-35.9%), suggérant de ce fait que ce phénomène était médié par une forme dimérique ou polymérique de N acétylglucosamine. Les travaux de Cutter et al. (2003) suggèrent, quant à eux, que l'adhérence de *Desulfovibrio* pourrait être influencée par la présence d'autres bactéries au niveau du site d'attachement. Ces auteurs ont, en effet, montré que l'adhérence à une surface de verre de la souche *Desulfovibrio* G11, était stabilisée par la présence d'autres espèces bactériennes.

- **Superoxyde dismutase et catalase**

La tolérance à l'oxygène des *Desulfovibrio* est un atout supplémentaire dans la compétition bactérienne pour coloniser un environnement potentiellement exposé à l'oxygène. Lobo et al. (2007) ont montré que *D. desulfuricans* ATCC 27774 était capable de se développer à des concentrations plus ou moins importantes d'oxygène. Cette capacité est *a priori* liée au fait que les espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* possèdent des enzymes (superoxyde dismutase, superoxyde réductase, catalase) dédiées à la réduction et à l'élimination de l'oxygène et de ses dérivés réactifs (Dolla et al. 2006, Dos Santos et al. 2000).

5.2. Facteurs provoquant des lésions cellulaires et tissulaires

Comme toutes les bactéries à Gram négatif, les *Desulfovibrio* possèdent un lipopolysaccharide (LPS) de surface au sein de leur membrane externe. Il a été suggéré que ce LPS ainsi que l'H₂S produit par ces microorganismes sont des facteurs pouvant induire une réponse inflammatoire exagérée, responsable d'effets délétères chez l'hôte. L'H₂S a des effets cytotoxiques et pourrait également être impliqué, de même que la superoxyde dismutase, dans l'échappement à la réponse immunitaire. Le pouvoir invasif des *Desulfovibrio* est quant à lui encore inconnu même si des espèces relativement proches d'un point de vue phylogénétique, *Lawsonia intracellularis* et des espèces appartenant au genre *Bdellovibrio*, sont connues pour être des pathogènes intracellulaires.

- **LPS**

Le LPS est classiquement reconnu comme ayant la capacité de déclencher une réponse inflammatoire et d'activer l'immunité innée par stimulation de la voie classique et alterne du complément ainsi que par la synthèse de cytokines par les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Weglarz et al. (2003) ont montré *in vitro* que des cellules endothéliales stimulées par du LPS de *D. desulfuricans* produisaient des cytokines (IL-6 et IL-8) et exprimaient des molécules d'adhésion (E- sélectine et VCAM-1). L'IL-6 est impliquée dans la réponse inflammatoire et l'IL-8 permet d'induire l'expression des molécules d'adhésion, comme en particulier l'intégrine, à la surface des polynucléaires neutrophiles circulants et de guider ceux-ci vers le site infecté. L'expression de E- sélectine et de VCAM-1 au niveau de la surface endothéliale est d'une importance majeure puisque c'est grâce à l'interaction de ces molécules d'adhérence avec l'intégrine des

leucocytes circulants que la migration transendothéliale de ces cellules est rendue possible. Récemment, ces mêmes auteurs ont montré la capacité du LPS de deux souches de *Desulfovibrio* (un isolat d'origine intestinale et un isolat d'origine environnementale) à stimuler les cellules Caco-2 (lignée cellulaire épithéliale d'origine intestinale) et à déclencher une production IL-6 et IL-8 par ces cellules (Weglarz et al. 2007).

- **Production d'H₂S**

L'H₂S est un composé sulfuré volatile (CSV) et contient des radicaux thiols libres (groupe -SH) qui ont le potentiel de réagir chimiquement tant avec l'ADN qu'avec les protéines. Les CSV semblent résulter de la dégradation des protéines par les *Desulfovibrio*. La production d'H₂S par les BSR au niveau sous-gingival résulte de la réduction des sulfates présents sous forme libre dans le fluide gingivo-crêviculaire des poches parodontales mais aussi de celle des sulfates présents au sein des molécules de glycosaminoglycanes ou de certains acides aminés, provenant des cellules épithéliales et des leucocytes (Boopathy et al. 2002; Persson, et al. 1990). L'H₂S a de nombreux impacts sur les cellules. Il est cytotoxique, joue un rôle dans les phénomènes inflammatoires et induit la dégradation de certaines molécules de l'immunité innée.

- ❖ **Cytotoxicité**

L'H₂S est un gaz irritant pour l'homme à de faibles concentrations. L'INERIS (Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques) (Tissot et Pichard, 2000) a déterminé des seuils de toxicité de l'H₂S et les effets biologiques qui leur correspondent. Le sulfure d'hydrogène est un gaz asphyxiant. Il agit au niveau de la respiration cellulaire comme un inhibiteur de la cytochrome c-oxydase (enzyme terminale de la chaîne respiratoire mitochondriale) et bloque l'utilisation tissulaire de l'oxygène (Nicholson 1998). Il a également une action paralysante des centres nerveux respiratoires induisant une apnée qui peut être réversible (<320 ppm) en cas de traitement par oxygénothérapie, mais aussi mortelle en l'absence de thérapie.

La toxicité de l'H₂S sur les cellules de l'épithélium colique ou nasal a été démontrée à l'aide de modèles *in vitro* et/ou *in vivo*. L'H₂S provoque une diminution de l'oxydation du butyrate, qui est la principale source des cellules épithéliales coliques (Babidge et al. 1998). Ce déficit énergétique conduit à une souffrance voire une mort cellulaire. Il a également été montré à l'aide de modèles cellulaires *in vitro*

que l'H₂S était capable d'induire directement des phénomènes apoptotiques (Calenic et al. 2009). A l'aide d'un modèle animal, d'autres auteurs ont montré que l'exposition de l'épithélium nasal à de l'H₂S (10 ppm) provoquait une inhibition de la respiration mitochondriale et était responsable d'effets cytotoxiques significatifs (Lopez et al. 1987). Le sulfure d'hydrogène traverse facilement les membranes cellulaires parce qu'il est très soluble dans les lipides, et transfère sa toxicité cellulaire aux tissus voisins.

❖ Perméabilité

Les CSV sont potentiellement capables d'altérer la perméabilité des tissus gingivaux, d'induire des réponses inflammatoires et de moduler les fonctions des fibroblastes gingivaux.

Dans un modèle cellulaire *in vitro*, Ng et Tonzetich (1984) ont montré qu'une muqueuse non kératinisée de porc présentait une augmentation de la perméabilité après exposition à de l'H₂S. Du fait de cette augmentation de perméabilité, l'H₂S facilite l'entrée d'antigènes bactériens dans les tissus.

Gleissner et al (2003) ont montré que le traitement initial des parodontites chroniques induisait une diminution majeure des concentrations des composés sulfurés volatiles au niveau des poches parodontales, qui s'accompagnait d'une amélioration clinique significative (diminution du saignement au sondage, de la profondeur des poches et des pertes d'attache). Il est à souligner que, suite à ce constat, certains auteurs ont suggéré d'utiliser le niveau de sulfite dans les poches comme indicateur de succès thérapeutique (Torresyap et al. 2003; Morita et Wang, 2001).

❖ Action de l'H₂S sur les fonctions des polymorphonucléaires neutrophiles

Dans un modèle expérimental, Granlund-Edstedt et al. (1993) ont exploré l'impact de l'hydrogène sulfuré sur l'opsonisation et la phagocytose d'un streptocoque encapsulé par les polynucléaires neutrophiles. Ces auteurs ont montré que 2 mM d'H₂S inhibait significativement la destruction de cette bactérie par les neutrophiles. Les conditions expérimentales concordent avec la réalité clinique car des quantités d'H₂S supérieures à 2 mM ont été retrouvées dans les poches parodontales (Persson, 1992). Cette inhibition de la destruction bactérienne semble être la conséquence de la coupure des ponts disulfures du C3bi. La partie se liant au

récepteur CR3 du polynucléaire neutrophile étant clivée, l'opsonisation de la bactérie est incomplète et la phagocytose moins efficace. Ceci suggère que la formation d'hydrogène sulfuré par les *Desulfovibrio* est un moyen d'échapper à l'immunité innée de l'hôte.

- **Pouvoir invasif**

La capacité des bactéries à envahir des cellules non phagocytaires professionnelles est un moyen d'échapper aux défenses de l'hôte. Le potentiel invasif des *Desulfovibrio* est encore inconnu. Il est cependant à souligner qu'une espèce appartenant au genre *Lawsonia*, *Lawsonia intracellularis*, et dont la position taxonomique a longtemps été mal établie (expliquant des dénominations antérieures variables : intracellular Campylobacter-like organism, Ileal symbiot intracellularis, *Ileobacter intracellularis*, *Candidatus intracellularis*) en raison de sa proximité avec certaines espèces du genre *Desulfovibrio* et *Bilophila*, est une bactérie intracellulaire obligatoire, capable d'envahir les cellules épithéliales intestinales et qui est l'agent des entérites prolifératives essentiellement chez le porc mais aussi chez d'autres espèces d'animaux (Lawson et al. 1985; Mc Orist et Lawson, 1989, Schoeb et Fox, 1990, Mc Orist et al 1995, Fox et al. 1994, Cooper et al. 1997). Au cours d'infections expérimentales du porc, il a été montré que *L. intracellularis* se multiplie à l'intérieur des entérocytes de l'iléon et du côlon. Après internalisation, cette bactérie semble rapidement (< 3 h) s'échapper des vacuoles d'endocytose pour se retrouver sous forme libre au niveau du cytoplasme des cellules (Mc Orist et al. 1993; Gebhart et al. 1993). Enfin, il est également de noter que les bactéries appartenant au genre *Bdellovibrio*, qui appartient également à la classe des δ *Proteobacteria*, sont capables, après avoir envahi d'autres bactéries à Gram négatif, de se reproduire par un phénomène de scission multiple à l'intérieur du cytoplasme de ces hôtes procaryotes (Lambert et al. 2006).

6. Identification et sensibilité aux antibiotiques des principales espèces de *Desulfovibrio* pathogènes

6.1. Culture et identification

Les espèces appartenant au genre *Desulfovibrio* peuvent être isolées par culture à partir de différents prélèvements. En raison du caractère anaérobie de ces bactéries, il est nécessaire d'utiliser des milieux de transport adéquats et d'effectuer cette mise en culture le plus rapidement possible.

La culture peut être réalisée à l'aide de milieux non spécifiques ou spécifiques. Une croissance, lente, peut ainsi être obtenue à l'aide des milieux non spécifiques enrichis habituellement utilisés en bactériologie médicale comme par exemple la gélose Wilkins-Chalgren supplémentée avec du sang de mouton, la gélose au sang cuit ainsi que les flacons d'hémoculture. En cas d'isolement à partir de prélèvements pouvant a priori contenir une flore polymicrobienne, il est nécessaire d'utiliser des milieux liquides ou solides spécifiques contenant des sulfates, des ions ferreux et des lactates.

Après incubation des milieux en anaérobiose et à 37°C, les *Desulfovibrio* présentent une croissance lente en particulier lors des primo-cultures (en moyenne 5-7 jours). Sur milieux de Wilkins-Chalgren ou Brucella agar supplémentés, les colonies de *D. fairfieldensis* ou de *D. desulfuricans* sont translucides, non hémolytiques et très petites (en tête d'épingle) alors que les colonies de *D. piger* sont brunes, non hémolytiques et ont un diamètre de 0.5 mm. Lorsqu'un milieu spécifique est utilisé, la croissance de ces bactéries est détectée par le noircissement dû à la formation d'un précipité de sulfure de fer (colonies noires sur gélose, noircissement des bouillons) et par l'odeur due à la présence de sulfure d'hydrogène.

L'identification phénotypique est basée sur l'aspect microscopique après coloration de Gram, l'étude de la mobilité (variable selon les espèces), de la sensibilité à la colistine (résistance) et de certains caractères biochimiques (catalase, indole, nitrate réductase, uréase) variables selon les espèces. Ces bactéries asaccharolytiques non protéolytiques se caractérisent par leur capacité à réduire les sulfates en sulfure et le fait qu'elles possèdent une désulfovirdine, dont la présence est mise en évidence après libération, après ajout de NaOH 2N, de son chromophore (sirohydrochlorine) visualisé sous UV (365 nm) en raison de sa fluorescence rouge à pH alcalin.

La confirmation de l'identification au rang d'espèce nécessite le plus souvent le recours à l'étude des séquences codant l'ARNr 16S. Une identification d'espèce peut également être réalisée à l'aide d'une PCR multiplexe (Loubinoux et al. 2002).

6.2. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques des *Desulfovibrio* est encore mal connue en raison du faible nombre d'isolats étudiés. Il a été montré que ces bactéries sont sensibles au métronidazole, à la clindamycine et à l'imipénème (Lozniewski et al. 2001). A l'inverse, ces souches sont le plus souvent résistantes aux pénicillines et aux céphalosporines. Des gènes codant des β -lactamases (leur conférant une résistance aux β -lactamines et aux céphalosporines à large spectre) n'ont été décrits chez *D. desulfuricans*. Il a été montré que cette β -lactamase appartenait à la classe A d'Ambler (Morin et al. 2002). Certains isolats humains de *D. fairfieldensis* sont résistants aux β -lactamines sans qu'aucune β -lactamase n'ait été détectée (Loubinoux et al. 2000, Lozniewski et al. 2001, La Scola et Raoult, 1999).

III. L'AMOXICILLINE DANS LA MALADIE PARODONTALE

L'amoxicilline appartient à la famille des pénicillines. La pénicilline G fût découverte par Alexander Flemings en 1929. Celui-ci avait observé qu'une de ses cultures bactériennes (une souche de *Staphylococcus aureus*) était envahie par une moisissure, (*Penicillium notatum*) qui sécrétait une substance inhibitrice qui fût nommée « pénicilline ».

Après la découverte des pénicillines naturelles, la connaissance de la biosynthèse et de la structure de ces molécules a permis d'obtenir des pénicillines semi-synthétiques après greffage de chaînes latérales diverses. Ceci a notamment conduit à obtenir les aminopénicillines, en particulier l'amoxicilline.

1. Composition chimique

L'amoxicilline est un antibiotique administrable par voie orale ou parentérale. D'après sa charge électrique cet antibiotique est un zwitterion. La formule chimique brute de la forme orale est : $C_{16} H_{19} N_3 O_5 S * 3 H_2O$. Il s'agit en fait de l'acide (-)- 6- [2- amino-2- (p-hydroxyphényl) acétamido]- 3,3- diméthyl- 7- oxo- 4- thia-1- azabicyclo [3.2.0] heptane-2- carboxylique (Fig. 6).

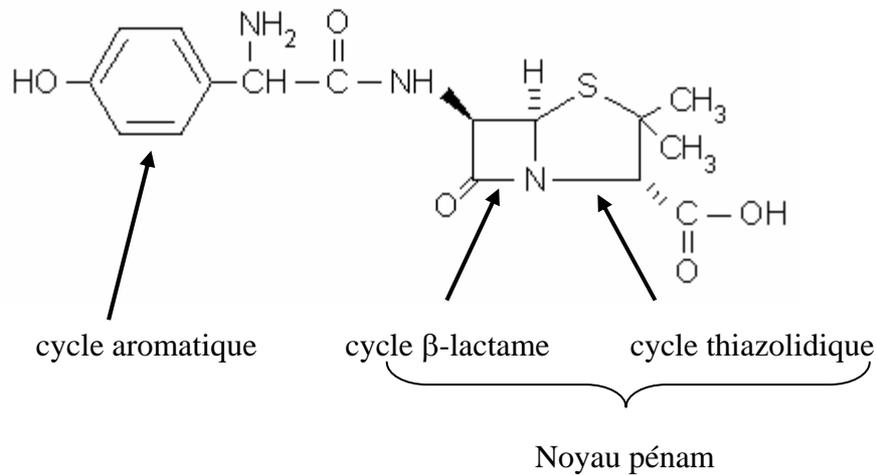


Figure 6. Schéma de l'amoxicilline

2. Mécanismes d'action antibactérienne

L'amoxicilline, comme les autres β-lactamines, est un inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. En effet, ces antibiotiques, en se fixant sur les protéines de liaison des pénicillines (PLP), présentes à la surface de la membrane cytoplasmique des bactéries, inhibent l'activité enzymatique des PLP, enzymes nécessaires à l'assemblage du peptidoglycane. La fixation de l'amoxicilline aux PLP entraîne l'arrêt de la synthèse pariétale et de ce fait inhibe la croissance bactérienne. La fragilisation de la paroi et surtout l'action d'autolysines conduit ensuite à une lyse bactérienne, expliquant l'activité bactéricide de cet antibiotique.

3. Spectre d'activité

Le spectre usuel de l'amoxicilline sur les bactéries rencontrées est le suivant (les espèces rencontrées en pathologie parodontale sont soulignées) (Vidal, Afssaps 2001 pour parodontopathogènes) :

- Espèces sensibles :
 - Aérobie à Gram + : *Corynebacterium diphtheriae*, *Enterococcus faecalis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Nocardia asteroides* (50 - 80 %), *Streptococcus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae* (15 - 35 %).

- Aérobie à Gram - : Aggregatibacter (Ex. *Actinobacillus*)
actinomycetemcomitans, *Bordetella pertussis*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*,
Escherichia coli (30 - 50 %), *Haemophilus influenzae* (20 - 35 %),
Haemophilus para-influenzae (10 - 20 %), *Helicobacter pylori*, *Neisseria*
gonorrhoeae, *Neisseria meningitidis*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*
(10 - 40 %), *Salmonella* spp. (0 - 40 %), *Shigella* spp. (0 - 30 %),
Streptobacillus moniliformis, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter rectus*
- Anaérobies : *Actinomyces*, *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp.,
Fusobacterium, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* spp. (dont *P. gingivalis*),
Prevotella spp. (dont *P. intermedia*) (60 - 70 %), *Tannerella forsythia*,
Propionibacterium, *Veillonella*.
- Autres : *Bartonella*, *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema* (dont *T. denticola*)
- Espèces modérément sensibles (in vitro de sensibilité intermédiaire) :
 - Aérobie à Gram + : *Enterococcus faecium* (40 - 80 %).
- Espèces résistantes :
 - Aérobie à Gram + : *Staphylococcus*.
 - Aérobie à Gram - : *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Branhamella catarrhalis*,
Campylobacter, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter*,
Klebsiella oxytoca, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella*, *Morganella morganii*,
Proteus rettgeri, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia*,
Yersinia enterocolitica.
 - Anaérobies : *Bacteroides fragilis*.

4. Pharmacocinétique

- **L'absorption**

Environ 80 à 90% de la dose d'amoxicilline administrée par voie orale est résorbée par le tube digestif. Un pic sérique de 7 à 10 µg/ml est atteint en 1h30 à 2h après une prise de 500 mg, et de 12 à 18 µg/ml pour une prise de 1 g.

- **Liaison aux protéines et distribution**

L'amoxicilline se lie pour 17 à 20% aux protéines plasmatiques.

Le volume de distribution, relativement faible (0.10-0.40 l/kg), est limité aux espaces extracellulaires. D'une manière générale, l'amoxicilline présente une bonne diffusion dans tout l'organisme (sphère ORL, bronches, tissu lymphatique, placenta ...). La diffusion dans le liquide céphalorachidien est relativement faible avec des méninges intactes, mais s'améliore en cas d'inflammation méningée (5 à 10%). Les concentrations d'amoxicilline dans la sueur, les larmes, le lait et la salive sont faibles.

La diffusion de l'amoxicilline au niveau des tissus parodontaux est limitée et inférieure à celles d'autres antibiotiques utilisés dans le cadre du traitement des parodontites (Tableau 4). Par ailleurs, il est à souligner que, du fait de sa très faible lipophilie, l'amoxicilline n'est pas capable de diffuser à l'intérieur des cellules de l'hôte et ne peut donc pas être actif sur les formes bactéries intracellulaires (Hultén et al 1996, Scaglione et al.1993).

Tableau 4. Caractéristiques pharmacocinétiques systémiques et diffusion gingivo-crévicaire de l'amoxicilline et de différents antibiotiques (Mombelli A. 2003).

Agents antimicrobiens	Dose (mg)	C max _{sérum} (µg/mL)	C _{fluide} (µg/mL)	t _{max} sérum (h)	Demi-vie (h)
Amoxicilline	500	8	3-4	1.5-5	0.8-2
Doxycycline	200	2-3	2-8	2	12-22
Tétracycline	500	3-4	5-12	2-3	2-3
Clindamycine	150	2-3	1-2	1	2-4
Métronidazole	500	6-12	8-10	1-2	6-12
Ciprofloxacine	500	1.9-2.9	ND	1-2	3-6

- **Demi-vie, biotransformation et élimination**

La demi-vie de l'amoxicilline est variable et en moyenne d'une heure. Cet antibiotique est faiblement métabolisé (acide pénicilloïque). La fraction absorbée est excrétée sous forme active dans les urines (environ 70 à 80% de la dose absorbée) et dans la bile (environ 5 à 10% de la dose absorbée).

5. Indications cliniques actuelles de l'amoxicilline en parodontologie

L'amoxicilline est selon l'Afssaps l'antibiotique de choix (en dehors de l'association amoxicilline- acide clavulanique) pour combattre les bactéries présentes dans la sphère bucco-dentaire. Son large spectre lui permet d'éradiquer le maximum des microorganismes responsables d'infections au niveau des sites parodontaux.

5.1. Antibiothérapie prophylactique

L'indication de prescription d'une antibiothérapie chez des patients sains ou à risque A (sujets à risque d'infection locale et/ ou générale : sujets transplantés ou greffés [sauf patients sous ciclosporine], sujets immunodéprimés, pathologies associées non contrôlées, sujets dénutris) ou B (sujets à risque d'infection à distance [localisation secondaire] : sujets ayant un risque d'endocardite infectieuse, certains sujets porteurs de prothèses articulaires) dépend du risque de saignement significatif des actes invasifs ou non invasifs. Le traitement prophylactique lors de certains actes dentaires repose sur l'administration d'amoxicilline ou, en cas d'allergie aux β -lactamines, sur celle de la clindamycine ou de la pristinamycine.

5.2. Antibiothérapie curative

Dans le cas de parodontites chroniques sévères et agressives, le traitement peut être mené avec succès sauf dans le cas où *A. actinomycetemcomitans* est présent. Cette bactérie ne peut en effet être éradiquée par simple surfaçage et un traitement anti-infectieux systémique est nécessaire. Seule l'association amoxicilline-métronidazole (administrée pendant une semaine), en complément du débridement mécanique permet l'éviction de cette bactérie dans les cas de parodontites agressives, de parodontites réfractaires et de parodontites chroniques sévères généralisées (Slots et Ting 2002). Pour le traitement des parodontites réfractaires, Seymour et Heasman (1995) préconisent aussi d'administrer du métronidazole en association avec de l'amoxicilline. Pour le traitement des parodontites agressives et des parodontites juvéniles localisées, il est recommandé d'associer l'amoxicilline et l'acide clavulanique, ou l'amoxicilline et le métronidazole en vue d'éradiquer *A. actinomycetemcomitans* et les autres bactéries présentes dans les lésions parodontales.

6. Résistance des bactéries à l'amoxicilline

6.1. Généralités

La famille des β -lactamines, dont fait partie l'amoxicilline, reste le groupe d'antibiotiques le plus communément utilisé dans le monde. Certaines espèces bactériennes présentent une résistance naturelle à certaines β -lactamines. De plus, les bactéries ont développé des résistances acquises plus ou moins rapidement après la mise sur le marché des différentes molécules utilisées depuis la découverte de la pénicilline G. La résistance des bactéries aux β -lactamines est le plus souvent due à l'inactivation enzymatique de ces molécules par des β -lactamases bactériennes (hydrolyse du cycle β -lactame) ou à l'existence de cibles d'affinité réduite (protéines liant les pénicillines anormales). Des phénomènes d'efflux (pompes à efflux) ou des troubles de la perméabilité membranaire (porines anormales...) peuvent également être impliqués dans la résistance aux β -lactamines chez certaines espèces bactériennes.

6.2. β -lactamases et bactéries impliquées dans les infections bucco-dentaires

Les β -lactamases sont des enzymes capables d'ouvrir le cycle β -lactame et d'empêcher ainsi la liaison des β -lactamines aux protéines liant les pénicillines (Bush et al; 1995). Les gènes codant ces enzymes, dont l'expression peut être constitutive ou inductible, peuvent avoir une localisation chromosomique ou extra-chromosomique.

L'amoxicilline est une molécule qui peut être hydrolysée par un grand nombre de β -lactamases produites de manière naturelle ou acquise et touchant préférentiellement les pénicillines (pénicillinases), les céphalosporines (céphalosporinases) ou ayant un spectre moléculaire plus étendu (β -lactamases à spectre étendu, carbapénémases ...).

La majorité des bactéries parodontales résistantes aux β -lactamines sont productrices de β -lactamases (Mc Roberts 2002) et la prévalence des souches productrices de β -lactamases est relativement élevée au niveau de la flore buccale en particulier chez des sujets ayant déjà été traités par des antibiotiques (Nyfors et al. 2003, Feres et al. 2002).

Handal et al. (2004) ont observé que des bactéries sous-gingivales productrices de β -lactamases étaient isolées, aux Etats-Unis, chez 72% des patients ayant une parodontite réfractaire. Cette forte prévalence avait déjà été rapportée une quinzaine d'années auparavant par d'autres auteurs américains qui avaient montré que des souches productrices de β -lactamases étaient isolées chez 64% des patients en maintenance (Walker et al. 1987). Des taux de prévalence élevés ont également été rapportés en Europe. Ainsi, Handal et al. (2003) ont rapporté, en Norvège, que des souches productrices de β -lactamases étaient isolées chez 68% des patients ayant une parodontite. En Espagne et au Pays Bas, des taux de prévalence de 87.1% et 73.3% ont été respectivement rapportés par Herrera et al. (2000). En France, Fosse et al. (1999) ont mis en évidence au moins une souche productrice de β -lactamases chez 53.2% de patients ayant une parodontite.

Des résistances acquises par production de β -lactamases ont été décrites chez la plupart des espèces impliquées dans les infections bucco-dentaires et notamment chez *Capnocytophaga* spp, *Prevotella* spp. (dont *P. intermedia*), *Tannerella forsythia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella* spp., *Eikenella corrodens*, *Peptostreptococcus* et plus récemment chez *Desulfovibrio* spp. (Foweraker et al.1990, Handal et al 2005, Lacroix et Walker 1991, Lozniewski et al. 2001, Madinier et al. 2001, Mc Roberts 2002, Morin et al. 2002, Roberts 1989 ; Roberts, 1998, Rotger et al. 1986, Tuner et al. 1985, Valle et al. 1998, Voha et al. 2006). La fréquence de ce phénomène est variable en fonction des espèces et des études. Néanmoins, parmi les souches productrices de β -lactamases isolées de sites bucco-dentaires, on note une nette prédominance des souches appartenant aux genres *Prevotella* et *Fusobacterium*. Ainsi, Maestre et al. (2007) ont rapporté que parmi les souches productrices isolées de sites parodontaux chez des patients espagnols, 54.1% appartenaient au genre *Prevotella* spp., 38.9% au genre *Fusobacterium* (*F. nucleatum*) et 30% au genre *Capnocytophaga*. Mosca et al. (2007) ont rapporté que 12.5% des souches de *Fusobacterium nucleatum* et 17.9% souches de *Prevotella* isolées de sites parodontaux étaient résistantes à l'amoxicilline.

IV. LES CYCLODEXTRINES

Les cyclodextrines, nommées aussi dextrines de Schardinger, cycloamyloses, cyclomaltooligosaccharides ou cyclooligoglucanes, sont des produits connus depuis un siècle. Elles ont été isolées en 1891 par Villiers à partir de produits de dégradation partielle de l'amidon (Villiers, 1891). Ce n'est qu'à partir de 1903 que Schardinger décrit leur préparation, leur isolement et leurs principales caractéristiques (Duchêne et al. 1984). De part leur capacité à former des complexes avec de nombreuses molécules, les cyclodextrines ont aujourd'hui d'innombrables applications industrielles et font l'objet de multiples recherches scientifiques, au vue des nombreuses publications et brevets qui leurs sont consacrés.

1. Définition et Préparation

Les cyclodextrines (CD) sont une famille d'oligosaccharides cycliques qui résultent de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon à haute température par une amylase, la cyclodextrine glycosyltransférase (CGTase), produite par différents bacilles, *Bacillus marcerans* qui fut la première bactérie utilisée et *Klebsiellas*. Des modifications génétiques ont permis de surexprimer les séquences codant la synthèse de la CGTase et d'améliorer sa spécificité (Schmid, 1989). Des techniques innovantes utilisant ces enzymes plus spécifiques ont permis la production de cyclodextrines hautement purifiées, pouvant être incorporées comme excipient pharmaceutique (Loftsson et Duchêne, 2007). La formation des CD est interprétée comme une trans-glucosidation sous contrôle enzymatique de l'amylase. Elle provoque un transfert de liaison qui relie entre elles les spires qui forment naturellement l'amidon en solution aqueuse, pour donner des polyglycanes cycliques ou cyclodextrines.

Les amidons utilisés sont des amidons de pomme de terre, de maïs ou de blé dégraissé. La purification se fait par une séparation à l'état de complexes précipitant avec certains solvants suivie d'une recristallisation. (David, 1995).

La préparation de ces cycloamyloses a évolué avec les années. Après les premières cyclodextrines natives (α , β , γ -CD) produites, des cyclodextrines de seconde génération sont apparues, avec des modifications de structure qui ont permis d'améliorer sensiblement leurs propriétés physico-chimiques : augmentation de la solubilité aqueuse (Brewster et Loftsson, 2007), création d'une charge qui permet des interactions additionnelles, diminution du caractère hémolytique,... Puis des cyclodextrines de troisième génération ont été mises au point par adjonction de ramifications, dans le but de ciblage de certains récepteurs ou

molécules. La fonctionnalisation de ces macrocycles a pour but de reconstituer les interactions sucres-protéines qui sont fondamentaux dans les processus pathologiques de la reconnaissance et de l'expression cellulaire. L'utilisation de ces cages biocompatibles, non immunogènes, capables d'accueillir ou de s'associer avec diverses molécules, dans le ciblage thérapeutique de certains médicaments constitue aujourd'hui un intérêt majeur dans les applications médicales et pharmaceutiques.

2. La structure

2.1. Les cyclodextrines natives

Les CD sont des oligosaccharides cycliques composés de 6 à 12 sous unités glucopyranosyle reliées par des liaisons glycosidiques α -(1,4) (fig. 7). Les CD renfermant plus de 8 unités glucopyranoses, ne présentent pas une stabilité qui permette une utilisation pharmaceutique. Les CD les plus courantes sont les CD natives (soit des CD ne présentant aucune ramification autre que l'anneau glycosique) α , β , γ qui comportent respectivement 6, 7 et 8 résidus glucopyranoses, ayant tous la configuration chaise.

La CD est caractérisée par une structure en « couronne » et se présente sous forme d'un anneau tronconique avec à l'extérieur des hydroxyles primaires et secondaires et, dans la partie interne des atomes d'hydrogène, de carbone et des liaisons éther-oxydes. Du fait de la configuration chaise des unités glucose liées en α -(1-4), tous les groupements hydroxyles secondaires (portés par les carbones C2 et C3) sont situés sur le côté le plus ouvert de l'anneau, tandis que les hydroxyles primaires (C6) se trouvent de l'autre côté. Les fonctions hydroxyles primaires peuvent tourner légèrement, de façon à bloquer partiellement la cavité, alors que les hydroxyles secondaires, situés sur des chaînes relativement rigides ne le peuvent pas.

La forme arrondie de ces macromolécules est stabilisée par des liaisons hydrogènes entre les hydroxyles secondaires portés par les carbones C2 et C3 de deux résidus glucose adjacents. Cette structure, ainsi stabilisée, permet une orientation particulière des protons libres H1, H2 et H4 dirigés à l'extérieur de la cavité, tandis que H3 et H5 sont orientés vers l'intérieur de l'anneau (fig. 8). La connaissance de l'orientation de ces divers protons est une des preuves qui permet de montrer, par l'étude en résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton, l'inclusion d'une molécule invitée dans la CD (molécule hôte).

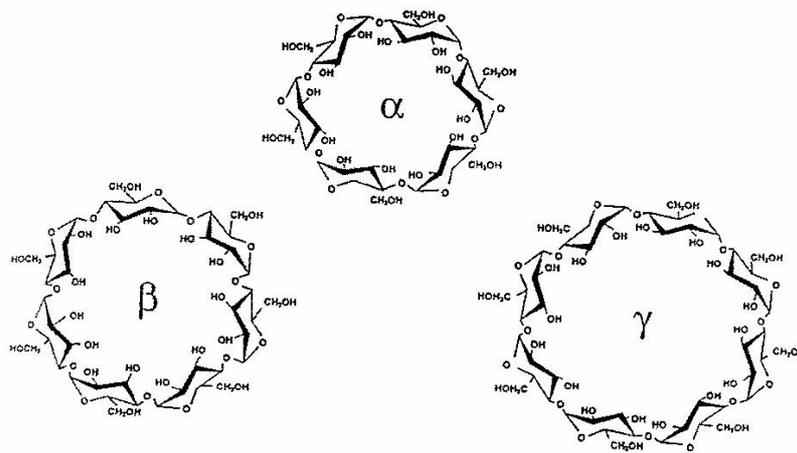


Figure 7. Schéma des cyclodextrines natives

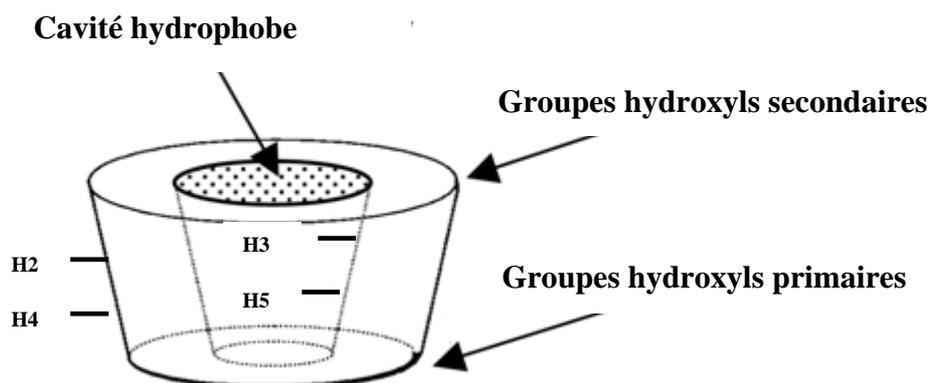


Figure 8. Disposition des atomes d'hydrogène par rapport à la cavité d'une molécule de cyclodextrine.

Tableau 5. Caractéristiques et voies d'administration des différentes β -cyclodextrines modifiées (d'après Uekama, 2004).

β -CD modifiées		Caractéristiques	Voies d'administration
Dérivés hydrophiles			
β -CD méthylées	DM- β -CD	Soluble dans l'eau et solvants organiques, Induit une hémolyse	Orale, cutanée, muqueuse*
	TM- β CD		
	DMA- β -CD	Solubles dans l'eau, faible action hémolytique	parentérale
β -CD Hydroxyalkylées	2-HE- β -CD	Mélange amorphe avec différents degrés de substitution, très solubles dans l'eau (>50%) et faible toxicité	Orale, cutanée, muqueuse, parentérale (intra veineuse)
	2-HP- β -CD		
	3-HP- β -CD		
	2,3-DHP-2 β -CD		
β -CD branchées	G ₁ - β -CD	Hautement solubles (>50%), faible toxicité	Orale, muqueuse, parentérale (intraveineux)
	G ₂ - β -CD		
	GUG- β -CD		
Dérivés hydrophobes			
β -CD alkylées	DE- β -CD	Solubles dans des solvants organiques, peu dans l'eau,	Orale, parentérale (sous-cutanée), libération lente
	TE- β -CD		
β -CD acylées	TA- β -CD	Solubles dans des solvants organiques, peu dans l'eau,	Orale, cutanée, libération lente
	TV- β -CD		
Dérivés ionisables			
β -CD anioniques	CME- β -CD	pK _a = 3 à 4, soluble à pH>4	Orale, cutanée, muqueuse (libération lente)
	β -CD sulfatée	pK _a >1, soluble dans l'eau	Orale, muqueuse, parentérale (intraveineuse)
	SBE- β -CD		parentérale
	β -CD phosphate		

* muqueuse nasale, sublinguale, ophtalmique, pulmonaire, rectale, vaginale... Abréviations : DM : 2,6-di-o-m »thyl ; TM : per-O-méthyl ; DMA : DM- β -CD acétylée ; 2-HE : 2-hydroxyéthyl ; 2-HP : 2-hydroxypropyl, 3-HP : 3-hydroxypropyl ; 2-3-DHP : 2-3-dihydroxypropyl ; G₁ : glycosyl, G₂ : maltosyl, GUG : glucuronyl-glucosyl ; DE : 2,3-di-O-éthyl ; CME : O-carboxyméthyl-O-éthyl ; TA : per-O-acétyl ; TV : per-O-valéryl ; SBE : sulfobutyl éther.

2.2. Les cyclodextrines modifiées

Afin d'améliorer la toxicité, la solubilité et le coût de fabrication, et dans la recherche d'application thérapeutique plus ciblée, de nombreux dérivés des cyclodextrines ont été élaborés (Tableau 6). Les modifications chimiques concernent les groupements hydroxyles qui sont substitués en nombre variable selon le type de cyclodextrines natives. La quantité de positions substituables est fonction du nombre d'unités glucose présentes dans la molécule de cyclodextrine multiplié par 3 (soit le nombre d'hydroxyles par unité de glucose). Ainsi, pour la β -CD le nombre d'isomères possibles est de 50 388 après substitution de la moitié des hydroxyles. De nombreux dérivés des CD sont synthétisés, et nous ne citerons que quelques exemples concernant la β -CD (Tableau 5), CD pour laquelle les applications sont les plus nombreuses.

Les cyclodextrines de dernière génération sont plus particulièrement synthétisées pour s'adapter à la structure de l'hôte et à la reconnaissance cellulaire. L'importance des interactions sucre-protéine n'est plus à démontrer, et leurs implications dans de nombreux processus tant physiologiques (embryogénèse,...) que pathologiques tels que l'infection bactérienne et virale, l'inflammation ou les mécanismes métastatiques sont bien connus. Les macrocycles polyfonctionnels biocompatibles et non immunogènes que sont les cyclodextrines sont d'un intérêt majeur car ils combinent les rôles de transporteur supramoléculaire et de support pour la présentation du ligand.

Tableau 6. Solubilités et monographies à la pharmacopée des cyclodextrines entrant dans la composition des produits pharmaceutiques commercialisés.

Cyclodextrine	Substituant*	Masse moléculaire	Solubilité dans l'eau (mg/ml, à 25°C)	Pharmacopée		
				Europe (5 ^{ème} édition)	USA (28 ^{ème} édition)	Japon
α -CD	-	972	145	oui	non	oui
β -CD	-	1135	18.5	oui	oui	oui
HP- β -CD	0.65	1400	>600	oui	oui	non
RM β -CD	1.8	1312	>500	non	non	non
SBE β -CD	0.9	2163	>500	non	non	non

*nombre moyen de substituant par unité de glucopyranose

CD : cyclodextrine, HP- β -CD: 2- hydroxypropyl- β -CD, RM β -CD : Randomly Methylated- β -CD, SBE β -CD : Sulfobutyléther- β -CD.

Actuellement, la recherche pharmaceutique se focalise sur l'élaboration de cyclodextrines modifiées en vue de ciblage d'actifs thérapeutiques (Defaye et al. 2007). Le greffage de ligands saccharidiques multivalents reconnus par des protéines membranaires permet le transport et l'adressage de molécules actives vers des récepteurs spécifiques et contrôle les interactions cellulaires. Les ligands saccharidiques greffés, pouvant reconnaître des motifs lectines membranaires, sont la concanavaleine A et des glycodendrons mannosylés (Gómez-García et al. 2005 ; Oda et al. 2008).

Cependant, les interactions ligand glucidique-récepteur protéique sont trop faibles pour être efficaces. Des interactions identiques existent dans la nature, mais elles sont toujours multiples ce qui compense leur fragilité unitaire. La création de structures dendritiques permet d'optimiser l'interaction ligand-récepteur en augmentant leur nombre. Les cyclodextrines dendritiques sont des structures arborescentes construites à partir d'une unité centrale multifonctionnelle et se terminant par de multiples groupes réactifs périphériques, tels que des ligands D-galactose. Le ciblage thérapeutique est particulièrement recherché dans le cas de molécules anticancéreuses dont les effets délétères sur les cellules saines sont difficilement contrôlables. Un exemple d'adressage utilisant la reconnaissance ligand-protéine membranaire: la complexation de la doxorubicine, molécule anticancéreuse avec une β -CD branchée avec un D-galactose est un modèle qui peut transporter spécifiquement cette molécule active aux cellules contenant des lectines se liant avec D-galactose (Oda et al. 2008).

3. Propriétés physico- chimiques

Les cyclodextrines possèdent une structure en tronc de cône, délimitant une cavité en son centre. Cette cavité présente un environnement carboné apolaire et plutôt hydrophobe (squelette carboné et oxygène en liaison éther), capable d'accueillir des molécules peu hydrosolubles, tandis que l'extérieur présente de nombreux groupements hydroxyles, conduisant à une bonne solubilité des cyclodextrines en milieux aqueux. Grâce à cette cavité apolaire, les cyclodextrines sont capables de former des complexes d'inclusion en solution aqueuse avec une grande variété de molécules-hôtes hydrophobes qui selon leur taille et le diamètre de la cavité de la CD (α , β , γ) (Fig. 9) entrent plus ou moins entièrement dedans. L'intérieur de celle-ci apporte un microenvironnement lipophile dans lequel peuvent se placer des molécules non polaires. La principale force provoquant la formation de ces complexes est la stabilisation énergétique du système par le remplacement dans la cavité des molécules

d'eau à haute enthalpie par des molécules hydrophobes qui créent des associations apolaires-apolaires. Ces molécules hôtes et invitées sont en équilibre dynamique entre leur état libre et complexé. La synthèse de cyclodextrines modifiées a permis d'améliorer certaines propriétés des molécules natives.

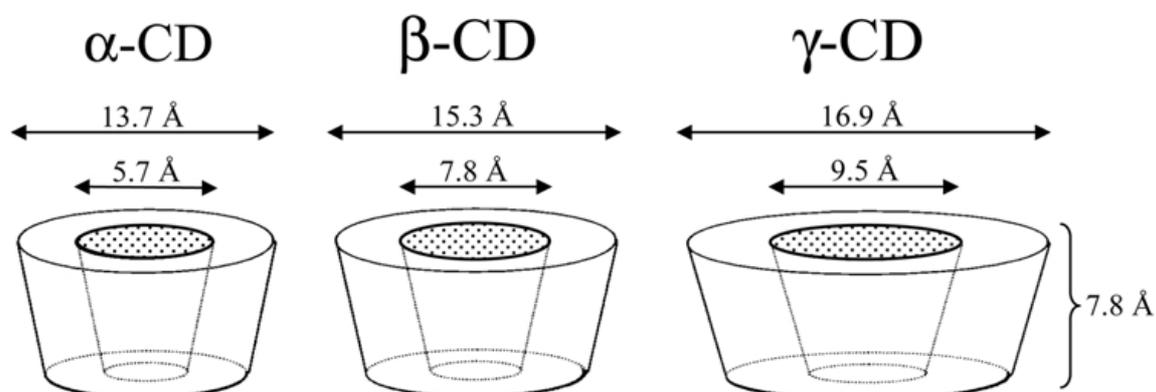


Figure 9. Récapitulatif de la taille des trois cyclodextrines natives et de leur cavité respective.

Tableau 7. Principales caractéristiques des cyclodextrines natives (Szejtli, 2004).

Cyclodextrines natives	Nombre d'unités glucose	Masse moléculaire	Diamètre de la cavité (Å)	Volume de la cavité (Å)	Solubilité dans l'eau à 25°C (g/100mL)
α	6	972	4,7- 5,3	174	14,5
β	7	1135	6,0- 6,5	272	1,85
γ	8	1297	7,5- 8,3	427	23,2

La solubilité en milieu aqueux varie selon le type de cyclodextrines natives (Tableau 7). L'adjonction de groupements à ces CD natives améliore cette propriété. Par exemple, la substitution des hydroxyles par des éthers alkyle ou des chaînes hydroxyalkyles augmente la solubilité en milieu aqueux. La 2-hydroxypropyl β -CD ayant un degré de substitution moyen de 8 permet d'augmenter la solubilité de la β -CD à 600g/L (Pitha et al. 1986). La fonctionnalisation de la méthyl- β -CD avec un groupe thiourée présente l'intérêt de rendre ce composé plus soluble que la 2-hydroxypropyl- β -CD et que la molécule d'origine, soit 775 g/L, tout en conservant un faible poids moléculaire. Cette même molécule greffée avec β -CD-glucopyranosyl présente une solubilité comparable.

4. La toxicité des cyclodextrines

4.1. Les cyclodextrines natives

L'innocuité des trois cyclodextrines natives et certains de leurs dérivés a été largement étudiée. En général, les cyclodextrines naturelles et leurs homologues traversent avec difficulté les barrières biologiques lipophiles. Toutes les études ont démontré que les CD administrées oralement présentent peu de toxicité car elles ne sont pas absorbées au niveau du tractus gastrointestinal (Irie et Uekama, 1997). Chez l'homme, la dose orale journalière tolérée de ces macrocycles est de : 1.4 g pour α -CD, 0.35 g pour la β -CD, 10 g pour la γ -CD (Antlsperger et Schmid, 1996).

Le métabolisme des cyclodextrines natives est comparable à celui de l'amidon après 24h, les quantités métabolisées sont presque identiques. Les α et β -cyclodextrines, contrairement à la γ -cyclodextrine, ne peuvent être hydrolysées par les amylases salivaires et pancréatiques. En revanche, elles sont fermentées par la microflore intestinale. Les études toxicologiques montrent que l'administration parentérale de l' α -CD et la β -CD est contre-indiquée.

Les cyclodextrines natives présentent des activités hémolytiques. Les effets hémolytiques des CD sur l'érythrocyte humain dans un tampon phosphate sont par ordre de sévérité : β -CD > α -CD > γ -CD (Uekama, 2004 ; Stella et He, 2008). La lyse des érythrocytes est la conséquence d'un effet osmotique hypotonique et de l'extraction de constituants membranaires (cholestérol, phospholipides et protéines). Ces études *in vitro*, de lyse cellulaire, n'indiquent pas la toxicité *in vivo* mais permettent seulement de classer les CD selon leur potentiel de déstabilisation des membranes cellulaires. En effet, l'implication toxicologique *in vivo* de ces cyclodextrines natives reste négligeable (Stella et He, 2008). Les doses létales pour chacune des CD natives sont résumées dans le tableau 8.

❖ L' α -cyclodextrine

Une prise orale d' α -cyclodextrine est généralement bien tolérée et n'induit pas d'effets secondaires notoires (Lina et Bär, 2004). Aucune absorption par le tractus intestinal haut n'est détectée, cette molécule est clivée par la flore intestinale du colon et du caecum. Après administration per os chez le rat, cette molécule est excrétée pour 60% en CO₂, dans les métabolites pour 26-33% et dans les selles et l'urine pour 7-14. Par voie parentérale, l' α -cyclodextrine provoque des irritations après une injection intra-musculaire. Après injection

par voie intra-veineuse, elle est éliminée pour 90% par la voie rénale sans dégradation majeure. Une étude a évalué les effets embryotoxiques et tératogènes de l' α -CD chez la lapine. Avec une dose supérieure à 20% du poids total de nourriture, aucune modification de la capacité de reproduction de la lapine, aucune malformation ou anomalie chez les lapereaux n'ont pu être constatées (Waalkens-Berendsen et al. 2004). La dose maximale d' α -cyclodextrine comprise dans un médicament commercialisé est de 1.3 mg/jour pour une injection intra veineuse (Brewster et Lofsston, 2007).

❖ La β -cyclodextrine

Après administration orale, cette cyclodextrine se lie avec le cholestérol et une infime quantité (1-2%) est absorbée au niveau du tractus intestinal haut, mais pas dans la partie basse. Les bactéries présentes dans le colon et le caecum métabolisent cette molécule. Son utilisation en concentration élevée n'est pas recommandée car sa dégradation par la flore bactérienne et sa fermentation dans le colon peut provoquer des diarrhées et la production de gaz. Cette cyclodextrine est incluse dans des médicaments à prise orale, dans des formulations rectale et buccale ainsi que dans des applications topiques.

Toute administration par voie parentérale est exclue car cette molécule a une solubilité aqueuse basse et peut provoquer une néphrotoxicité.

La FDA (Food and Drugs Agency) a autorisé l'utilisation de la β -CD comme additif alimentaire (E459) à hauteur de 0.5 à 2% selon les produits, suite à un rapport de l'OMS.

Tableau 8. Doses létales des cyclodextrines natives selon leur mode d'administration chez le rat (Del Valle 2004).

Voie d'administration	Cyclodextrines	Dose Létale 50 (mg/kg)
Orale	α - CD	> 10 000
	β -CD	>5 000
	γ -CD	>>8 000
Intra veineuse	α -CD	500-750

❖ **La γ -cyclodextrine**

Après administration orale, son absorption intestinale est négligeable (0.1%). Les enzymes du tractus intestinal haut la dégradent rapidement et complètement en glucose. Chez le rat, sa DL_{50} est supérieure à 8000 mg/kg par voie orale et de 4000 mg/kg par voie intraveineuse (Brewster et Loftsson, 2007). Elle est très peu métabolisée après injection intraveineuse. Cette cyclodextrine est probablement la moins toxique des trois molécules natives et semble être l'additif alimentaire de choix. Cependant, ses capacités de complexation sont moins intéressantes que celles de la β -cyclodextrine.

4.2. Les cyclodextrines modifiées

Le tableau 9 récapitule les études de la toxicité au niveau des cellules, du tractus gastro-intestinal, du rein, des effets sur la reproduction et du rôle joué dans la carcinogénèse et la génotoxicité des principales CD modifiées.

❖ **Les cyclodextrines modifiées hydrophiles**

Parmi les cyclodextrines modifiées, seules les 2 hydroxypropyl- β -CD (HP β -CD), la sulfobutyléther β -CD (SBE β -CD) et la β -CD sulfatée peuvent être injectées par voie parentérale en toute innocuité.

- HP β -CD est plus soluble et moins toxique que la molécule native. Elle est incluse dans de nombreuses spécialités commercialisées, à un dosage supérieur à 8g HP β -CD/jour par voie orale, (Gould et Scott, 2005). Elle est bien tolérée chez l'homme. Une diarrhée peut toutefois apparaître avec un traitement de 14 jours, à des doses de 16- 24 g HP β -CD/jour. (Brewster et al. 2007). La biodisponibilité orale de la HP β -CD est de 0.5 à 3.3% chez l'homme, avec 50 à 65% de la dose orale excrétée sans dégradation dans les selles, le restant étant métabolisé par la flore intestinale. Après injection intra veineuse, HP β -CD est presque totalement éliminée par filtration glomérulaire des reins. Cependant, l'administration de cette molécule doit être évitée pour les patients présentant une insuffisance rénale sévère. Dans des solutions injectables commercialisées, elle est incluse à un dosage supérieur à 16 g /jour (Gould et Scott. 2005).
- Les études toxicologiques concernant l'HP γ -CD sont encore plus rares. L'HP γ -CD est déjà incorporée dans deux produits commercialisés : une solution ophtalmique

(Voltaren®, Diclofenac) et un produit de diagnostic parentéral (Cardio Tec®, Tc-99 teoboroxime).

- La toxicologie de la SBEβ-CD est peu étudiée, cependant des études montrent qu'elle est non toxique à des doses intraveineuses et orales modérées (Irié et Uekama, 1997). Cette molécule est déjà utilisée dans la formulation de certains médicaments tels que le voriconazole (Vfend®, solution parentérale). Le voriconazole (10mg/mL) est solubilisé dans une solution contenant 16% (m/v) de SBEβ-CD. Une accumulation de sodium de SBEβ-CD est constatée chez des patients dialysés traités par voriconazole intra veineux. Aucun effet toxique n'est observé et les doses accumulées atteignent des valeurs inférieures à celles observées dans des études de toxicité chez l'animal (von Mach et al. 2006).

Tableau 9. Tableau récapitulatif de la toxicité des cyclodextrines modifiées (Stella et He, 2008).

Toxicité cellulaire	Hémolyse induite par ordre de sévérité avec : DM-β-CD > HP- β -CD > HP- γ-CD > HP- α-CD > S- β -CD.
Toxicité du tractus gastro-intestinal	Apparition de diarrhée réversible, chez l'animal, après administration orale de HP-β-CD et SBE-β-CD
Toxicité rénale	*Lésion cellulaire et dysfonction rénale irréversible avec M-β-CD *Vacuolation de l'épithélium tubulaire sans dysfonction rénale avec injection IV de SBE- β -CD (80 mg/kg) et de HP- β -CD (50 mg/kg)
Toxicité dans la reproduction	*Hautes doses d'HP- β-CD et de SBE-β-CD : toxicité maternelle ? *Aucun effet tératogène n'est observé avec HP-β-CD et SBE-β-CD
Carcinogénèse Génotoxicité	*Aucun effet carcinogène observé chez la souris après administration per os de 5000 mg/kg/j HP-β-CD *Chez le rat, une administration per os, d'HP-β-CD pendant 12 mois, induit l'apparition d'une hyperplasie pancréatique qui se transforme en néoplasie à 24 mois (mais pas de risque carcinogène chez l'homme). * HP-β-CD n'est ni mutagène ni génotoxique
Etude clinique humaine	*Bonne tolérance de l'HP-β-CD (per os, 400mg/kg/j) (risque de diarrhée) (injection par voie IV, 470mg/kg/j) *Bonne tolérance de la SBE -β-CD (per os, 12g) (injection par voie IV, 96 mg/kg/2x/j puis 80mg/kg/2X/j pendant 5 jours).

❖ Les cyclodextrines modifiées lipophiles

La biodisponibilité orale de la RAMEB (Randomly Methylated β-CD) est environ de 5% chez le rat, et plus de 90% de la molécule sont excrétés sans modification de structure dans les selles (Wacker-Chemie, 1997).

Les cyclodextrines méthylées sont absorbées en grande quantité dans le tractus gastro-intestinal vers la circulation sanguine, et induisent des effets toxiques après une administration par voie parentérale (Irie and Uekama, 1997). Les dérivés méthylés augmentent l'hémolyse par diminution des effets de répulsion électrostatique avec la membrane porteuse de charges similaires.

Avec un modèle de culture cellulaire *in vitro*, des effets inflammatoires et cytotoxiques sont mesurables avec une quantité de RAMEB de 10%, alors que 2 et 5% n'induisent aucune lésion tissulaire même après 5 jours d'exposition répétée (Boulmedarat et al. 2005). En revanche, Ulloth et al. (2007) montrent une toxicité significative (induction d'apoptose) à des doses moins importantes (0.25% de β -CD méthylée) sur des cellules nerveuses différenciées (Ulloth et al. 2007).

5. Intérêts de la complexation avec des cyclodextrines

Les molécules invitées complexées par les CD sont micro-encapsulées individuellement. Ceci permet de modifier avantageusement leurs propriétés physiques et chimiques.

5.1. Dans le domaine pharmaceutique

Les CD sont exploitées par l'industrie pharmaceutique comme excipient de formulation dans les médicaments. Les nombreuses modifications structurales apportées aux CD permettent d'améliorer leurs propriétés physico-chimiques (par rapport aux CD natives), élargissant d'autant leur domaine d'utilisation pharmaceutique, surtout dans la recherche de ciblage thérapeutique.

❖ Augmentation de la **stabilité** d'une molécule vis-à-vis :

- de la lumière : la photostabilité du filtre UV-A, l'avobenzone est augmentée par complexation avec HP β -CD (Yang et al. 2008).
- de la chaleur : la déshydrogénase complexée avec une α -CD présente une stabilité thermique améliorée et renforce sa stabilité structurale (Barzegar et al. 2008).
- de l'oxygène et de l'hydrolyse alcaline et enzymatique : la doxorubicine complexée avec une HP β -CD/ HP γ -CD est plus résistante à la décomposition acide (Brewster et al. 1992), du pH gastrique : la complexation avec une

SBE- β -CD permet d'améliorer la stabilité de l'oméprazole (un inhibiteur de la pompe à proton) en pH acide (Agatonovic-Kustrin et al. 2007).

- ❖ Augmentation de la **solubilité** et de la biodisponibilité. La biodisponibilité résulte à la fois d'une augmentation de la solubilité et de l'absorption. C'est le cas pour un anticancéreux, l'imatinibe dont la solubilité est 10 fois supérieure après complexation avec la β -CD et la RM- β -CD (Béni et al. 2007), l'oméprazole (médicament traitant l'ulcère gastrique ou duodéal) complexé avec la β -CD et la β -CD méthylée a une amélioration de sa solubilité d'un facteur 1.7 à 3.4 (Figueiras et al. 2007), le diclofénac a une solubilité augmentée par une complexation avec la HP β -CD (McCormack et Scott, 2008).
- ❖ **Amélioration de l'effet thérapeutique** : la complexation de CD avec la ribavirine permet une amélioration de l'activité de la ribavirine dans le traitement du virus de la rougeole (étude expérimentale chez le rat) (Grancher et al. 2004), l'effet et l'intensité thérapeutique du cefdinir est augmenté après complexation avec la β -CD et HP- β -CD (Aleem et al. 2008).
- ❖ **Diminution des effets secondaires** : Les CD sont utilisées pour diminuer les irritations causées par certaines drogues. L'augmentation de l'efficacité de la drogue, due à une meilleure solubilité par complexation avec la CD, permet de réduire la dose effective de cette drogue et ainsi de diminuer sa toxicité : c'est le cas pour le ganciclovir, molécule antivirale traitant le cytomégalovirus (Nicolazzi et al. 2001).
- ❖ La complexation de sels de diclofénac avec l'HP β -CD permet d'obtenir, après injection intra-veineuse, une analgésie plus rapide avec une fréquence de thrombophlébite moins importante qu'avec une formulation de diclofénac utilisant du polyéthylène glycol et de l'alcool benzyl comme excipient (Leeson et al. 2007).
- ❖ **Ciblages thérapeutiques** : l'apparition de CD modifiées permet d'espérer la possibilité de ciblage moléculaire de médicaments. Actuellement les CD branchées avec des sucres auraient l'intérêt d'atteindre les récepteurs lectines présents sur de nombreuses cellules de l'organisme. On peut imaginer toutes sortes de modifications des CD selon la cible à atteindre (cf le paragraphe sur les cyclodextrines modifiées).

❖ Applications des cyclodextrines dans la libération de drogues

- **Par voie orale.** La CD permet l'absorption de molécules peu hydrosolubles, et permet sa libération au niveau de la muqueuse sublinguale ou buccale. Cette modification est la conséquence d'une meilleure perméabilité des muqueuses à la drogue dont la biodisponibilité est améliorée par complexation avec une CD. La complexation avec HP- β -CD permet d'augmenter la solubilité du carvedilol (bêta bloquant) et de prolonger sa libération buccale (Cappello et al. 2006).
- **Par voie parentérale.** La complexation de molécules avec HP β -CD et SBE β -CD est très largement étudiée de par la solubilité aqueuse élevée et la faible toxicité de ces cyclodextrines. Des drogues, dont les propriétés physico-chimiques (solubilité et stabilisation aqueuse insuffisantes, réactions au point d'injection importantes) contre indiquent l'injection parentérale, peuvent être délivrées par cette voie après association avec une CD modifiée hydrophile. Ainsi, la complexation de l'oméprazole avec HP β -CD (40% m/v) permet d'augmenter sa solubilité et sa stabilité, et la rendre compatible avec une formulation parentérale (Stevens, 1999 ; Holvoet et al. 2007).
- **Par voie ophtalmique** Les CD sont aussi utilisées dans la préparation de collyre. Les CD améliorent les mêmes propriétés physico-chimiques des drogues invitées complexées que précédemment citées. Ainsi, la complexation avec HP β -CD de la puerarine, un agent bêta-bloquant permet d'optimiser son absorption ophtalmique, en application topique (Wu et al. 2007).
- **Par voie nasale.** Dans un comprimé muco-adhésif, l'HP β -CD majeure de 3.5 la perméation de la buspirone (anxiolytique non benzodiazepinique) à travers la muqueuse nasale, sans entraîner de cytotoxicité (Khan et al. 2008).
- **Par voie rectal, dermique/ transdermique.** Ce sont autant d'applications de ces macrocycles dans la formulation de nombreux médicaments. La complexation du meloxicam (anti inflammatoire) avec la β -CD, dans une formulation liposome, permet d'améliorer la libération transdermique de la molécule active (Jain et al. 2008).

5.2. Autres domaines

- ❖ **En agroalimentaire** : les cyclodextrines sont des exhausteurs de goût qui permettent un ajout facile de composés gustatifs, des conservateurs par action anti-oxydante (Szejtli et Szente, 2005), modifient l'élasticité des pâtes alimentaires (Fujishima et al. 2001), permettent la production de dérivés laitiers sans graisse par extraction du cholestérol (Alonso et al. 2009).

- ❖ **En chimie analytique** : par complexation, les cyclodextrines ajoutées à la phase stationnaire en CLHP (Chromatographie en phase Liquide Haute Performance) permettent de séparer diverses molécules d'un produit (Chen et al. 2008). Les cyclodextrines sont greffées sur la phase stationnaire (silice en général). L'emploi de cyclodextrine permet de changer l'affinité des composés à analyser pour la phase stationnaire, et donc de modifier leur temps de rétention.

D'autre part, une propriété remarquable des cyclodextrines est qu'en complexant certaines molécules photosensibles, cela augmente leur capacité de réponse à l'excitation (fluorimétrie notamment).

- ❖ **En dépollution des sols** : les cyclodextrines améliorent la biodisponibilité de molécules très peu solubles et améliorent ainsi leur dégradation par les microorganismes qui se nourrissent de composés dissous dans l'eau. La CD est un bon agent solubilisant des molécules chimiques organiques hydrophobes contaminant des sols (Wan et al. 2009), mais aussi dans le traitement des eaux afin d'augmenter l'encapsulation et l'adsorption de contaminants organiques (Allabashi et al. 2007).

- ❖ **Applications en cosmétologie**

De nombreuses applications industrielles existent avec les cyclodextrines.

 - stabilisation de composants d'écran solaire en cosmétique (Scalia et al. 2007).
 - l'utilisation de β -CD et HP β -CD améliorent la stabilité et la solubilité dans l'eau de molécules odorantes ce qui permet leur libération progressive et évite une évaporation trop rapide de ces composants (Numanoğlu et al. 2007).

6. Les spécialités à base de cyclodextrines actuellement commercialisées

Les cyclodextrines sont déjà incorporées dans de nombreux médicaments appartenant à différentes classes thérapeutiques. Toutes les molécules commercialisées, complexées avec des cyclodextrines, sont résumées dans le tableau 10 en France et dans le tableau 11 dans le monde.

Tableau 10. Liste des spécialités pharmaceutiques incluant dans leur composition une cyclodextrine, commercialisées en France (Thériaque).

Nom commercial	Substance active Type de CD	Classe pharmaco - thérapeutique	Voie d'administration	AMM Commer- cialisation
Abilify® 7.5mg	Aripiprazole β-CD sulfobutyl ether	Anti- psychotique neuroleptique	Solution injectable Voie parentérale, intra-musculaire	03/2008 05/2008
Alairgix® 10mg	Cetirizine chlorhydrate β-CD	Antiallergique Antihistaminique	orale : comprimé à sucer	03/2005 01/2006
Alopexy® 2%	Minodixil γ-CD	Anti alopécique Antihypertenseur Vasodilatateur musculotrope	Application cutanée	01/2006 10/2006
Brexin® 20mg	Piroxicam β-CD	Antalgique-analgésique Antiagrégant plaquettaire, AINS, antipyrétique Antirhumatismal	orale	03/2006 1993
Calprimum® 500mg	Calcium carbonate/β-CD	Anti-acide gastrique Antiulcéreux	orale	12/1996 1998
Caverject Dual® 0.01mg/0.5mL 0.02mg/0.5mL	Alprostadil α-CD	Antiagrégant plaquettaire Stimulant érection Vasodilatateur musculotrope	Solution injectable: Voie parentérale, intra caverneuse	09/2005 07/2006
Cycladol® 20mg	Piroxicam β-CD	Antalgique-analgésique Antiagrégant plaquettaire, AINS, antipyrétique Antirhumatismal	orale	10/2002 1993
Edex® 10µg ou 20 µg/1mL	Alprostadil α-CD	Antiagrégant plaquettaire Stimulant érection Vasodilatateur musculotrope	Solution injectable: Voie parentérale, intracaverneuse	02/2003 1997
Indobiotic® collyre	Indometacine Gentamycine	Antiagrégant plaquettaire, AINS	ophtalmique	10/2004 09/1999

	β -CD hydroxypropyl	Antirhumatismal Antibactérien		
Indocollyre® 0.1%	Indometacine β -CD hydroxypropyl	Antiagrégant plaquettaire, AINS Antirhumatismal Antibactérien	ophtalmique	10/1996 1997
Nicorette microtab® 2mg	Nicotamine betadex, β -CD	Désintoxication tabagique	sublinguale	11/2007 2000
Sporanox® 10mg/mL	Itraconazole β -CD hydroxypropyl	Antifongique Inhibiteur enzymatique	Solution buvable Voie parentérale, intraveineuse	02/2007 07/2000
Taketiam® 200mg	Cefotiam hexetil chlorhydrate α -CD	Antibactérien	orale	08/1992 1994
Texodil® 200mg	Cefotiam hexetil chlorhydrate α -CD	Antibactérien	orale	08/1992 1993
True test	Sulfate de nickel HP- β -CD	Allergène	Dispositif intra dermique	?

Tableau 11. Liste des spécialités pharmaceutiques commercialisées dans le monde incluant dans leur composition une cyclodextrine (Brewster et Loftsson, 2007).

Nom commercial	Drogue/cyclodextrine	Formulation	Industriel/ Pays
Aerodiol®	17 β -oestradiol	Spray nasal	Servier/ Europe
Cardio Tec®	Tc99 Teoboroxime/ HP γ -CD	Solution IV	Bracco/ USA
Cetirizin®	Cetirzin/ β -CD	Chewing-gum, Tablettes	Losan Pharma/ Allemagne
Cicladon®	Piroxicam/ β -CD	Suppositoire	Arché/ Brésil
Clorocil®	Chloramphénicol/ RAMEL β -CD	Collyre	Oftalder/ Europe
Dexocort®	Hydrocortisone/ HP- β -CD	Solution	Actavis/ Europe
Flogene®	Piroxicam β -CD	Suppositoire	Aché/ Brésil
Geodon®	Ziprasidone mesylate/ SBE β -CD	Solution IM	Pfizer/ USA- Europe
Glymesason®	Dexaméthasone/ β - CD	Tablettes, ointment?	Fujinaga/ Japon
Lonmiel®	Benexare HCl/ β -CD	Capsules	Shionogi/ Japon
Meiact®	Céphalosporine/ β -CD	Tablettes	Meiji Seika/Japon

Mena- Gargle®	Iodine/ β -CD	Solution	Jyushin/ Japon
Mito Extra®	Mitomycine/ HP- β -CD	Injection IV	Novartis/Europe
Mobitil®	Meloxicam/ β -CD	Tablettes et suppositoires	Medical union Pharmaceuticals/ Egypte
Nimedex®	Nimesulide/ β -CD	Tablettes	Novartis/ Europe
Nitropen®	Nitroglycérine/ β -CD	Tablettes sublinguales	Pfizer/ Europe
Omebeta®	Omeprazole/ β -CD	Tablettes sublinguales	Betafarm/ Europe
Opalmon®	OP-1206	Tablettes	Ono/ Japon
Pansporine T®	Cefotiam-Hexétil HCl / α -CD	Tablettes	Takeda/ Japon
Propulsid®	Cisapride/ HP- β -CD	Suppositoires	Janssen/ Europe
Prostarmon E®	PGE2/ β -CD	Tablettes sublinguales	Ono/ Japon
Prostavastine®	PGE1/ α -CD	Solutions parentérales	Ono/ Japon
Rynathisol®	Dextromethorphan/ β -CD		Synthelabo/ Europe
Stada- Travel®	Diphénhydramine et chlortheophylline/ β -CD	Tablettes à mâcher	Stada/ Europe
Surgamyl®	Acide tiaprofenic/ β -CD	Tablettes	Roussel- Maestrelli/ Europe
Transillium®	Chlordiazepoxide/ β -CD	Tablettes	Gador/ Argentine
Vfend®	Voriconazole/ SBE β -CD	Solution I.V	Pfizer/ Europe
Voltaren®	Diclofenac/ HP- γ -CD	Collyre	Novartis/ Europe

7. Les techniques de préparation des complexes avec les cyclodextrines

Plusieurs techniques permettent la formation de complexes avec les cyclodextrines (Del Valle, 2004).

7.1. Co-précipitation

Cette méthode est la plus utilisée. Après dissolution de la CD dans de l'eau sous agitation, la molécule invitée est ajoutée. La concentration de la β -CD peut atteindre jusqu'à 20% (m/v) si l'invité tolère des températures élevées. Le précipité formé peut être collecté

par décantation, centrifugation ou filtration. Le précipité peut être lavé avec un peu d'eau ou tout autre solvant miscible à l'eau tel que l'alcool éthylique, le méthanol et l'acétone.

Le principal inconvénient de cette technique est lié au volume, du fait de la solubilité limitée de la CD, de grandes quantités d'eau sont nécessaires. La formation de complexe solide ou semi-solide peut être optimisée par l'utilisation d'additifs tels que l'éthanol, et pour les drogues basiques par l'adjonction d'ammonium. Les drogues non ionisées forment des complexes avec les CD plus stables que leurs homologues ionisés.

Selon la quantité d'eau utilisée pour le complexe, on obtient un co-précipité, un « slurry » (pâte visqueuse) ou une pâte solide.

7.2. Extrusion

La CD, l'invité et l'eau sont mélangés au fur et à mesure dans l'extruder. Le degré de mélange, la température de chauffe et le temps peuvent être contrôlés dans la cuve de l'extruder. Selon la quantité d'eau initiale, le complexe extrudé peut sécher en refroidissant ou dans un four. Du fait de la température générée, certaines molécules invitées labiles à la chaleur sont décomposées par cette méthode. Toutefois, cette technique présente l'intérêt d'être un processus continu et d'utiliser peu d'eau.

7.3. Le mélange sec

Certaines molécules invitées peuvent être complexées par simple mélange des deux poudres ensemble. Le temps de mélange nécessaire dépend de l'invité. Généralement, ce protocole est réalisé à température ambiante. Son principal avantage est de ne pas utiliser d'eau, sauf pour le rinçage, et ses inconvénients sont le risque de formation de croûtes des poudres, et l'obtention d'un mélange incomplet conduisant à une complexation insuffisante.

8. Séchage des complexes

Le séchage des complexes récoltés peut être obtenu par plusieurs méthodes : par séchage dans un four ou d'autres dessiccateurs, en évitant de détruire le complexe, ou encore par lyophilisation (Asbahr et al. 2009).

9. Méthodes de caractérisation des complexes

L'analyse du complexe est réalisée par diverses méthodes analytiques telles que la chromatographie liquide à haute performance (CLHP), par des techniques spectroscopiques ou thermo analytiques.

9.1. Chromatographie Liquide à Haute Performance

La chromatographie liquide à haute performance est une méthode d'analyse très sensible permettant de doser une quantité infime de molécules chimiques en solution et de déterminer la constante de stabilité (K_c) des complexes (De Melo et al. 2008).

Uekama a observé que le temps de rétention des acides et des bases faibles diminue significativement par addition d' α et de β -CD dans la phase mobile (tampon phosphate), la phase stationnaire étant plus une phase échangeuse d'ions (Uekama et al. 1978). La mesure des temps de rétention, eux-mêmes directement proportionnels aux rapports de distribution des concentrations entre la phase stationnaire et la phase mobile, permet d'accéder à la valeur de K_c). Des travaux (Loftsson et Brewster, 1996) ont montré l'intérêt de la CLHP pour déterminer la valeur de la constante de stabilité K_c . La cyclodextrine est introduite dans la phase mobile à différentes concentrations. La molécule étudiée (amox) constitue le soluté de l'échantillon injecté. Les valeurs du facteur de rétention obtenues pour ce soluté permettent de déterminer s'il y a formation d'un complexe, de connaître la nature du complexe formé ainsi que la valeur de la constante de stabilité (De Melo et al. 2008 ; Moeder et al.1996; Bielejewska et al. 2002).

9.2. Etude par spectrométrie

❖ La spectroscopie infra-rouge

La spectroscopie infrarouge mesure l'excitation vibrationnelle des atomes autour des liaisons qui les unissent suite à l'exposition à des radiations électromagnétiques. La position des bandes d'absorption dépend de la nature des groupes fonctionnels qui sont présents dans une molécule. Cette méthode d'analyse permet d'étudier l'arrangement des atomes et les distances interatomiques. Ces mesures sont généralement réalisées avec un échantillon à l'état solide. Les spectres obtenus montrent une superposition des spectres de chacun des constituants si on étudie leur mélange physique, en revanche les spectres des complexes présentent généralement un léger déplacement des pics. Ces modifications discrètes indiquent

qu'il n'y a pas de liaisons chimiques fortes (type liaison covalente) entre les composés, mais seulement une interaction : différence de géométrie dans la molécule invitée, dissociation de liaisons hydrogène intermoléculaire dans cette même molécule, ou encore établissement de liaisons hydrogènes de faible énergie entre les deux composés. Chaque bande du spectre caractérise un groupe fonctionnel de la molécule, et leur déplacement permet de désigner quelle partie de la molécule invitée interagit avec la CD.

❖ La Résonance Magnétique Nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet de déterminer les structures tridimensionnelles des molécules organiques en solution. Cette technique est basée sur l'absorption d'énergie par certains atomes dans des molécules placées dans un champ magnétique. Cette absorption se traduit par une rotation autour de l'axe nucléaire du noyau chargé, ce spin nucléaire est à l'origine du signal RMN. Les spectres de RMN sont indispensables pour affirmer l'inclusion d'une molécule dans une CD. Pour cela, il est possible de réaliser le spectre du proton (RMN ^1H) qui renseigne sur la direction de pénétration de la molécule invitée dans la cavité de la β -CD par identification de la position de ses protons. Les spectres RMN du carbone 13 donnent également des informations concernant les propriétés dynamiques du complexe. Cette méthode permet de visualiser les déplacements des bandes de résonance des protons internes de la CD (H3, H5) en cas d'inclusion d'une molécule, alors que les protons externes restent peu affectés (H1, H2, H4, H6). On étudie de même toutes modifications des bandes de résonance des protons de la molécule invitée afin de déterminer les atomes interagissant avec la CD. Lorsqu'il y a un complexe, les variations de la densité électronique autour de certains noyaux causent leur blindage ou déblindage par rapport au champ magnétique externe. Un déplacement de certains pics est observé : les pics des atomes d'hydrogène intervenant dans des liaisons faibles révèlent alors un phénomène de blindage ou déblindage selon qu'ils se déplacent respectivement vers des champs faibles ou des champs forts. Ainsi, les hydrogènes H3 et H5, situés à l'intérieur de la cavité, subissent un phénomène de déblindage lors de l'interaction avec la molécule invitée, uniquement lorsqu'il y a formation d'un complexe d'inclusion de la molécule invitée qui rentre à l'intérieur d'une CD.

9.3. Méthodes thermo-analytiques : Thermogravimétrie, calorimétrie différentielle à balayage (DSC), spectrométrie de masse

Nous avons utilisé diverses méthodes thermo-analytiques pour caractériser le complexe amox- β -CD. L'analyse thermique différentielle permet normalement d'observer des accidents thermiques (endo- ou exothermiques) caractéristiques de chaque produit en fonction du temps et de la température. Le spectre d'une molécule en thermogravimétrie et en calorimétrie différentielle présente des points caractéristiques en fonction de la température : point de fusion, d'ébullition et de sublimation, représentant le passage à différents états : état amorphe, état cristallin, état de fusion. Quand deux molécules s'associent pour former un complexe, on observe un déplacement de ces points vers des températures supérieures pour la molécule invitée ou alors une disparition dans l'intervalle de température où la CD est décomposée. Toutes modifications structurales de la molécule invitée avant le début de la dégradation thermique et l'oxydation des CD peuvent être évaluées par ces techniques.

OBJECTIFS

Dans le cadre d'une étude préliminaire, nous avons montré que des bactéries appartenant au genre *Desulfovibrio* colonisaient préférentiellement les patients atteints de parodontite. La présence de ces bactéries dans des poches parodontales peut être le reflet d'un environnement favorable à leur croissance ou représenter un facteur étiopathogénique de développement des maladies parodontales.

Dans cette étude, nous avons exploré, en premier lieu, le rôle pathogénique potentiel joué par *D. desulfuricans* et *D. fairfieldensis*. Nous avons tout d'abord évalué la capacité de ces bactéries à envahir voire à se multiplier dans des cellules non phagocytaires professionnelles telles que les cellules épithéliales. Ces travaux ont été basés sur la détermination des concentrations des bactéries intracellulaires viables après culture ainsi que sur celle de la localisation intracellulaire de ces microorganismes par microscopie électronique à transmission et microscopie confocale. L'implication des microfilaments d'actine et/ou des microtubules dans le processus d'internalisation a également été explorée. Enfin, la réponse cytokinique (IL-1 β , IL-6 et d'IL-8) des cellules épithéliales infectées par ces bactéries a été évaluée à l'aide de méthodes ELISA.

Certaines souches de *Desulfovibrio* spp. produisent des β -lactamases et de ce fait sont résistantes à certaines β -lactamines dont l'amoxicilline. Il a été montré que ces antibiotiques pouvaient être protégés de l'action des β -lactamases de par leur complexation avec des β -CD. Par ailleurs, la complexation d'autres agents antimicrobiens avec ces macrocycles a permis d'augmenter leur activité intracellulaire.

Nous avons donc évalué, dans une deuxième partie de ce travail, l'effet protecteur des β -CD vis-à-vis de l'amoxicilline en comparant l'activité inhibitrice de cet antibiotique, utilisé seul ou complexé, sur des souches de *Desulfovibrio* ou appartenant à d'autres espèces présentes au niveau du parodonte, productrices de β -lactamases. Une caractérisation physico-chimique complète du complexe amoxicilline- β -CD a été auparavant réalisée par des méthodes spectrométriques, thermo-analytiques et par CLHP. La capacité des β -CD à augmenter l'effet bactéricide intracellulaire de l'amoxicilline a été étudiée à l'aide d'un modèle d'infection intracellulaire préétabli (cellules KB infectées par *P. gingivalis*) avant d'évaluer, en cas de résultats positifs, l'activité de l'amoxicilline complexée sur les formes intracellulaires de *Desulfovibrio*.

MATERIELS ET METHODES

I. ETUDE DU POUVOIR INVASIF DE *DESULFOVIBRIO* SPP.

1. Culture cellulaire

L'étude du pouvoir invasif de *Desulfovibrio* spp a été réalisée à l'aide d'un modèle de culture cellulaire (cellules KB) utilisé par d'autres auteurs étudiant le pouvoir invasif de bactéries parodontopathogènes (Houalet-Jeanne et al. 2001). Ces cellules ayant une capacité illimitée à se multiplier, elles sont plus faciles d'entretien que les cellules épithéliales humaines primaires dont le nombre de repiquage est restreint, bien que l'invasion bactérienne dans ces dernières soit plus grande qu'avec des cellules de lignée continue.

- **Cellules KB et milieu de culture**

La lignée cellulaire utilisée, cellules KB, ATCC CL17, était constituée de cellules issues de carcinome épidermoïde de la cavité buccale. Le milieu RPMI 1640, complété avec de la L-glutamine à 1% (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et du sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio, Les Ullis, France) à 10% (v/v), a été utilisé comme milieu de culture. Ce milieu a été supplémenté avec de l'amikacine (16 µg/L) (Merck, Lyon, France), de la gentamicine (2.5 µg/L) (Schering- Plough, Herouville Saint Claire, France) pour le protocole d'évaluation de l'amoxicilline complexée et de l'amoxicilline (128 µg/mL) pour les protocoles de biologie, et de l'amphotéricine B (1.25 µg/L) (Bristol-Myers Squibb, Puteaux, France) afin de prévenir toute contamination bactérienne ou fongique.

- **Repiquage des cellules KB**

L'entretien de la lignée était assuré par un repiquage hebdomadaire, nécessaire pour maintenir un tapis confluent et une croissance exponentielle. Après avoir éliminé le milieu de culture, les cellules étaient lavées une fois avec une solution de tampon phosphate saline (Phosphate Buffer Saline) préchauffée à 37°C afin d'éliminer les résidus de SVF. Le tapis cellulaire était alors incubé avec une solution de trypsine- versène (Gibco) préchauffée à 37°C pendant quelques minutes. Les cellules épithéliales étaient ensuite reprises dans 5 mL de milieu de croissance et mises en suspension par aspiration et refoulement à la pipette.

La concentration des cellules viables a été déterminée par comptage dans une cellule de Nageotte après coloration avec du Bleu de Trypan (coloration en bleu des cellules mortes). Les suspensions ont ensuite été réparties en flacons Falcon (75 mL), lamelles avec puits Labtek II™ Nunc (Gibco Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ou plaques de 24 puits selon les besoins.

Le volume de la suspension finale à répartir a été calculé de la manière suivante :

$$V_F = V_I \times \frac{C_F}{C_I}$$

Volume de la suspension finale à répartir (mL) = V_F

Volume utilisé de la suspension initiale (mL) = V_I

Concentration cellulaire finale = C_F

Concentration cellulaire initiale = C_I

Les concentrations cellulaires finales étaient de 10^5 KB/ puits pour les plaques 24 puits, et de 5.10^4 KB /puits pour les Labtek II, 8 puits.

2. Culture bactérienne

Les souches suivantes de *Desulfovibrio* spp. ont été utilisées: *Desulfovibrio fairfieldensis* ATCC 700045, *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 et *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 a été utilisé comme contrôle positif.

Toutes les souches ont été conservées dans du BHI (Brain Heart Infusion) ou du bouillon Brucella contenant 15% (m/v) de glycérol à -80°C jusqu'à utilisation. Avant d'être testées, les souches ont été repiquées sur Brucella agar (Becton- Dickinson, Le Pont de Claix, France) supplémenté avec 5% de sang de mouton défibriné (Oxoid) à 35°C sous atmosphère anaérobie.

3. Protocole d'invasion des cellules KB et détermination des concentrations des bactéries intracellulaires viables

Pour chaque souche testée, une suspension des cultures préalablement obtenues (après 48 h [*P. gingivalis* ATCC 33277] ou 72 h d'incubation [*D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. desulfuricans* ATCC 27774 et *D. desulfuricans* ATCC 29577.]) sur milieu gélosé a été réalisée en milieu RPMI. La densité de chaque suspension a été ajustée à une valeur de 0.5 unité de Mac Farland, soit 1.5×10^8 bactéries/ mL. Des dilutions ont ensuite été effectuées dans du milieu RPMI afin d'obtenir un ratio ou MOI (Multiplicity of Infection) de 100 bactéries par cellule KB. Ce ratio a été choisi car il a été montré par d'autres auteurs qu'il permettait d'obtenir un taux d'internalisation bactérienne optimale (Yilmaz et al. 2003).

La suspension bactérienne a été mise en contact avec des cellules KB confluentes en monocouche dans des plaques de 24 puits.

Après 2 h d'incubation à 37°C, les bactéries non adhérentes étaient éliminées par trois lavages avec du milieu RPMI. Les bactéries adhérentes étaient lysées par incubation des monocouches infectées avec du milieu contenant du métronidazole (200 µg/mL) et de la gentamicine (300 µg/mL) pendant 1 h. Ces deux antibiotiques ont été utilisés à des concentrations similaires à celles rapportées par d'autres auteurs qui, dans des travaux concernant l'étude du pouvoir invasif d'autres bactéries pathogènes, ont également démontré l'innocuité de ces molécules vis-à-vis des cellules en culture. Ces concentrations étaient largement supérieures aux concentrations minimales inhibitrices de ces antibiotiques, par ailleurs connus pour être bactéricides, pour chacune des souches testées. De plus, lors de chaque expérimentation, nous avons contrôlé l'efficacité de ces antibiotiques en déterminant (par culture) les concentrations de bactéries viables dans les surnageants des cellules KB préalablement traitées avec ce mélange antibiotique. Nous avons ainsi pu observer que le nombre de bactéries extracellulaires viables par puits ne dépassait pas 0.1% du nombre de bactéries inoculées initialement.

Le milieu de culture cellulaire était ensuite éliminé et les cellules étaient lavées trois fois avec du PBS. Afin de déterminer le pouvoir invasif des souches testées, les bactéries intracellulaires étaient alors libérées en lysant les cellules KB par incubation (20 min) avec de l'eau distillée. Pour évaluer la persistance intracellulaire et la multiplication des bactéries dans les cellules KB, les monocouches infectées étaient incubées, avant d'être lysées, dans un milieu sans antibiotique ni SFV pendant 24, 48 et 72 h. Dans les deux derniers cas, ce milieu était renouvelé toutes les 24 h. Tout au long du protocole d'infection, les cellules KB ont été observées à l'aide d'un microscope inversé afin de contrôler leur morphologie et leur confluence.

Des dilutions sérielles des lysats, obtenus à 2, 24, 48 et 72 h, étaient alors réalisées dans du bouillon Brucella. Pour chaque dilution, des aliquotes de 0.1 mL ont étéensemencés sur des géloses Brucella qui ont été ensuite incubées à 37°C sous atmosphère anaérobie. Le nombre de bactéries intracellulaires a ensuite été déterminé par comptage du nombre de colonies et exprimé en UFC (Unité Formant Colonies) par puits.

4. Inhibition de l'internalisation

L'effet d'un inhibiteur de la polymérisation des microfilaments d'actine (cytochalasine D, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) et d'un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (nocodazole, Sigma) sur l'internalisation bactérienne a été étudié. La cytochalasine D est un inhibiteur de la polymérisation de l'actine g (actine globulaire) et coupe l'actine f (actine fibrillaire) empêchant ainsi le réarrangement du cytosquelette impliqué dans l'internalisation des bactéries dans les cellules eucaryotes. Le nocodazole se fixe sur l'arginine de la tubuline β qui forme avec la tubuline α les microtubules. Les microtubules se polymérisent et se dépolymérisent constamment. L'ajout de nocodazole déplace cet équilibre vers la dépolymérisation des microtubules.

Des solutions mères d'inhibiteurs ont été préparées dans du DMSO et congelées à -20°C avant utilisation. Ces solutions ont été diluées dans du RPMI non supplémenté pour obtenir une concentration finale de $1\ \mu\text{g/mL}$ de nocodazole et $10\ \mu\text{g/mL}$ de cytochalasine D. Les cellules KB ont été incubées avec la cytochalasine D pendant 30 min avant l'infection bactérienne. Le nocodazole était ajouté aux monocouches maintenues pendant 1 h à 4°C . Les cellules KB étaient ensuite incubées à 37°C pendant 30 min avant l'ajout des bactéries. L'étude du pouvoir invasif des bactéries a ensuite été menée selon le protocole d'invasion précédemment décrit. Pour chaque souche de *Desulfovibrio* testée, le nombre de bactéries intracellulaires viables a été déterminé après 2 h d'infection. A la concentration utilisée, les inhibiteurs n'affectent ni la viabilité des cellules épithéliales (cf. examen de la confluence de la monocouche et test d'exclusion au bleu de Trypan), ni la viabilité des bactéries (cf. étude de survie des bactéries après contact de 2 h avec les inhibiteurs en milieu liquide).

5. Etude ultra structurale des cellules KB infectées

5.1. Microscopie électronique à balayage

Des cellules KB préalablement mises en culture dans des chambres à lame Lab-Tek™ (chamber slide system™, Nelge Nunc international, Naperville, USA) puis infectées (2 h) selon le protocole précédemment décrit à un MOI de 100 ont fait l'objet du prétraitement suivant :

- lavage (3 fois) avec du PBS
- fixation avec du tampon glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2, pendant une nuit à 4°C
- lavage avec du PBS

- fixation avec du tampon cacodylate avec 7% de sucrose (20 minutes)
- lavage avec du PBS
- déshydratation par immersion dans des solutions alcooliques de concentrations croissantes (30°, 50°, 70°, 80°, 90° et 100°) pendant 5 minutes à chaque fois
- métallisation avec de l'or après immersion des lames dans du HMDS (hexaméthylsilane, Sigma, Saint Louis, USA), et séchage (15 minutes).

L'observation a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à balayage Stereoscan 240 (Cambridge instrument, Londres, GB).

5.2. *Microscopie électronique à transmission*

Des cellules KB préalablement mises en culture des plaques de 24 puits puis infectées (2 h) selon le protocole précédemment décrit à un MOI de 100 ont fait l'objet du prétraitement suivant :

- fixation dans une solution de glutaraldéhyde à 2.5% dans un tampon cacodylate à 0.1M, pH 7.2 à 4°C, pendant toute la nuit/2 heures
- lavage (2 x 3 h) puis immersion (une nuit à 4°C) dans un tampon cacodylate
- immersion dans un tampon cacodylate à 1% d'acide osmique à 4°C
- lavage rapide dans du tampon cacodylate
- déshydratation par immersion dans des solutions alcooliques de concentrations croissantes (solution à 30°, 50°, 70°, 80°, 90° [bains de 5 minutes] - solution à 100° [3 bains de 20 minutes]) et dans une solution de propylène oxyde (3 bains de 20 minutes)
- pré- imprégnation dans un mélange d'épon et d'alcool 100° (vol/ vol), pendant une heure
- imprégnation dans l'épon pur (une nuit) puis, après avoir recouvert d'épon frais, polymérisation à 56°C pendant 48 h
- découpage de la plaque et réalisation de coupes ultra fines (70 nm) à l'aide d'un ultra microtome.

L'observation des coupes a été réalisée à l'aide d'un microscope électronique à transmission Philips CM12 à 80 kV.

5.3. *Microscopie confocale*

L'étude de la localisation *Desulfovibrio* à l'intérieur des cellules KB a été réalisée par microscopie confocale après immunomarquage de ces bactéries par des IgG spécifiques obtenus par immunisation chez le lapin.

5.3.1. Obtention et étude de la réactivité et de la spécificité des anticorps anti-*Desulfovibrio*

▪ **Préparation de la suspension antigénique et obtention des anticorps**

Une suspension de *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (10^8 bactéries/ mL) a été réalisée dans du PBS à partir de cultures obtenues sur milieu gélosé après 72 h d'incubation et lavées dans du PBS. Cette suspension a été déposée dans une boîte de pétri vide puis exposée aux rayonnements ultraviolets (253.7 nm) d'une hotte à flux laminaire (Microflow Peroxide Advanced Bio Safety Cabinet Class II, Bioquell, Alfortville, France) pendant 10 min.

Des essais préalables – étude de la viabilité (détermination des UFC sur milieu gélosé après dilutions sérielles et incubation en atmosphère anaérobie pendant 72 h) des bactéries après exposition pendant 10, 20, 30, 40 ou 50 min aux UV – nous ont permis de vérifier que cette durée permettait d'obtenir une inactivation totale de la population bactérienne utilisée.

Les suspensions bactériennes inactivées ont été adressées au Laboratoire Covalab (Lyon, France) où l'immunisation des lapins a été effectuée par injection intramusculaire. Des anticorps polyclonaux anti-*Desulfovibrio* ont été obtenus.

▪ **Etude de la réactivité et de la spécificité des anticorps anti-*Desulfovibrio***

La réactivité et la spécificité des anticorps anti-*Desulfovibrio* ont été déterminées en testant différentes dilutions de ces anti-sérums vis-à-vis de 3 souches de *Desulfovibrio* (*D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. desulfuricans* ATCC 29577 et *D. desulfuricans* ATCC 27774) et d'autres souches appartenant à des espèces potentiellement parodontopathogènes (*Fusobacterium nucleatum* LBN 301, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella buccae* ATCC 33574 et *Prevotella intermedia* ATCC 25611).

Pour chaque souche testée, une suspension bactérienne a été préparée dans du tampon PBS, et déposée sur une lame à immunofluorescence (6×10^6 bactéries/ puits). Après séchage des lames pendant 30 minutes, les bactéries ont été fixées avec de l'éthanol à 90% à froid,

pendant 10 minutes. Les sites non spécifiques ont été saturés par incubation avec une solution de PBS contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA) pendant 30 minutes à 37°C. Après rinçage dans du PBS, (3 x 10 min), les lames ont été incubées avec l'anti-sérum à tester utilisé pur ou dilué (1/10^{ème}, 1/100^{ème}, 1/150^{ème}, 1/200^{ème}, 1/250^{ème}, 1/300^{ème}, 1/500^{ème}, 1/1000^{ème}) dans du PBS contenant 1% de BSA, pendant 30 min à 37°C, dans une chambre humide.

Après rinçage dans du PBS (3 x 10 min), la présence d'anticorps anti-*Desulfovibrio* fixés à la surface des bactéries a été recherchée par observation en microscopie à fluorescence (Olympus, grossissement x 400) après incubation (37°C, 30 min) avec des IgG anti-IgG de lapin marqués au isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Sigma, St louis, USA; dilution : 1/100^{ème}).

Cette étude nous a permis de montrer que l'utilisation d'une dilution d'anti-sérum $\geq 1/200$ ^{ème} permettait de détecter toutes les souches de *Desulfovibrio* testées avec absence de détection des autres microorganismes testés (Fig. 10 a et b).

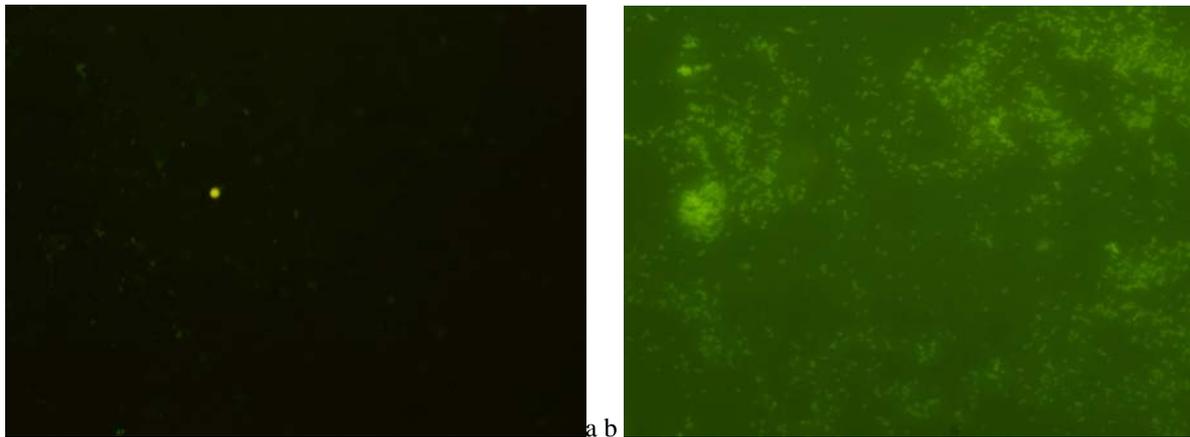


Figure 10. Validation de l'anticorps anti-*Desulfovibrio*. (a) Témoin négatif, (b) Témoin positif

5.3.2 Etude en microscopie confocale proprement dite

Des cellules KB préalablement mises en culture dans des chambres à lamelles, Labtek IITM (Nunc, Dutscher, France), 8 puits (5.10⁴ KB/puits) ont été tout d'abord marquées par immersion dans une solution de DiIC₁₆ (1' Di-Octadecyl 3, 3, 3', 3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise Cedex, France) à 2µM dans du RPMI pendant 2 min (Mukherjee S et al. 1999). Le DiIC₁₆ est un marqueur des membranes cellulaires, de surface et intracytoplasmiques.

Les cellules KB ont ensuite été infectées (2 h) selon le protocole précédemment décrit à un MOI de 100 et ont fait l'objet du prétraitement suivant :

- fixation avec du paraformaldéhyde à 3.7% (15min, 4°C)

- lavage (3 x 5 min) avec du PBS
- perméabilisation avec 0.1% de Triton X- 100 (5 min)
- lavage (2 x 5 min) avec du PBS
- saturation des sites aspécifiques avec du PBS contenant 5% d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma) pendant 20 min.
- incubation (une nuit, 4°C) avec un antisérum de lapin anti-*Desulfovibrio* dilué au 1/200^{ème} dans du PBS avec 1% de BSA et 0.1% de Tween 20 (PBAT).
- lavage (3 x 5 min) avec du PBS
- incubation (45 min en chambre noire) avec l'anticorps secondaire, anti-IgG de lapin (obtenu chez la chèvre) couplé au FITC (Sigma-Aldrich), et dilué au 1/100^{ème} dans du PBTA
- lavage (3 x 5 min) avec du PBS
- incubation (45 min en chambre noire) avec un anticorps tertiaire, anti- FITC couplé au marqueur Alexa[®] 488 (Molecular probe, Invitrogen), dilué au 1/100^{ème} dans du PBTA,

Après lavage dans du PBS, les échantillons ont été observés avec un microscope confocal à balayage laser SP2-AOBS (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany), constitué d'un microscope à épifluorescence inversé équipé d'une source laser argon à 488 nm et d'une source laser hélium/néon à 543 nm. L'intensité du signal de fluorescence a été mesurée entre 500 et 520 nm pour le marqueur Alexa 488 (codé en vert) et entre 520- 580 nm pour le DiIC₁₆ (codé en rouge) avec un objectif 63x (immersion eau/ 1,32 NA). Pour chaque fenêtre, la collection du signal de fluorescence a été ajustée pour éviter tout chevauchement de l'émission des deux marqueurs en mode séquentiel. Les images ont été acquises en utilisant un pas de 0.2µm, un format de 512 x 512 pixels, et une fréquence 400 Hz. Elles ont été analysées avec le logiciel Leica LCS. Les images ont été pseudocolorées selon leur émission respective et intégrées à l'aide du logiciel Leica/ metamorph.

Le mode séquentiel permet d'éliminer toute erreur d'interprétation due à la superposition des spectres des deux marqueurs. Dans notre étude, un balayage laser a été effectué sur les canaux 1 et 2 pour le spectre FITC, et un autre laser a balayé ces mêmes canaux pour le spectre du DiI.

Différents contrôles ont été inclus afin de se départir des marquages aspécifiques :

- un puits témoin des cellules KB (évaluation de l'autofluorescence des cellules)
- des puits témoins de la fixation aspécifique des anticorps (Ac) :

- cellules KB sans bactéries avec Ac Iaire + Ac IIdaire + Ac IIIdaire
- cellules KB infectées et incubées avec Ac IIdaire et IIIdaire.
- des puits témoins du marquage des bactéries :
 - bactéries marquées avec Ac Iaire + Ac IIdaire + Ac IIIdaire
 - bactéries incubées avec Ac IIdaire et IIIdaire
 - bactéries avec Ac IIIdaire seul.

II. ETUDE DES SECRETIONS CYTOKINIQUES DES CELLULES EPITHELIALES APRES CONTAMINATION BACTERIENNE

Pour évaluer la persistance intracellulaire et la multiplication des bactéries dans les cellules KB, les monocouches infectées étaient incubées, dans un milieu sans antibiotique ni SFV pendant 2, 24, 48 et 72 h. Les surnageants de ces cultures ont été conservés à -20°C pour une évaluation ultérieure de la sécrétion cytokinique par technique ELISA des cellules KB infectées avec les bactéries sur plusieurs jours. Le surnageant de culture de cellules KB non infectées a servi de contrôle négatif.

1. Généralités

Le dosage des cytokines IL-1 β , IL-6 et IL-8 présentes dans le surnageant des cultures de cellules infectées par *Desulfovibrio* spp. a été réalisé par la technique d'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Cette technique biochimique utilise deux anticorps, le premier, spécifique de l'antigène, aussi appelé anticorps de capture, est fixé au fond des puits d'une plaque 96 puits, le second, biotinylé ou directement couplé à une enzyme, permet de mettre en évidence les complexes immuns formés par le premier anticorps et l'antigène recherché. Un substrat chromogène ou fluorogène est ajouté et dégradé par l'enzyme en un composé qui émet un signal dont l'intensité est évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre. L'anticorps de capture assure la spécificité du test (Fig. 11).

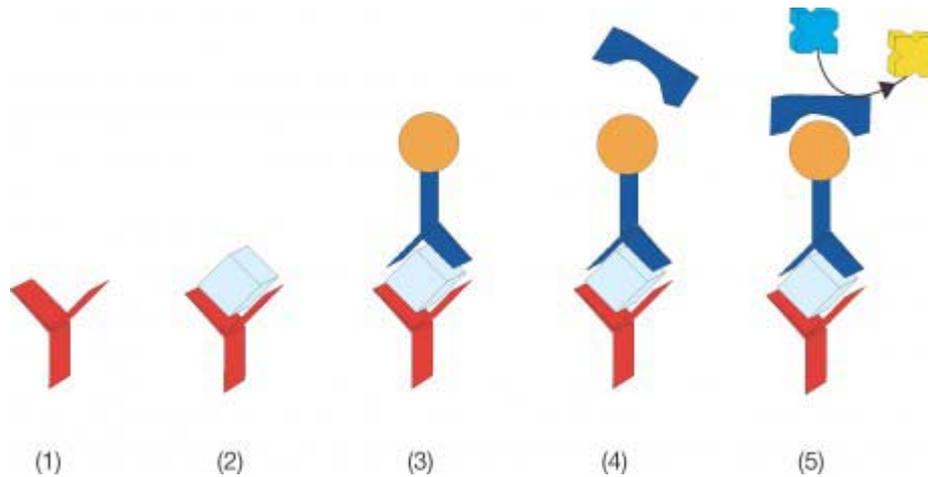


Figure 11. Technique *ELISA* en sandwich.

- (1) la plaque (Fig.12) est recouverte avec un anticorps de capture,
- (2) les antigènes présents dans l'échantillon se lient à l'anticorps de capture,
- (3) l'anticorps secondaire lié à l'enzyme est ajouté et se lie à l'antigène,
- (4) le substrat est ajouté puis converti par l'enzyme (Horse Radish Peroxidase) en une forme détectable (colorée ou fluorescente)
- (5) Une solution d'arrêt est ajoutée puis l'absorbance, proportionnelle à la concentration d'antigène détecté, est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre.

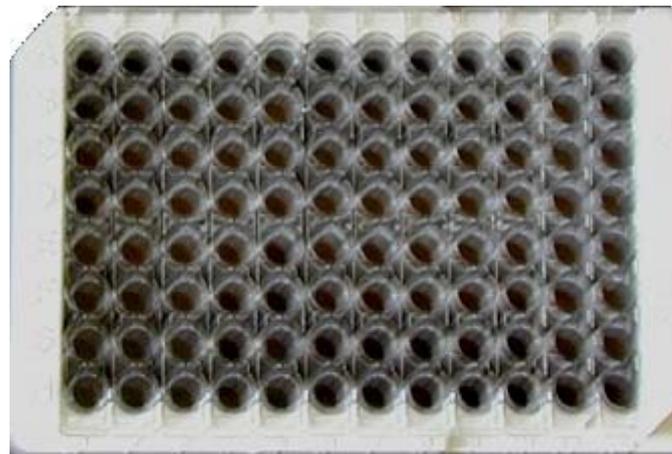


Figure 12. Plaque de microtitrage 96 puits.

Le dosage des interleukines IL-1 β et IL-8 est effectué à l'aide de trousse RayBiotech, Inc (RayBio® Human IL-1 β ELISA kit et RayBio® Human IL-8 ELISA kit, Norcross, GA). Le dosage de l'IL-6 a été effectué à l'aide d'une trousse Human IL-6 Instant ELISA™,

(Bender MedSystems, Vienna, Austria). Les seuils de détection étaient respectivement de 3, 8 et 0.98 pg/mL pour les trousse de dosage IL-1 β , IL-8 et IL-6.

Chaque échantillon a été dosé en triple et les valeurs des concentrations en cytokines ont été déterminées à l'aide de gammes de titration obtenues avec une série de standards spécifiques à chaque dosage. L'absorbance a été déterminée à l'aide d'un lecteur d'absorbance (Sunrise, Tecan, Lyon, France). Les données sont présentées comme des moyennes \pm écart type. Les niveaux de cytokines sont comparés en utilisant un test *t* de Student non apparié (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). La significativité est définie par une valeur de $p < 0.05$.

2. Kit RayBio®

La gamme de dilution du standard IL-8 était comprise entre 7,3 et 1254,5 pg/mL, (7,3 ; 22,4 ; 43 ; 90,6 ; 207 ; 455,7 ; 795,6 ; 1254,5 pg/mL).

Les protocoles de dosage de l'IL-1 β et de l'IL-8 sont identiques. Les grandes étapes du dosage sont résumées ci dessous :

1. Incubation de 100 μ L de standard et d'échantillon pendant 2.5 h à TA (température) dans les puits appropriés,
2. Lavage des puits avec solution de lavage (4 fois),
3. Incubation avec 100 μ L d'Ac de capture biotinylé pendant 1 h à TA.
4. Lavage des puits avec solution de lavage (4 fois),
5. Incubation avec 100 μ L de solution streptavidine pendant 45 min à TA,
6. Lavage des puits avec solution de lavage (5 fois),
7. Incubation avec 100 μ L de TMB (Tétra Méthyl Benzidine) pendant 30 min en chambre noire,
8. Adjonction de 50 μ L de solution STOP,
9. Lecture de l'absorbance à 450 nm, immédiatement après arrêt de la réaction enzymatique à l'aide d'un lecteur de plaque.

3. Kit « Instant ELISA™» (Fig. 13)

La gamme de dilution du standard IL-6 est déjà préparée par le fabricant, il suffit juste de réhydrater les puits contenant cette gamme. La gamme de dilution du standard IL-6 était comprise entre 0,7 et 97,5 pg/mL, (0,7 ; 1,3 ; 6,06, 13,7 ; 25,7 ; 54,5 ; 97,5 pg/mL).

Protocole du kit ELISA BenderMed Systems:

1. Adjonction de 100µL d'eau distillée dans les puits tests et de 170 µL dans la gamme du standard. Puis, incubation avec 50µL d'échantillon pendant 3 h,
2. Lavage des puits avec solution de lavage (3 fois),
3. Incubation avec 100 µL de TMB pendant 10 min, en chambre noire,
4. Adjonction de 100 µL de solution d'arrêt,
5. Lecture immédiate de l'absorbance à 450nm.



Figure 13. Kit de détection rapide d'IL-6 : Instant ELISA™, Bender Med System

III. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β -CYCLODEXTRINE

1. Matériel et préparation des complexes

1.1. Produits chimiques et tampon

- L'anhydride d'amoxicilline, l'acide penicillanique 6-[D (-)- α -amino-p-hydroxyphényl acétamido], Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).
- β cyclodextrine native (β -CD), Wacker-Chemie GmbH (Lyon, France).
- Thio-urée, Prolabo (Manchester, Royaume-Uni).
- Eau deutérée (D₂O), Eurisotop (Gif-sur- Yvette, France).
- Dihydrogénophosphate de potassium (KH₂PO₄), Merck (Lyon, France).

1.2. Préparation des complexes

Les complexes amoxicilline- cyclodextrine (CD) sont préparés selon les conditions décrites par Higuchi et Connors (1965). Les molécules d'amoxicilline (amox) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de β -CD (Wacker-Chemie GmbH, Lyon, France) sont dissoutes dans de l'eau ultra-pure selon différents rapports molaires : (amox: β -CD) : 1:0.25, 1:0.5, 1:1, 1:3, 1:5, avec un pH final de 5 (pHmètre, pHM 210 standard, Radiometer, Copenhagen).

Pour obtenir le pH à 5, on ajoute de la soude (NaOH) au goutte à goutte. La solution ajustée est placée sous agitation continue (250 tours/ minutes, Certomat® M, B. Braun Biotech, Plaisance du Touch, France) pendant 12h, à la température de 37°C.

La solution obtenue est lyophilisée avec un lyophilisateur, Cryodos Telstar (Terrassa) pendant 8 heures (passage d'un état solide congelé à un état de poudre sans passer par un état liquide) pour l'étude du complexe à l'état solide.

2. Caractérisation des complexes

2.1. Détermination de la constante de complexation

La détermination de la constante de complexation entre l'amox et la β -CD est réalisée par CLHP. Les expériences sont réalisées en utilisant un chromatographe liquide équipé d'un dégazeur à vide SCM1000 (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) et d'une pompe à gradient SpectraSystem P1000XR (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) équipée d'une boucle de

20 μ L. Une colonne en acier inoxydable Hyperbond C18 Shandon (300 x 3.9 mm, taille des particules 10 μ m) est thermostatée à 25°C à l'aide d'un contrôleur de température 560-CIL (Cluzeau Info Labo, Puteaux-la-Défense, France). L'amoxicilline est détectée à 228 nm avec un détecteur spectrophotométrique à double faisceau SpectraSystem UV1000 (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA).

La phase mobile est un tampon aqueux monobasique de dihydrogénophosphate de potassium (0.2M, pH 5) filtré à travers une membrane Millipore (Molsheim, France) de 0.45 μ m, auquel on ajoute des concentrations croissantes de β -CD (0, 0.15, 0.75, 1.5 3.0.5 mM). Cette phase mobile est utilisée car les anions phosphates ne peuvent interférer avec le processus de complexation (Brewster et Loftsson, 2007). Le débit de l'effluent est fixé à 0.5 mL/ minute. La phase stationnaire est équilibrée par passage de la phase mobile jusqu'à obtention de temps de rétention reproductibles, soit environ 4 heures pour une phase mobile additionnée de CD. Le volume mort de la colonne est déterminé par élution d'une solution de thio- urée (0.273 μ g/mL). Il est systématiquement contrôlé 3 fois après équilibration de la colonne. Les temps de rétention de l'amox, à une concentration finale de 15×10^{-6} M, sont mesurés en absence et en présence de CD dans la phase mobile. Chaque mélange est injecté 3 fois sur la colonne. La valeur du temps de rétention est la moyenne des 3 temps de rétention obtenus.

Les constantes de complexation (K_c) sont déterminées par la méthode d'Uekama et al. (1978) :

$$[\text{CD}]_m / T'_o - T_{\text{obs}} = 1 / T'_o - T_c [\text{CD}]_m + 1 / K_c (T'_o - T_c)$$

$[\text{CD}]_m$ = concentration de CD dans la phase mobile,

T'_o = temps de rétention de l'amox en l'absence de CD dans la phase mobile,

T_{obs} = temps de rétention de l'amox à une concentration donnée de CD,

T_c = temps de rétention du complexe amox/ CD.

Le tracé de la courbe $[\text{CD}]_m / T'_o - T_{\text{obs}}$ en fonction de la concentration en CD dans la phase mobile est une droite de type $y = Ax + B$ dont la pente donne la valeur de K_c .

2.2. Etudes par spectrométrie

2.2.1. Infrarouge

Les spectres sont réalisés entre les fréquences 4000 cm^{-1} et 450 cm^{-1} à partir d'une pastille de bromure de potassium dans laquelle est introduite la molécule à tester (1%, m/ m). Les spectres des molécules initiales d'amox et de β -CD sont comparés à ceux obtenus avec les complexes réalisés à différents rapports molaires ainsi qu'avec le mélange physique des

deux molécules. Ils sont réalisés avec un spectrophotomètre Bruker Vector 22 (Wissembourg, France).

2.2.2. Résonance magnétique nucléaire

La Résonance magnétique nucléaire (RMN) constitue l'outil idéal pour la mise en évidence, en solution aqueuse, de complexe d'inclusion de CD ainsi que pour la détermination de leur structure. Les CDs et l'amoxicilline lyophilisées sont dissous selon divers rapports molaires dans D₂O. Les mesures (en ppm) en RMN ¹H sont réalisées à la température de 300°Kelvin, à une fréquence de 400MHz, avec un spectromètre Bruker DRX-400 (Wissembourg, France). Ces mesures sont effectuées sur la plateforme du service commun de RMN de l'Université Henri Poincaré (Nancy 1, France).

La connectivité spatiale entre la CD et la drogue est établie par spectroscopie de corrélation 2D-NMR-ROESY (Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy). Le spectre est acquis avec 32 scans, 16 dummy scans, un délai de recyclage de 1.5s, des tailles d'acquisition de 1000 x 512, et de traitement de 2000 x 2000 et un temps de mélange de 400ms (Claridge, 1999).

2.3. *Méthodes thermo-analytiques : Thermogravimétrie, calorimétrie, spectrométrie de masse*

La thermogravimétrie (TG), la calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et la spectrométrie de masse (MS) sont déterminées à partir d'un même échantillon à l'aide du même système : Skimmer (Netzsch, Gerätebau, Germany) ce qui permet une comparaison sécurisée des résultats. Ce système combine les instruments d'analyse thermique (STA 409C) pour TG et DSC et un spectromètre de masse quadrupole (QMS) qui permet la détection des gaz, leur séparation et leur identification. Tous les instruments sont calibrés avant utilisation. Le comportement thermique est étudié en chauffant, de 30 à 350°C (10 K/min) 5 mg d'échantillon dans un creuset en aluminium ouvert sous flux d'argon (flux de 50 mL/ min).

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β -CYCLODEXTRINE

1. Détermination de l'activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou des complexes amoxicilline- β -cyclodextrine

L'étude de l'activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou complexée a été réalisée en déterminant les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces composés vis-à-vis de 14 souches incluant 4 souches de *Desulfovibrio* spp.

1.1. *Microorganismes et conditions de culture bactérienne*

Quatre souches de *Desulfovibrio* spp. ont été étudiées : *D. desulfuricans* LBN 315 (résistant à l'amoxicilline par production de β -lactamase), *D. desulfuricans* ATCC 29774 (sensible à l'amoxicilline), *D. fairfieldensis* LBN 303 (résistant à l'amoxicilline, non producteur de β -lactamase) et *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (sensible à l'amoxicilline). Huit autres souches, choisies pour leur implication dans la maladie parodontale, ont également été incluses : 4 souches produisant des β -lactamases (*Prevotella buccae* LBN 310, *Prevotella intermedia* LBN 311, *Prevotella intermedia* LBN 487, *Fusobacterium nucleatum* LBN 301) et 4 autres souches sensibles à l'amoxicilline (*Prevotella buccae* ATCC 33574, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 et *Fusobacterium nucleatum* LBN 488). *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 et *Bacteroides thetaiotaomicron* ATCC 29741 ont été utilisées comme souches contrôles (CMI amoxicilline) mais ont également été utilisées pour étudier de manière comparative l'activité de l'amoxicilline complexée par rapport à l'amoxicilline libre. Toutes les souches ont été conservées à -80°C en bouillon cœur-cerveau (Brain Heart Infusion : BHI) ou en bouillon Brucella contenant 15% (m/v) de glycérol jusqu'à utilisation. Avant d'être testées, les souches ont été repiquées sur gélose Brucella (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) supplémentée avec 5% de sang de mouton défibriné (Oxoid) à 35°C sous atmosphère anaérobie.

1.2. *Détermination des CMI par la méthode de dilution en milieu gélosé*

La méthode de dilution en milieu gélosé, méthode référence recommandée par « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI, 2007) a été utilisée. Le principe de

cette méthode consiste à étudier la croissance d'une population bactérienne (inoculum bactérien déposé sous forme d'un spot d'environ 10^5 UFC) au contact de concentrations croissantes (progression géométrique de raison 2) de molécules à tester préalablement incorporées au milieu gélosé.

La détermination des CMI a été effectuée selon les procédures du CLSI :

- Préparation des solutions des composés testés : les poudres d'amoxicilline (Sigma) et des complexes amoxicilline- β -cyclodextrine (1 :1) et (1 :3) ont été dissoutes dans du tampon phosphate pH 6.
- Préparation des boîtes de Pétri : cette opération a été réalisée extemporanément. 2mL de chaque dilution de molécule à tester ont été ajoutés à 18 mL de gélose Brucella maintenue en surfusion, additionné de 5% de sang de mouton laqué (Oxoid), de 5 μ g/mL d'hémine (Sigma- Aldrich) et d'1 mg/mL de vitamine K (Sigma- Aldrich). Les boîtes ont été séchées pendant 15 min à 37°C.
- Inoculum : une suspension bactérienne d'opacité équivalente au standard McFarland 0,5 ($\sim 10^8$ UFC/ mL) a été réalisée en bouillon Brucella, préalablement régénéré, à partir d'une culture de 48 à 72 h sur gélose Brucella.
- Ensemencement : des spots d'environ 2 μ L ont été déposés à la surface des géloses à l'aide d'un inoculateur à tiges multiples (appareil de Steers, Denley, Billinhurst, GB). Des géloses témoins, sans antibiotiques, ont été ensemencées avant et après la série de boîtes contenant les antibiotiques. Les boîtes ont été séchées avant incubation.
- Incubation : les boîtes ont été incubées de 48 à 72 h, sous atmosphère anaérobie. Des boîtes témoins ont été incubées sous atmosphère anaérobie (afin de vérifier la bonne croissance des souches testées) et sous atmosphère aérobie (afin de détecter une éventuelle contamination par d'autres microorganismes aérobies ou anaérobies facultatifs).
- Lecture : les CMI ont été déterminées après 48 à 72 h d'incubation. La CMI était définie comme étant la concentration d'antibiotique la plus faible capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible ou d'induire un changement marqué de croissance. Les résultats ont été validés par le fait que les CMI de l'amoxicilline des souches étaient comprises dans l'intervalle des valeurs fournies par le CLSI.
- Interprétation : les concentrations critiques recommandées par le CLSI ont été utilisées pour classer les souches en sensibles, de sensibilité intermédiaire ou résistantes. Seules des CMI variant d'au moins deux dilutions ont été considérées comme significativement modifiées.

2. Détermination de l'activité de l'amoxicilline libre ou des complexes amoxicilline- β -cyclodextrine sur *P. gingivalis* internalisé dans les cellules KB

L'évaluation de l'activité intracellulaire de l'amoxicilline libre ou complexée a été réalisée en étudiant l'action de ces composés sur des formes intracellulaires de *P. gingivalis* ATCC 33277, dont l'internalisation dans les cellules épithéliales a été rapportée et bien caractérisée par de nombreux auteurs (Houalet-Jeanne et al. 2001, Duncan et al. 1993).

Des cellules KB infectées par *P. gingivalis* ATCC 33277 selon le protocole décrit dans le chapitre 1.3 (MOI de 100, contact de 2 h) ont été utilisées. Ces cellules, après élimination des bactéries extracellulaires à l'aide d'une solution antibiotique contenant du métronidazole et de la gentamicine et lavages avec du RPMI, ont été mises en contact avec des solutions contenant de l'amoxicilline libre ou complexée avec une β -cyclodextrine (rapport molaire [1 : 1]) à des concentrations équivalentes à 1 x ou 10 x la CMI de l'amoxicilline seule.

Après incubation de 24 heures sous atmosphère anaérobie, les cellules KB ont été lavées (3 x) avec du RPMI. Après lyse cellulaire une numération des bactéries viables a été réalisée comme précédemment décrit (chapitre 1.3). Le nombre des bactéries intracellulaires a ensuite été déterminé par comptage du nombre de colonies et exprimé en UFC (Unité Formant Colonies) par puits.

V. ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les études statistiques de ce travail ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPadPrism™ (San Diego, California, USA). La normalité de la distribution des résultats a été testée par le test de Kolmogorov Smirnov.

Les comparaisons des sécrétions cytokiniques, des pourcentages d'invasion et du nombre de bactéries internalisées ont été réalisées par un test T de Student ($p < 0.05$), dans le cas d'une distribution normale des données.

RESULTATS

I. ETUDE DU POUVOIR INVASIF DE *DESULFOVIBRIO* SPP.

1. Entrée et survie de *Desulfovibrio* dans les cellules KB

Après 2 heures d'infection, les trois souches de *Desulfovibrio* testées ont présenté une capacité invasive similaire (Tableau 12). Néanmoins, la capacité d'invasion de ces souches (0.05 à 0.13% de l'inoculum initial) était moins importante que celle observée avec *P. gingivalis* ATCC 33277 (0.69% de l'inoculum initial), souche contrôle positive. Pour *D. fairfieldensis* ATCC 700045, le nombre moyen de bactéries viables internalisées était 3.5 fois plus élevé après 24 h d'incubation qu'après 2 h d'incubation, suggérant une réplication intracellulaire ($p < 0.01$) (Fig. 14). Le nombre de bactéries viables intracellulaires a ensuite diminué graduellement jusqu'à atteindre 57 % du compte intracellulaire initial après 72 h d'incubation. Des résultats similaires ont été observés, en concordance avec ceux rapportés par Houalet-Jeanne et al. (2001), pour *P. gingivalis* ATCC 33277. Concernant *D. desulfuricans* ATCC 29577, un doublement significativement du nombre moyen de bactéries intracellulaires viables a été observé après 48 h d'incubation. Ce nombre a ensuite diminué mais est resté légèrement supérieur à celui obtenu après 2 h d'incubation. A aucun moment le nombre de bactéries isolées dans le surnageant n'a dépassé 7% du nombre total de bactéries intracellulaires.

Tableau 12. Comparaison de la capacité d'invasion dans les cellules KB des différentes souches bactériennes. Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm écarts types (n= 4).

Souches	UFC/ puits après 2 heures d'incubation
<i>D. fairfieldensis</i> 700045	$(1.53 \pm 0.6) \times 10^4$
<i>D. desulfuricans</i> 29577	$(6.5 \pm 2) \times 10^4$
<i>D. desulfuricans</i> 27774	$(3.81 \pm 0.44) \times 10^4$
<i>P. gingivalis</i> 33277	$(3.86 \pm 0.17) \times 10^5$

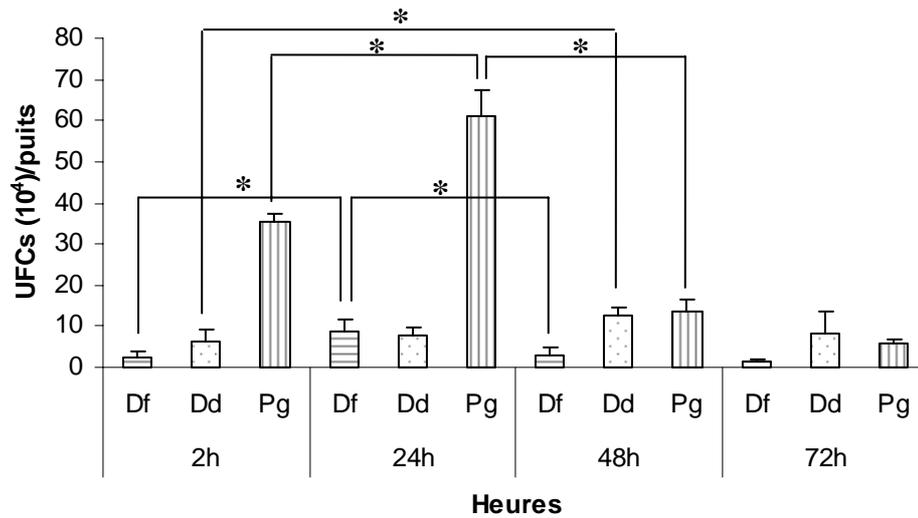


Figure 14. Viabilité intracellulaire de *D. desulfuricans* ATCC 29577, *D. fairfieldensis* et *P. gingivalis* ATCC 33277. Les valeurs exprimées sont les moyennes \pm écarts types (n=3). $P < 0.01$.

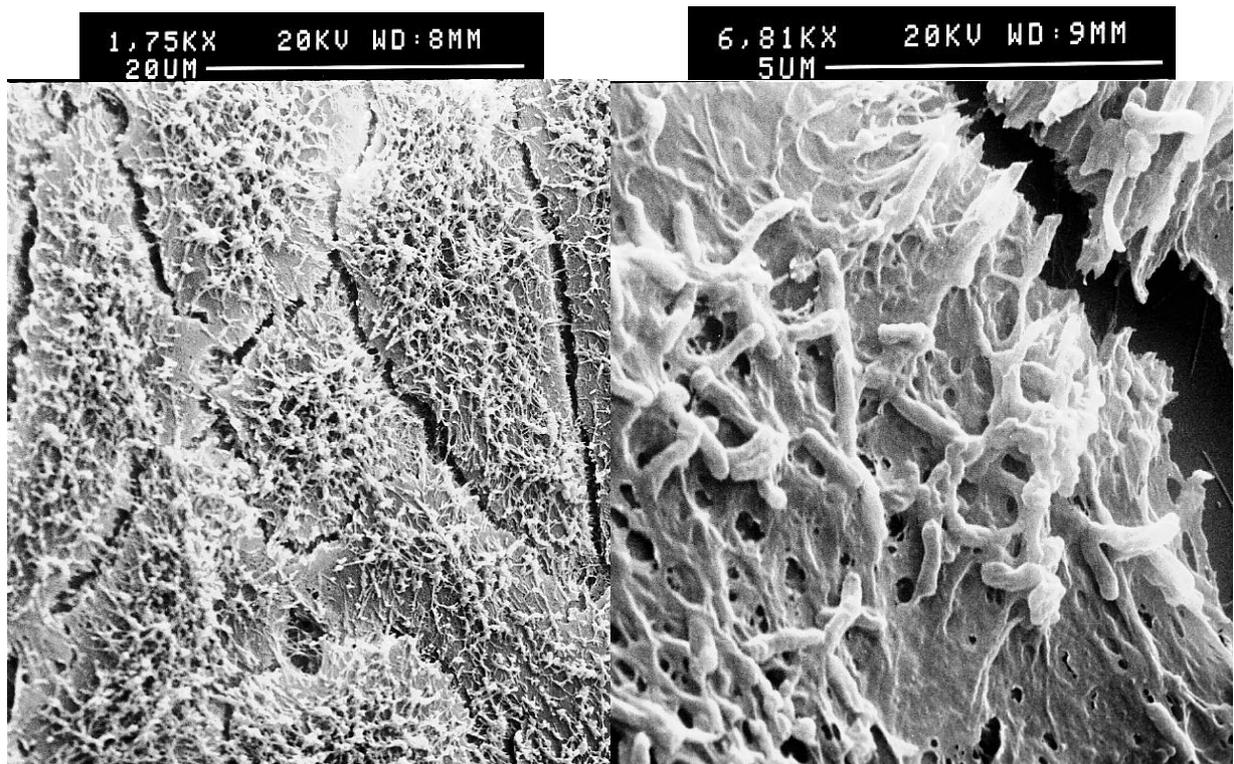


Figure 15. *D. desulfuricans* adhérant à la surface de cellules KB après 2 heures d'incubation visualisé par microscopie électronique à balayage.

2. Localisation intracytoplasmique de *Desulfovibrio* dans les cellules KB

Après 2 heures d'incubation, l'observation en microscopie électronique à transmission et à balayage des cellules KB infectées avec *D. fairfieldensis* ou *D. desulfuricans* a permis de mettre en évidence l'existence de nombreuses bactéries adhérentes à la surface des cellules (fig 15).

L'étude ultrastructurale a montré que les bactéries adhéraient non seulement à la surface apicale des cellules KB mais aussi à la surface d'expansions membranaires induites par l'interaction bactéries-cellules eucaryotes. Ce dernier phénomène était plus marqué après incubation avec la cytochalasine D (fig 16) du fait d'une augmentation du nombre d'expansions membranaires.

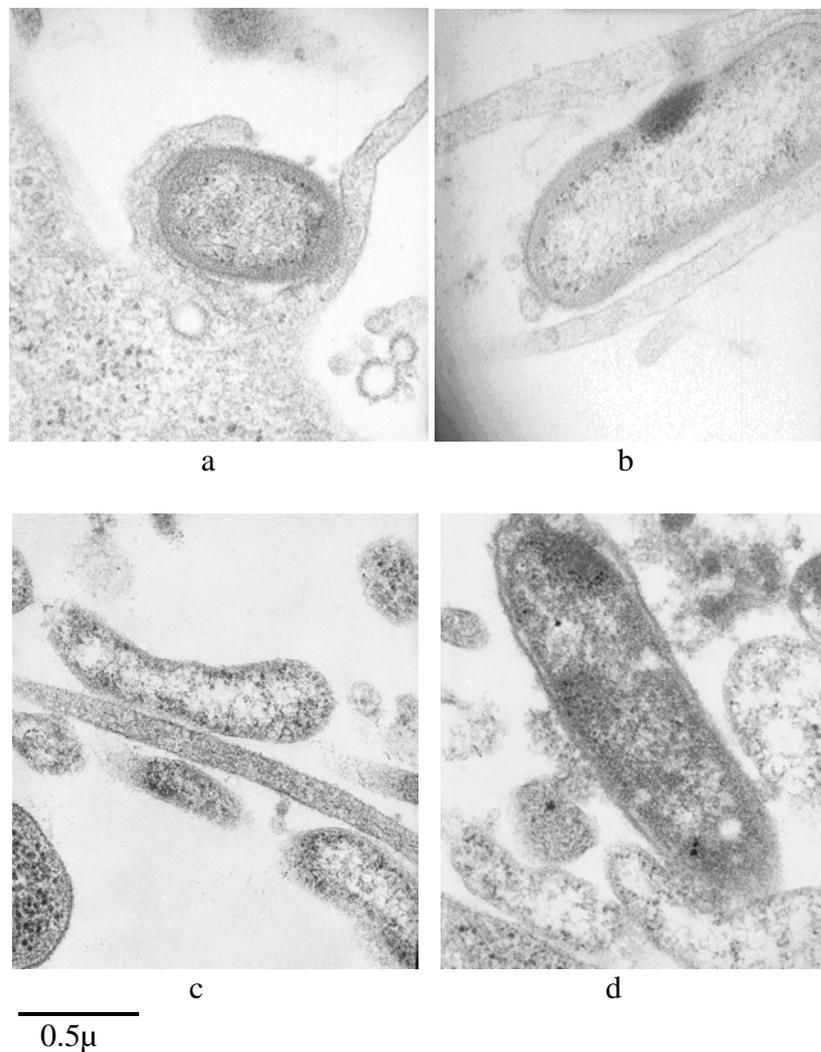


Figure 16. Interactions de *Desulfovibrio desulfuricans* (a) et de *Desulfovibrio fairfieldensis* (b et c) avec les prolongements membranaires de cellules KB

Toutes les bactéries intracellulaires observées sont apparues libres dans le cytoplasme (Fig 17). La localisation intra-cytoplasmique des microorganismes testés a été confirmée par microscopie confocale. Alors que de nombreuses bactéries marquées adhéraient à la surface des cellules épithéliales après 2 heures d'incubation, quelques bactéries intra-cytosoliques ont été observées (Fig. 18). Ces dernières étaient clairement différenciées des bactéries adhérentes par superposition des images, issues du canal vert (FITC-Alexia 488) et du canal rouge (DiI), obtenues par mode séquentiel (0.2µm). L'analyse de ces coupes sériées n'a montré aucune co-localisation des bactéries intracellulaires avec les vésicules intra-cytoplasmiques, suggérant que les microorganismes internalisés étaient libres dans le cytoplasme (Fig. 19).

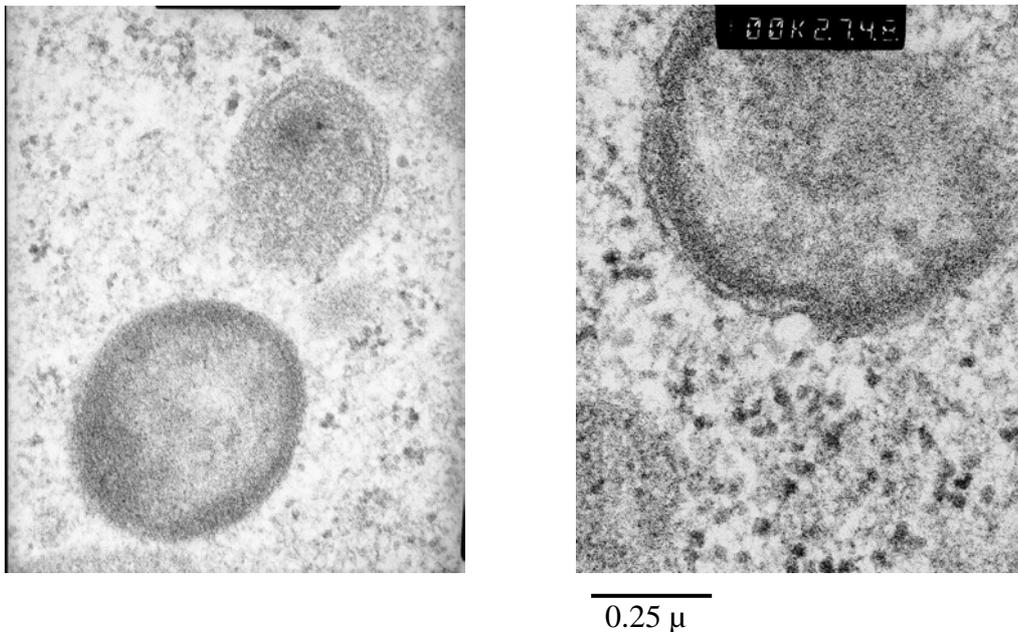


Figure 17. Formes intracellulaires de *D. desulfuricans* ATCC 29577 (microscopie électronique à transmission).



Figure 18. Bactéries internalisées dans les cellules épithéliales KB.

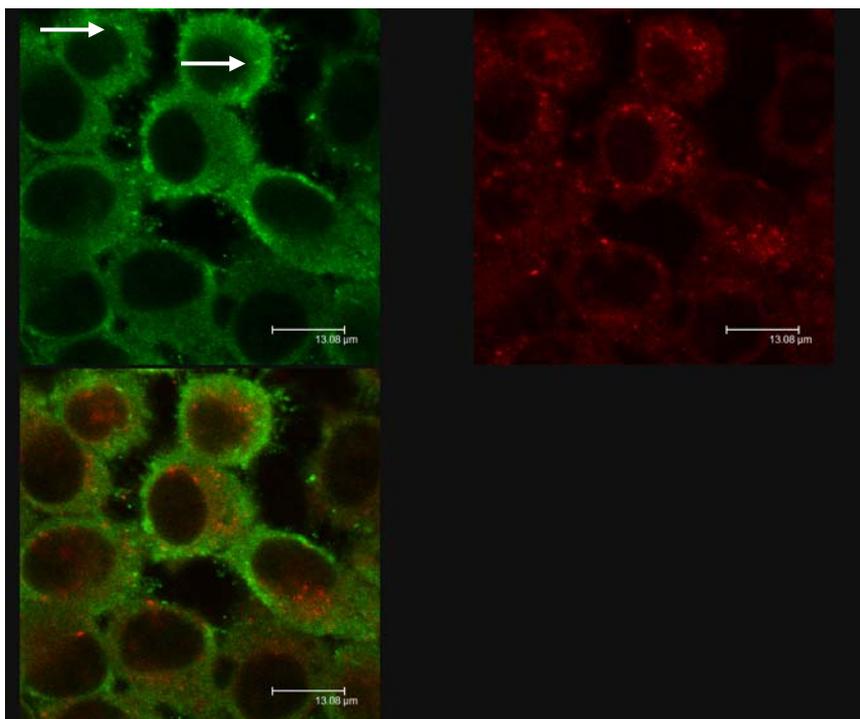


Figure 19. Localisation intracellulaire de *D. fairfieldensis* (en vert, flèches) et mise en évidence des vésicules intracytoplasmiques (en rouge) dans les cellules KB par microscopie confocale.

3. Implication des microtubules dans l'internalisation de *Desulfovibrio* dans les cellules KB

L'entrée des bactéries dans les cellules eucaryotes non phagocytaires professionnelles nécessite un réarrangement des microtubules et/ou des microfilaments d'actine. Afin d'évaluer si l'internalisation des souches de *Desulfovibrio* était actine- et/ou microtubule-dépendante, les effets d'un pré-traitement par cytochalasine D (inhibiteur de la polymérisation des microfilaments d'actine) ou nocodazole (molécule qui perturbe la polymérisation des microtubules par liaison avec la tubuline β et empêche la formation des liaisons disulfures inter- chaînes) sur l'internalisation des trois souches de *Desulfovibrio* testées dans les cellules KB ont été étudiés. Après pré-traitement par cytochalasine D, le nombre de microorganismes internalisés après 2 heures d'infection était significativement augmenté par rapport au témoin ($p < 0.05$) (Tableau 13). Ceci suggère que ces micro-organismes utilisent un mécanisme d'invasion indépendant de l'actine et que leur internalisation semble facilitée par l'inhibition de la polymérisation des microfilaments d'actine. A l'inverse, une diminution statistiquement significative du nombre de bactéries intracellulaires a été observée, pour les trois souches testées, après pré-traitement par nocodazole, indiquant que la formation des microtubules était nécessaire pour l'invasion cellulaire.

Tableau 13. Effets du nocodazole et de la cytochalasine D sur l'invasion des cellules KB par *Desulfovibrio* spp.

Souches	Pourcentage* d'invasion moyen \pm écart type (n=3)	
	Nocodazole	Cytochalasine D
<i>D. fairfieldensis</i> 700045	23.3 \pm 3.83 ^{°°}	237.5 \pm 39.2*
<i>D. desulfuricans</i> 29774	52.6 \pm 1.94 ^{°°°}	138.3 \pm 11.6*
<i>D. desulfuricans</i> 27774	10.68 \pm 1.85 [°]	139.6 \pm 11*

* Les variations dans le pourcentage d'invasion induites par les inhibiteurs sont comparées avec l'invasion sans ces molécules. Le pourcentage d'invasion moyen des cellules prétraitées avec du nocodazole est comparé avec celui du contrôle sans inhibiteur: * $p < 0.05$, [°] $p < 0.01$, ^{°°} $p < 0.005$ et ^{°°°} $p < 0.0005$.

II. EVALUATION DES SECRETIONS DE CYTOKINES PAR LES CELLULES EPITHELIALES STIMULEES OU NON PAR *DESULFOVIBRIO* spp.

Les concentrations d'IL-1 β , IL-6 et IL-8 secrétées par les cellules KB après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection par *D. desulfuricans* ATCC 29577, *D. fairfieldensis* ATCC 700045 ont été évaluées.

Aucune production d'IL-1 β n'a été mise en évidence dans les surnageants des cellules KB stimulées ou non, et ce quelle que soit la souche bactérienne utilisée et le temps d'incubation.

Nous avons constaté que les cellules KB produisaient une faible quantité d'IL-6 de manière constitutive. Ainsi, dans les surnageants de cellules non infectées, aucune sécrétion d'IL-6 n'a été détectée après 2 heures et seules des concentrations faibles ont été observées après 24 heures (2 ± 0.6 pg/ml), 48 heures (2.4 ± 0.9 pg/ml), et 72 heures (4.48 ± 1.9 pg/ml). Aucune sécrétion d'IL-6 n'a été détectée dans le surnageant des cellules après 2 heures d'infection avec *D. fairfieldensis* ATCC 700045 ou *D. desulfuricans* ATCC 29577. En revanche, la quantité d'IL-6 synthétisée par les cellules KB infectées par *D. desulfuricans* ATCC 29577 était significativement augmentée par comparaison avec le contrôle après 24 heures (4.1 ± 0.4 pg/ml) et 48 heures (5.7 ± 0.7 pg/ml) d'infection (Fig. 21). En cas d'infection par *D. fairfieldensis* ATCC 700045, une augmentation, bien que non statistiquement significative, de la production d'IL-6 par les cellules KB a également été observée après 24 heures (4.2 ± 1.5 pg/ml) et 48 heures (4.7 ± 1.2 pg/ml) ($p = 0.07$).

Nous avons observé que les cellules KB sécrétaient une quantité significativement plus élevée d'IL-8 après 2 heures d'infection avec *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (642 ± 65 pg/ml) et *D. desulfuricans* ATCC 29577 (744 ± 121 pg/ml) que les cellules KB non infectées (356 ± 73 pg/ml). Cette différence n'était plus observée après 24, 48 et 72 heures d'infection (Fig. 20).

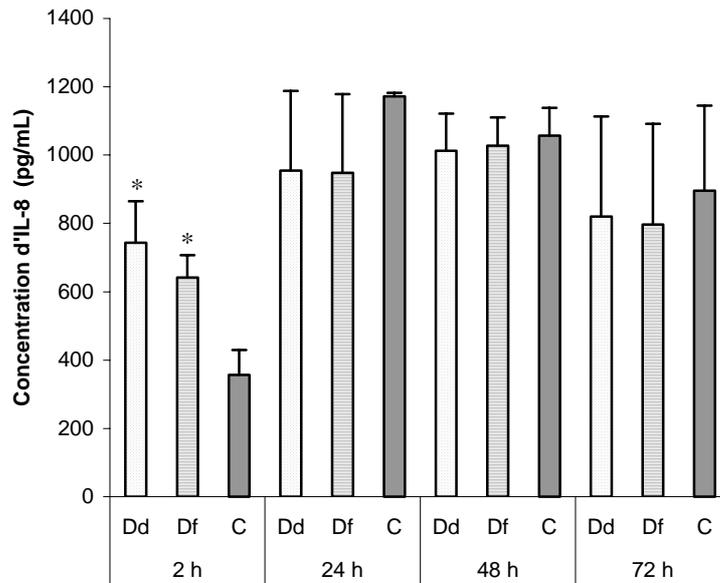


Figure 20. Concentration moyenne d'IL-8 dans le surnageant des cellules KB après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection par *D. fairfieldensis* (Df) et *D. desulfuricans* 29577 ATCC (Dd). Les barres indiquent l'écart type issu de 3 expérimentations différentes. La production cytokinique des cellules KB stimulées est comparée pour chaque temps à un contrôle non infecté (C). *p < 0.01.

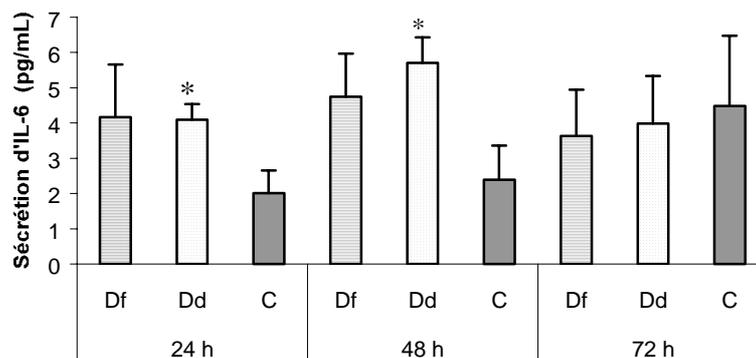


Figure 21. Concentration moyenne d'IL-6 dans le surnageant des cellules KB après 2, 24, 48 et 72 heures d'infection par *D. fairfieldensis* (Df) et *D. desulfuricans* 29577 ATCC (Dd). Les barres indiquent l'écart type issu de 3 expérimentations différentes. La production cytokinique des cellules KB stimulées est comparée pour chaque temps à un contrôle non infecté (C). *p < 0.01.

III. ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DU COMPLEXE AMOXICILLINE- β -CYCLODEXTRINE

Cette étude a été conduite dans le but de caractériser les interactions moléculaires entre l'amoxicilline (Fig. 22) et la β -cyclodextrine.

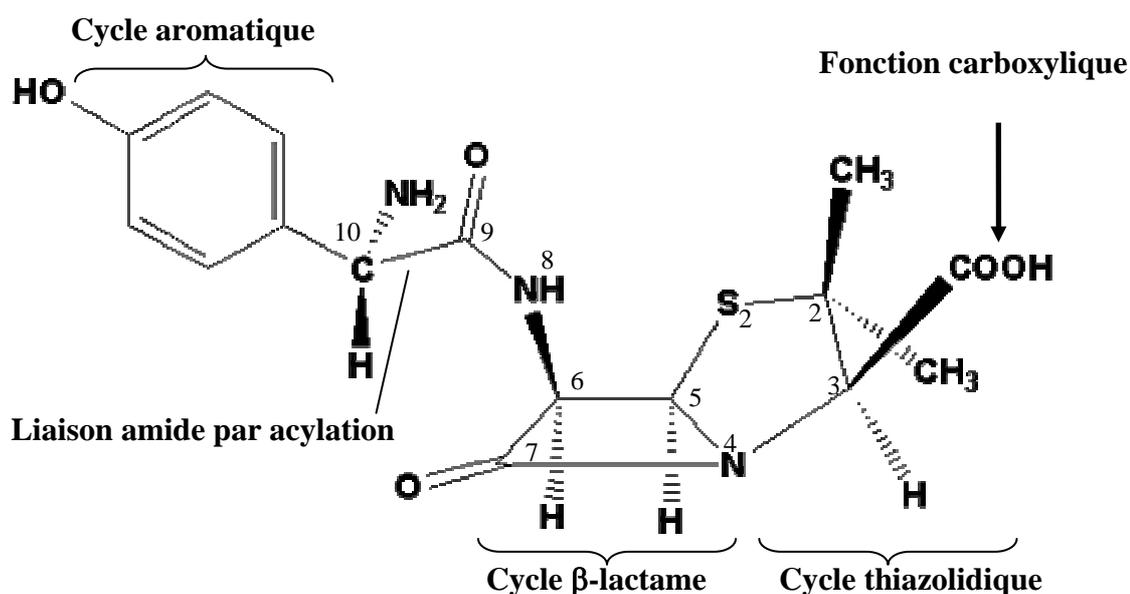


Figure 22. Schéma de l'amoxicilline.

1. Détermination de la constante de complexation

Dans un premier temps, la complexation a été étudiée par CLHP afin de déterminer si un complexe se formait entre l'amoxicilline et la β -CD et, dans l'affirmation, d'évaluer la constante de complexation du complexe.

Une solution tampon phosphate aqueuse (0.2M, pH 5) constitue la phase mobile. Des concentrations croissantes de β -CD sont ajoutées à cette phase mobile. Le but étant de tapisser la phase stationnaire avec la β -CD. L'amoxicilline en solution aqueuse est injectée à une concentration de $15 \cdot 10^{-6}$ M dans le système et son temps de rétention est mesuré en absence et en présence de concentrations croissantes en β -CD dans la phase mobile. Les résultats sont présentés sous forme d'une courbe (Fig. 23).

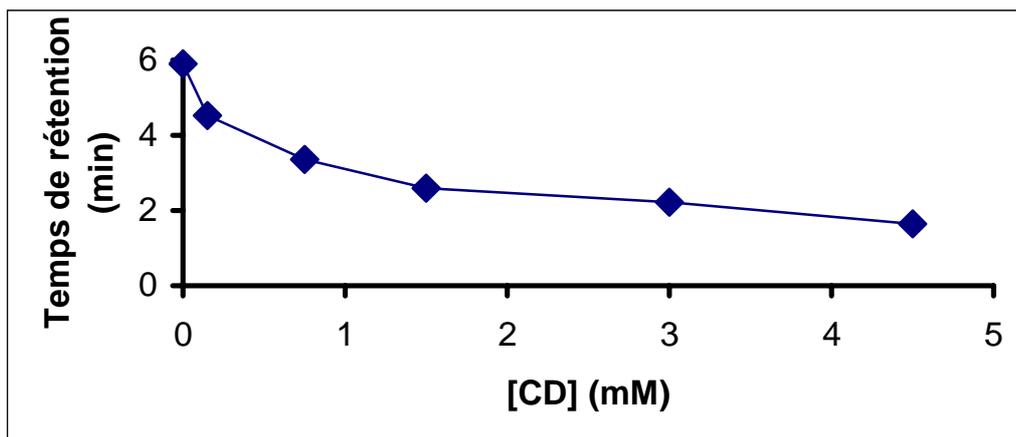


Figure 23. Temps de rétention de l'amoxicilline observés en CLHP en fonction des différentes concentrations de β -CD dans la phase mobile.

La constante de complexation (K_c) est déterminée par la méthode décrite par Uekama. La tracé de la courbe $[CD]_m / (T'_o - T_{obs})$ en fonction de la concentration en CD dans la phase mobile est présenté dans la figure 24.

Avec, $[CD]_m$ = concentration de CD dans la phase mobile,

T'_o = temps de rétention de l'amoxicilline en l'absence de β -CD dans la phase mobile,

T_{obs} = temps de rétention de l'amoxicilline à une concentration donnée de CD,

La droite de régression obtenue a pour équation $y = 0.2179 x + 116.02$, avec un coefficient de détermination R^2 de 0.9905, qui valide la droite. La relation étant linéaire, la constante de formation du complexe (K_c), résultat du rapport de la pente sur l'ordonnée à l'origine est de 1878 M^{-1} .

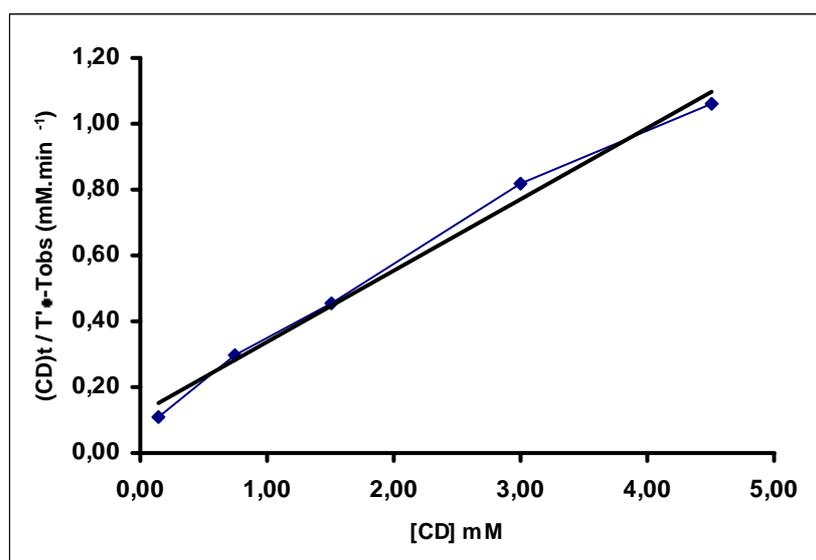


Figure 24. Détermination de K_c à l'aide du temps de rétention du système binaire amox- β -CD par CLHP.

2. Etudes par spectrométrie

2.1. Infrarouge

Les spectres IR-TF (Fig. 25) comparés de l'amoxicilline seule et du complexe amox- β -CD montre des différences.

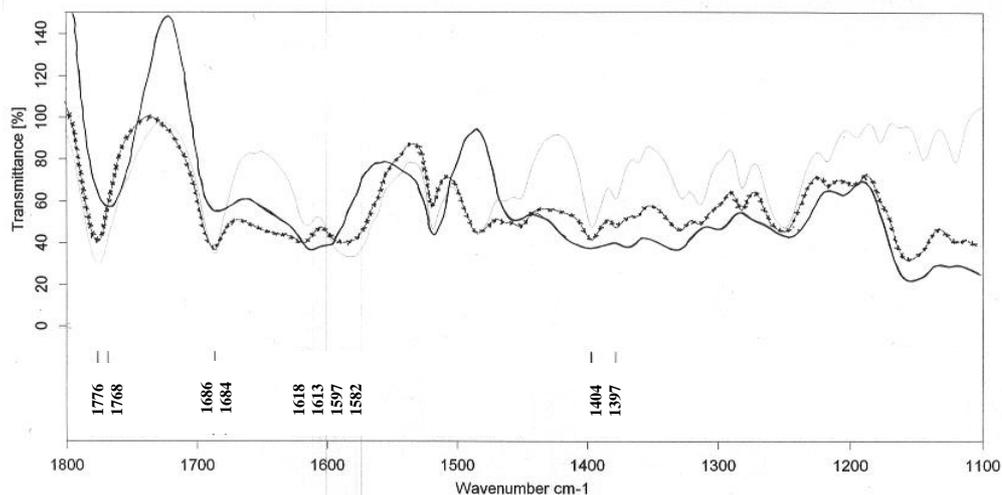


Figure 25. Spectres d'IR –TF superposés de l'amoxicilline, du complexe [amox- β -CD] (1 :1) et du mélange physique de l'amoxicilline.

— amoxicilline, — amox- β -CD (1 :1), xxxx mélange physique

Tableau 14. Attribution des bandes d'absorption majeures de l'amoxicilline et des systèmes binaires de l'amoxicilline- β -CD en IR- TF.

	Amox libre	Mélange physique amox- β -CD	Complexe amox- β -CD				
			1:0,25	1:0,5	1:1,0	1:3,0	1:5,0
$\nu_{C=O}$ (β -lactamique)	1776	1776	1777	1770	1768		
$\nu_{C=O}$ (amide)	1686	1686	1689	1691	1691	1686	
$C = C$ (aromatique)	1618	1618	1616	1614	1613	1613	
ν_{asCOO-}	1582	1588	1595	1596	1597		
H (amide)	1519	1519	1517	1517	1518	1516	1515
ν_{sCOO-}	1397	1397	1401	1403	1404	1406	1405

Le tableau 14 regroupe les fréquences de vibration des bandes d'absorption caractéristiques de l'amoxicilline, du mélange physique et du complexe potentiel.

- La bande correspondant à la vibration du carbonyle du cycle β lactame (1776 cm^{-1}) est déplacée vers un nombre d'onde plus faible (1768 cm^{-1}) pour un complexe amox- β -CD de rapport stœchiométrique (1 :1). Tandis que pour le mélange physique, il n'y a pas de déplacement.
- Concernant le carboxylate, la bande de vibration pour (ν_{sCOO^-}) est déplacée vers un nombre d'ondes plus fort de 9 cm^{-1} pour le complexe de rapport 1:3, et pour (ν_{asCOO^-}) elle est déplacée vers un nombre d'onde plus élevé de 15 cm^{-1} pour le complexe de rapport 1 :1.
- Le carboxylate du mélange physique présente très peu ou pas de déplacement.

2.2. RMN H^1

- La comparaison des spectres RMN H^1 de l'amoxicilline, de la β -CD et des complexes amox- β -CD (Fig. 26) montre des différences de déplacement.

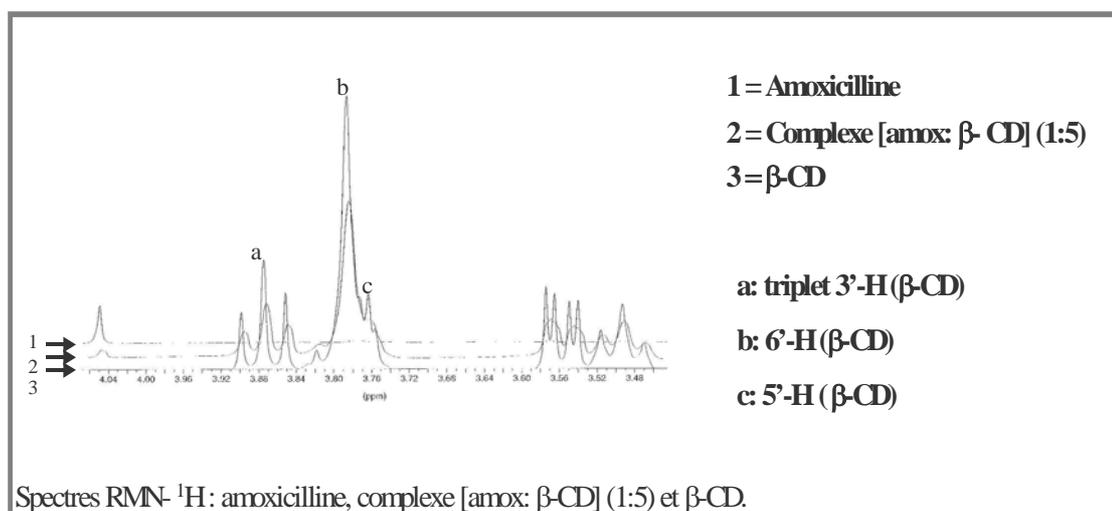


Figure 26. Spectres superposés de l'amoxicilline, β -CD et du complexe [amox- β -CD] (1:5).

Les différences de déplacement observées pour les protons de l'amoxicilline sont détaillées dans le tableau 15. Il met en évidence que:

- Les différences de déplacement chimique des protons aromatiques phénoliques, du cycle β -lactame et des 2 groupements méthyles du noyau pénam augmentent avec le rapport molaire amox/ β -CD.

- Seuls les protons H3 thiazolidique et H10 de l'amoxicilline ne sont pas déplacés.

Les protons H5 et H6 résonnent sous forme d'un quartet AB dans le domaine de résonance 5,38-5,42 avec le doublet séparé par une constante de couplage J^3 de 3,8 MHz caractéristique des cis proton du cycle β -lactame de l'amoxicilline. Après complexation, ils résonnent toujours sous la forme d'un quartet dans le domaine de résonance 5,39- 5,40 avec des doublets séparés par la même constante de couplage.

Tableau 15. Déplacements chimiques des protons de l'amoxicilline pour les systèmes binaires issus des spectres de RMN H^1 .

	$\Delta\delta = \delta \text{ complexe} - \delta \text{ libre (Hz)}$				
	1:0,25	1:0,5	1:1	1:3	1:5
Aromatique	0,000	-0,001	-0,004	-0,011	-0,015
Aromatique	-0,002	-0,002	-0,005	-0,011	-0,016
Aromatique	-0,001	-0,003	-0,005	-0,011	-0,015
Aromatique	-0,001	-0,002	-0,006	-0,011	-0,016
β -lactamique	0,005	-0,004	-0,015	-0,036	-0,055
β -lactamique	-0,004	-0,006	-0,017	-0,037	-0,054
β -lactamique	0,004	0,006	0,016	0,033	0,049
β -lactamique	-0,006	---	0,013	0,030	0,046
10H	0,001	0,002	0,000	0,000	0,000
H3 thiazol	0,002	0,004	0,003	0,003	0,004
Méthyl (thiazolidique)	0,000	-0,002	-0,004	-0,010	-0,015
Méthyl (thiazolidique)	0,003	0,003	0,009	0,018	0,023

Le tableau 16 présente les déplacements des protons de la β -CD seule et après complexation avec l'amoxicilline. Il montre que :

- Les protons H3 localisés à l'intérieur de la cavité de la CD sont légèrement déplacés après complexation avec l'amoxicilline.
- Le signal du proton H5 disparaît dès le premier ajout d'amoxicilline.
- Aucun proton de la β -CD ne présente pas de déplacement après complexation.

Tableau 16. Déplacements chimiques des protons de la β -CD pour les systèmes binaires issus des spectres de RMN H^1 . (TL : Trop Léger)

	$\Delta\delta = \delta \text{ complexe} - \delta \text{ libre (Hz)}$				
	1 :0,25	1 :0,5	1 :1	1 :3	1 :5
Doublet H1	0,006	0,004	0,005	0,004	0,003
Doublet H1	0,004	0,003	0,003	0,002	0,001
Triplet H3	TL	0,007	0,006	0,004	0,003
Triplet H3	0,008	0,006	0,006	0,003	0,002
Triplet H3	0,008	0,007	0,005	0,003	0,002
H6	0,007	0,005	0,004	0,003	0,002
H5					
Quadruplet H2	TL	0,004	0,004	0,002	0,002
Quadruplet H2	0,002	0,002	0,002	0,001	-0,0001
Quadruplet H2	0,002	0,002	0,002	0,001	0,0006
Quadruplet H2	TL	0,003	0,001	0,001	0
Triplet H4	0,004	0,003	0,003	0,002	0,002
Triplet H4	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002
Triplet H4	TL	TL	TL	TL	TL

3. DSC, TG et SM

Les changements d'état de l'amoxicilline en fonction de la température ont été étudiés par DSC et TG. Le spectre des phénomènes thermiques de l'amoxicilline présente (Fig. 27):

- un premier pic endothermique entre 57,7°C et 97,2 °C (avec un maximum à 83,3°C, $\Delta H = - 264.8 \text{ J.g}^{-1}$) avec une perte de masse de 5,95%.
- une perte totale de masse de 51,06% à 350°C.
- un pic exothermique (176,8°C) et un pic endothermique de 202,8°C à 242,8°C.

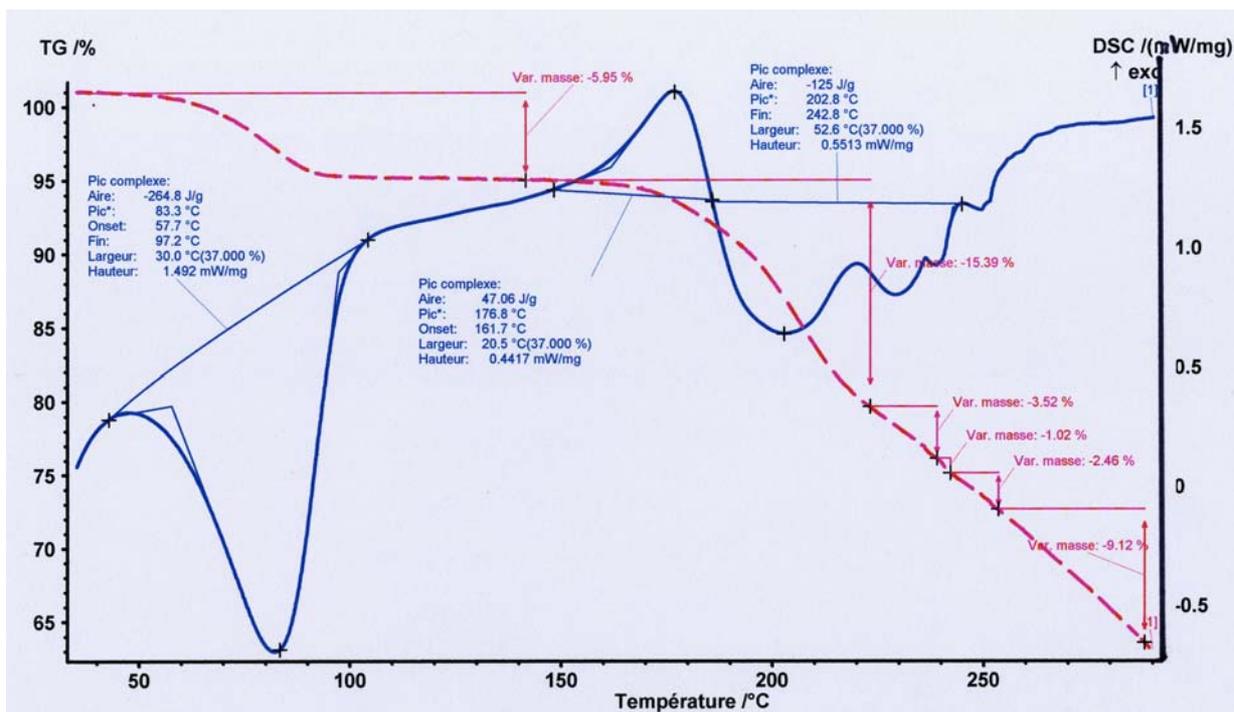


Figure 27. Thermogramme et spectre DSC de l'amoxicilline.

La spectrométrie de masse de l'amoxicilline a permis de détecter et d'identifier, par fragmentation de cette molécule, la présence de cinq ions moléculaires majeurs ($m/z = 12, 17, 18, 34, \text{ et } 44$) par mesure de leur masse. Le spectre de masse (Fig. 28) présente pour $m/z = 17$ et 18 , un courant moléculaire ionique qui augmente à 6 minutes. A 17 minutes, le spectre de masse montre un courant moléculaire ionique plus fort pour $m/z = 44, 34$ et 12 .

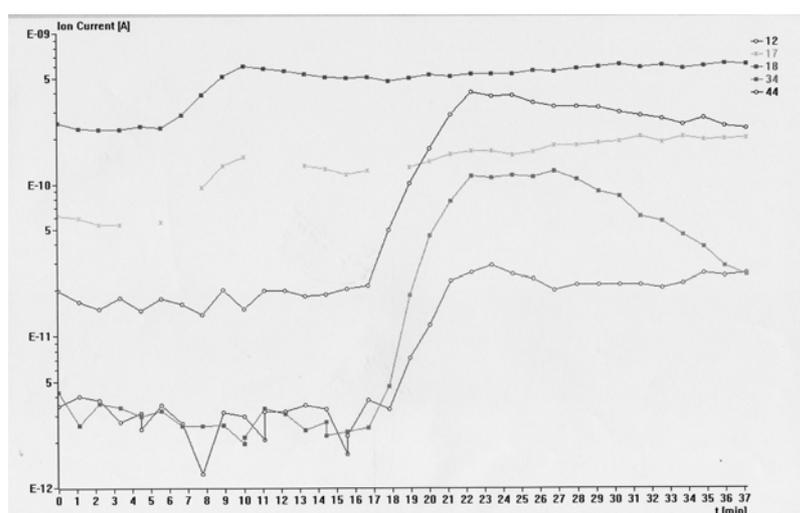


Figure 28. Spectre de masse d'ions moléculaires sélectionnés de l'amoxicilline.

La comparaison des spectres DSC de l'amoxicilline, de la β -CD native, du complexe [amox- β -CD] [1 :1] ainsi que du mélange physique des deux molécules est présentée dans la figure 29. Les mesures DSC du complexe [1 :1] montrent :

- la totale disparition des pics exo (176,8°C) et endothermique entre 202,8°C – 242,8°C.
- Tandis que l'enregistrement du profil thermique en DSC du mélange physique correspond à la superposition du profil des deux composants : amox et β -CD.

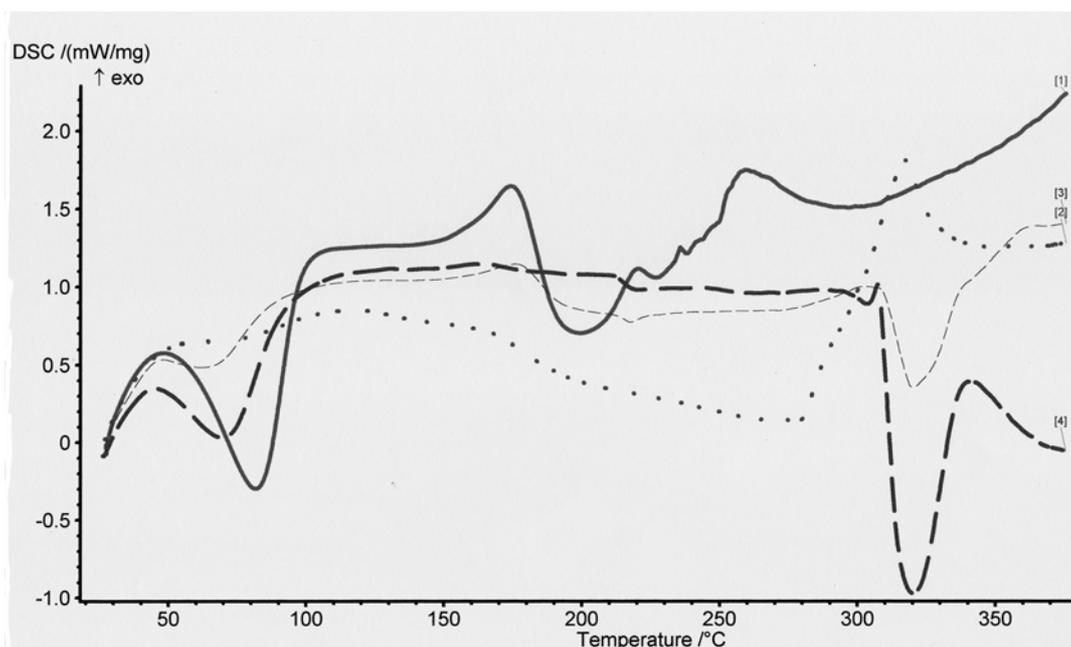


Figure 29. Comparaison des spectres de DSC de l'amox ———, de la β -CD - - - -, du complexe amox- β -CD * * * * * et du mélange physique amox et β -CD -----.

IV. ETUDE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DU COMPLEXE AMOXICILLINE - β -CYCLODEXTRINE

1. Activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou complexée en milieu gélosé

Les valeurs des CMI de l'amoxicilline seule ou complexée figurent dans le tableau 17. Les CMI obtenues avec les deux souches contrôles étaient comprises dans les limites recommandées (CLSI, M11-A7, 2007). Pour chacune des souches testées, sauf *Desulfovibrio fairfieldensis* LBN 303, l'activité de l'amoxicilline complexée n'était pas significativement différente de celle de l'amoxicilline libre. La molécule de β -CD ne montre aucune activité antimicrobienne intrinsèque.

Ainsi, la complexation - quel que soit le rapport stœchiométrique/molaire- n'a ni modifié l'activité intrinsèque de l'amoxicilline, ni permis d'augmenter significativement l'activité inhibitrice de cette molécule en présence de β -lactamases produites par les souches de *Desulfovibrio*, *Prevotella*, *Fusobacterium* et *Bacteroides* testées.

Tableau 17. Activité inhibitrice de l'amoxicilline libre ou complexée avec des β -cyclodextrines sur *Desulfovibrio* spp. et d'autres souches anaérobies productrices ou non de β -lactamases.

Souche	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	Amox	Amox- β -CD (1:1)	Amox- β -CD (1:3)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ATCC 27774	0.125	0.125	0.125
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> LBN 315*	64	64	64
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> ATCC 700045	4	2	4
<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> LBN 303	64	16	16
<i>Prevotella buccae</i> ATCC 33574	0.125	0.125	0.125
<i>Prevotella buccae</i> LBN 310 *	64	32	32
<i>Prevotella intermedia</i> ATCC 25611	0.125	0.06	0.125
<i>Prevotella intermedia</i> LBN 311*	32	32	32
<i>P. intermedia</i> LBN 487*	0.5	0.25	0.25
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	0.125	0.06-0.125	0.06-0.125
<i>Fusobacterium nucleatum</i> LBN 301*	32	16	16
<i>Fusobacterium nucleatum</i> LBN 488	128	64	128
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285*	64	32	32
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741*	64	32	32-64

* souches productrices de β -lactamase.

Nous avons cependant observé que la complexation de l'amoxicilline avec la β -cyclodextrine (rapport molaire 1 :1, 1 :3) a permis de restaurer partiellement l'activité de cet antibiotique sur *D. fairfieldensis* LBN 303, souche non productrice de β -lactamase et dont le mécanisme de résistance n'a pas encore été déterminé.

2. Activité de l'amoxicilline complexée sur les bactéries internalisées.

Aucune activité intracellulaire de l'amoxicilline n'a été mise en évidence après 2 heures d'incubation des complexes amoxicilline- β -cyclodextrines avec les cellules KB préalablement infectées par *P. gingivalis* ATCC 33277, et ce quelle que soit la concentration d'amoxicilline

utilisée (1 CMI ou de 10 CMI) (Fig. 30). Il est à souligner que les concentrations intracellulaires de *P. gingivalis* observées étaient celles attendues eu égard à la littérature (Houalet-Jeanne et al. 2001). Le fait qu'aucune activité intracellulaire de l'amoxicilline complexée n'a pu être mise en évidence au cours d'essais répétés nous a conduit à abandonner cet axe de recherche et de ce fait les essais prévus pour tester l'activité de l'amoxicilline complexée vis-à-vis des formes intracellulaires de *Desulfovibrio* n'ont pas été effectués.

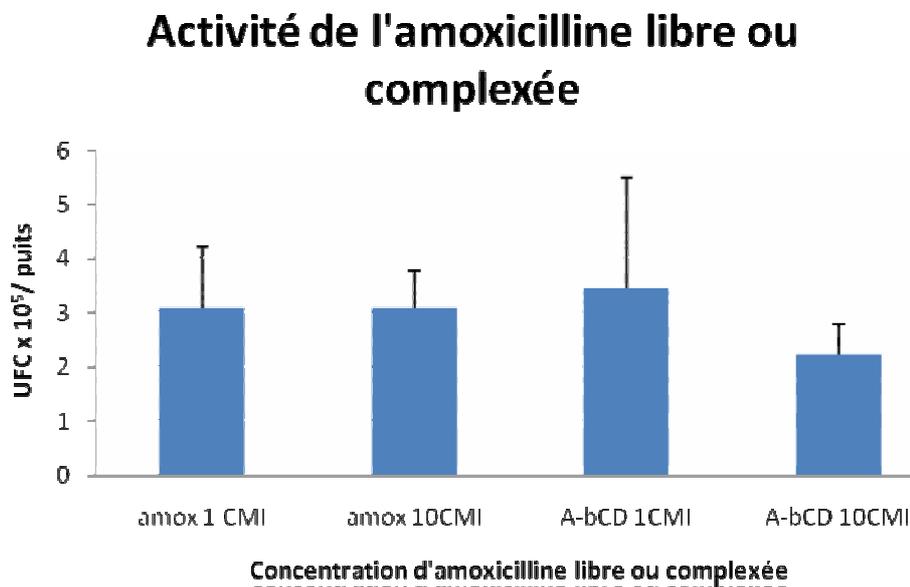


Figure 30. Nombre de *P. gingivalis* ATCC 33277 présents à l'intérieur des cellules KB après 2 heures d'incubation avec de l'amoxicilline seule ou complexée avec des β -cyclodextrines
A: amoxicilline ; A-b-CD : amoxicilline- β -cyclodextrine

DISCUSSION

L'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales par les bactéries sont des étapes importantes qui permettent à ces microorganismes de coloniser puis d'infiltrer les tissus profonds parodontaux. L'internalisation dans les cellules eucaryotes non phagocytaires professionnelles, telles que les cellules épithéliales, permet également à ces bactéries pathogènes d'échapper aux défenses immunitaires de l'hôte ainsi qu'à l'activité de certains antibiotiques. Par ailleurs, il a été montré que les formes intracellulaires n'étaient pas affectées par les traitements mécaniques. Ainsi, ces bactéries internalisées pourraient représenter un réservoir expliquant les récurrences après traitement associant un surfaçage, une application locale d'antiseptique et une antibiothérapie par voie systémique (Johnson et al. 2008).

A l'instar de ce qui a été observé pour les parodontopathogènes reconnus (Colombo et al. 2007, Han et al. 2000, Yuan et al. 2007), nous avons montré que *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales, mais aussi d'y survivre et de s'y multiplier.

Dans notre étude, le pourcentage de *Desulfovibrio* internalisés représentait 0.05 à 0.13% de l'inoculum, après 2 heures d'infection. Pour *P. gingivalis* ATCC 33277, le pourcentage de bactéries intracellulaires correspondait à 0,69%, après un temps d'infection identique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Houalet-Jeanne et al. (2001). Ces auteurs ont en effet rapporté, pour cette souche et dans des conditions expérimentales identiques, un pourcentage d'invasion de 0,6%. Nous avons observé que les niveaux d'invasion des souches *Desulfovibrio* testés étaient 5 à 15 fois plus bas que celui de *P. gingivalis* ATCC 33277. Des niveaux similaires d'internalisation ont été rapportés par Han et al. (2000) pour *P. intermedia* (*P. intermedia* ATCC 49046), dont le niveau d'invasion observé était 20 fois inférieur à celui obtenu avec *P. gingivalis* (*P. gingivalis* 381). Ainsi, les souches de *Desulfovibrio* spp. testées dans notre étude ont montré un pouvoir invasif modéré vis à vis des cellules KB. Néanmoins, il ne peut être exclu que des souches de *Desulfovibrio* plus invasives existent ou que des interactions avec d'autres bactéries parodontales permettent d'augmenter le pouvoir invasif de ces microorganismes. Ce dernier phénomène a en effet été décrit pour '*T. forsythia*' dont le pouvoir invasif est augmenté par *P. gingivalis* notamment via la production de vésicules extracellulaires (Inagaki et al. 2006), et également pour des bactéries a priori non naturellement invasives, comme *Streptococcus cristatus* et *Actinomyces naeslundii*, dont l'internalisation dans les cellules KB est rendue possible par interaction avec *F. nucleatum* (Zhang et al. 2008). Par ailleurs, ces interactions pourraient être favorisées au sein d'un biofilm où le quorum sensing régule en particulier l'expression de molécules de

surface comme les adhésines ou d'autres molécules impliquées dans les processus d'internalisation (Du et Kolenbrander, 2000).

Comme précédemment décrit par Houalet-Jeanne et al. (2001), nous avons aussi observé que pour *P. gingivalis* ATCC 33277, le nombre de bactéries viables présentes à l'intérieur des cellules KB augmentait de 1,5 fois après 24 h d'infection. Des résultats similaires ont été rapportés par Madianos et al. (1996) pour une autre souche de *P. gingivalis*, *P. gingivalis* FDC 381, dont les auteurs ont étudié le pouvoir invasif dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées dans notre étude. L'ensemble de ces résultats suggère que *P. gingivalis* a la capacité de se multiplier dans les cellules KB. Dans notre étude, le nombre moyen de bactéries viables intracellulaires a augmenté pendant 24 h pour *D. fairfieldensis* 700045 ATCC et pendant 48 h pour *D. desulfuricans* ATCC 29577. Ainsi, ces données suggèrent que *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans*, bien que doté d'un pouvoir invasif modéré, peuvent survivre et se multiplier dans les cellules épithéliales KB, atteignant de ce fait des concentrations bactériennes susceptible d'avoir un impact physiopathologique. Néanmoins, le fait que quelques organismes intracellulaires puissent s'échapper des cellules initialement infectées puis ré entrer et se multiplier dans de nouvelles cellules comme montré pour d'autres parodontopathogènes, s'internalisant dans des cellules épithéliales buccales, tels que *P. gingivalis* et *A. actinomycetemcomitans* (Meyer et al. 1999, Yilmaz et al. 2006) ne peut être exclu et nécessite d'autres investigations. Nous avons cependant observé qu'après 24 ou 48 h, selon la souche testée, le nombre de bactéries viables intracellulaires a diminué. L'accumulation de métabolites toxiques au sein des cellules épithéliales infectées et ou la production de peptides antibactériens par ces dernières pourraient expliquer cette diminution (Feucht et al. 2003, Rizzo et al. 2008). Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'évaluer la quantité de β -défensines produites par les cellules KB contaminées par les différentes souches *Desulfovibrio* étudiées.

L'adhérence aux surfaces dentaires et aux muqueuses buccales constitue une étape cruciale de la colonisation par les bactéries des sites sous-gingivaux en particulier en raison des flux de salive et de fluide crévulaire. L'observation en microscopie électronique à transmission a permis de mettre en évidence des bactéries adhérentes à la membrane cellulaire épithéliale, plus particulièrement au niveau d'expansions cellulaires. Ces interactions ont été confirmées par des observations réalisées en microscopie électronique à balayage et en microscopie confocale. Il est à souligner qu'aucune interaction non spécifique avec les surfaces supports inertes utilisées n'a été mise en évidence. Ainsi, *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* sont capables d'adhérer à la surface des cellules KB, permettant de ce fait à ces bactéries d'être internalisées et/ou de stimuler la production cytokinique des cellules épithéliales.

Dans cette étude, la localisation intracellulaire des bactéries testées a été confirmée tant par microscopie électronique à transmission que par microscopie confocale. Après 2 h d'infection, l'observation en microscopie électronique à transmission a révélé que tous les *Desulfovibrio* spp. intracellulaires étaient libres dans le cytoplasme des cellules KB. Après 2 h, aucune co-localisation de bactéries intracellulaires dans des vésicules intracytoplasmiques n'a pu être mise en évidence en microscopie confocale, suggérant que *Desulfovibrio* pourrait s'échapper des vacuoles de manière très précoce, comme cela a été décrit pour *P. gingivalis* et *A. actinomycetemcomitans* (Houalet-Jeanne et al. 2001; Meyer et al. 1997). Dans notre étude, les bactéries intracellulaires avaient une répartition ubiquitaire au sein du cytoplasme. Des résultats similaires ont été rapportés par Houalet-Jeanne et al. (2001) avec *P. gingivalis*. Cependant ces auteurs avaient observés que les formes intracellulaires avaient une localisation périnucléaire préférentielle. Ceci n'a pas été observé dans notre étude.

L'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales peut être dépendante d'un réarrangement des microfilaments d'actine et/ou des microtubules. Certaines bactéries pathogènes envahissent les cellules épithéliales via un mécanisme microtubule dépendant (Yoshida et al. 2003). Parmi les parodontopathogènes, *P. gingivalis* et *F. nucleatum* s'internalisent dans les cellules épithéliales via un mécanisme dépendant des microtubules et des microfilaments d'actine (Han et al. 2000, Lamont et al. 1995). Il a été aussi rapporté que quelques souches d'*A. actinomycetemcomitans* utilisent un mode d'invasion microtubule-dépendant pour envahir les cellules épithéliales (Meyer et al. 1999, Brissette et al. 1999). Dans notre étude, le traitement avec le nocodazole qui est un agent déstabilisant les microtubules, a induit une inhibition significative de l'invasion bactérienne alors que l'internalisation a été augmentée par un prétraitement avec la cytochalasine D des cellules épithéliales. Ces données suggèrent qu'un mécanisme dépendant des microtubules était impliqué dans l'internalisation des 3 souches de *Desulfovibrio* testées. Il est à souligner que l'invasion de ces souches a été augmentée par la cytochalasine D. Des observations similaires ont été rapportées pour d'autres microorganismes, incluant parmi les parodontopathogènes *A. actinomycetemcomitans*, pour lesquels un réarrangement des microtubules est nécessaire à leur internalisation. Tardieux et al. (1992) ont montré que la cytochalasine D augmentait le flux des lysosomes vers la périphérie cellulaire et de ce fait favorisait l'invasion.

Des études complémentaires seront nécessaires pour évaluer les interactions de *Desulfovibrio* avec les microtubules dans le cytoplasme cellulaire et expliquer les mouvements de la bactérie dans le cytoplasme et le mécanisme par lequel cette bactérie s'échappe des vacuoles d'endocytose.

La destruction tissulaire observée au cours des parodontites est liée en grande partie à un processus inflammatoire chronique du parodonte impliquant de nombreuses cytokines notamment IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α (Tumor Necrosis Factor α). Ces cytokines pro-inflammatoires sont présentes en forte quantité dans le fluide gingivo-crévulaire et les tissus parodontaux des patients atteints de parodontite. La capacité des bactéries à stimuler la sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales est donc un aspect de pathogénicité souvent étudié pour la plupart des bactéries impliquées dans les maladies parodontales. Cet aspect est pris en compte dans les postulats de Koch revisités par Socransky et Haffajee (1992), car toutes les bactéries présentes dans la cavité buccales ne sont pas toutes capables de stimuler les cellules épithéliales (Ji et al. 2007). Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules épithéliales stimulées par les bactéries pathogènes participent à la réponse précoce de l'hôte qui aboutit à l'activation de la cascade des réactions inflammatoires menant à la destruction tissulaire et jouant un rôle majeur dans la progression des parodontites (Graves, 2008).

Aucune étude n'a évalué jusqu'à ce jour la sécrétion cytokinique des cellules épithéliales buccales infectées par *Desulfovibrio* spp.. Dans notre étude, aucune sécrétion d'IL-1 β n'a été détectée dans le surnageant des cellules épithéliales infectées par *D. desulfuricans* 29577ATCC et *D. fairfieldensis* ATCC 700045. Weglarz et al. ont observé que le LPS de *D. desulfuricans* ne provoquait pas de sécrétion d'IL-1 par des cellules Caco-2 (lignées cellulaires issues de carcinome colique) mais avait la capacité d'induire la production d'IL-6 et d'IL-8 par ces cellules ainsi que par les cellules HUVEC (cellules endothéliales des veines humaines ombilicales) (Weglarz et al. 2007; 2003). L'absence de production d'IL-1 après stimulation par *Desulfovibrio* de lignées cellulaires continues telles que les cellules KB et Caco-2, n'exclut pas la possibilité que des cellules épithéliales gingivales primaires puissent sécréter cette cytokine après infection par ce genre bactérien, comme décrit pour *Candida Albicans* (Steele et al. 2002).

Dans notre étude, les deux souches de *Desulfovibrio* testées ont été capables de stimuler la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules KB. Après 2 h d'infection, nous avons observé que les cellules KB sécrétaient une quantité significativement plus élevée d'IL-8 par comparaison aux cellules KB témoins. Cet effet pourrait être la conséquence de divers mécanismes induits par l'adhérence et l'invasion bactérienne. Considérant que l'IL-8 participe au recrutement des monocytes/macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes T, ces résultats suggèrent que *Desulfovibrio* spp. pourrait participer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire via un recrutement plus important des leucocytes

au niveau des tissus parodontaux et de ce fait jouer un rôle dans le processus de destruction de ces tissus. L'augmentation de l'expression des récepteurs endothéliaux VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) – qui favorisent l'adhérence des leucocytes à la surface des cellules endothéliales – observée par Weglarz et al. (2003) après stimulation de ces cellules par *Desulfovibrio*, pourrait également contribuer à ce phénomène.

Dans notre étude, la sécrétion d'IL-8 des cellules infectées n'était pas différente de celle des cellules témoins à partir de 24 h d'infection. En revanche, une augmentation de la production d'IL-6 n'a été détectée qu'après 24 et 48 h d'infection avec *D. desulfuricans* ATCC 29577, et dans une moindre mesure avec *D. fairfieldensis* ATCC 700045. Il est à souligner que pour *D. desulfuricans* ATCC 29577, la sécrétion d'IL-6 était maximale à 48 h ce qui correspond au temps où les concentrations de bactéries intracellulaires viables étaient les plus élevées. Ces résultats suggèrent que la production d'IL-6 pourrait être associée avec la persistance des bactéries intracellulaires.

Seuls Eick et al. (2002, 2006) ont évalué la réponse cytokinique des cellules KB infectées avec le même MOI par un parodontopathogène, *P. gingivalis* ATCC 33277. Ces auteurs, dans une première étude, ont mesuré la production d'IL-6 et d'IL-8 après 6 h et 24 h d'infection (2002). Dans cette étude, une production d'IL-8 supérieure à celle des cellules témoins (x 1,4) n'était détectée que 6 h après l'infection. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans notre étude. Néanmoins, ces mêmes auteurs dans une seconde étude, réalisée dans les mêmes conditions expérimentales, ont détecté des concentrations d'IL-8 bien supérieures et atteignant des niveaux 14 fois supérieurs à ceux du témoin à 6 h et encore 6,5 fois supérieurs à ceux du témoin à 48 h (2006). Ces résultats suggéreraient que la production d'IL-8 par les cellules KB induite par *Desulfovibrio* spp. est inférieure à celle causée par *P. gingivalis*. Cependant, il est difficile de conclure sur ce point, eu égard aux variations des concentrations en IL-8 observées dans les deux études menées par Eick et al. (2002, 2006). Dans des conditions similaires, O'Briens–Simpson et al. (2009) ont évalué la production cytokinique de cellules KB infectées avec *P. gingivalis* W50, et ont détecté une concentration d'IL-8 supérieure à celle des cellules témoins (x 2.7). Ces bactéries n'ont augmenté la synthèse d'IL-6 que de 1.4 fois par comparaison avec les cellules non infectées, ce qui est inférieur aux concentrations obtenues après infection avec *Desulfovibrio* spp.. D'autres auteurs ont évalué la production cytokinique de cellules KB stimulées par *F. nucleatum* et *A. actinomycetemcomitans*, dans des conditions expérimentales identiques, et ont montré la capacité de ces bactéries à induire une concentration d'IL-8 dix fois supérieures au contrôle non infecté pour *F. nucleatum* et une concentration d'IL-6 majorée de dix fois, par comparaison avec le contrôle, pour *A. actinomycetemcomitans* (Eick et al. 2002, Zhang et al.

2008). Dans notre étude, les concentrations d'IL-6 mesurées à 24 h étaient similaires à celles observées par Eick et al. (2002) avec *P. gingivalis*. Nos résultats suggèrent que la persistance de formes viables de *Desulfovibrio* dans les cellules KB pourrait être un facteur favorisant, de par la production d'IL-6, une réponse immuno-inflammatoire et une résorption osseuse après stimulation des ostéoclastes (Herman et al. 2008) (Ishimi et al. 1990).

En conclusion, cette étude montre pour la première fois que *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* sont capables d'envahir les cellules épithéliales buccales par un mécanisme microtubules-dépendant. Ces deux parodontopathogènes putatifs restent viables pendant un temps prolongé dans les cellules épithéliales KB et ont la capacité de s'y multiplier. Ces bactéries sont capables de stimuler la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules eucaryotes infectées et de contribuer ainsi au développement d'une réponse immunitaire conduisant à une destruction des tissus parodontaux. L'internalisation des bactéries dans les cellules épithéliales buccales constitue un risque de recolonisation des lésions et un réservoir infectieux qui pourrait expliquer les parodontites réfractaires qui, malgré un traitement adapté, ne sont pas stabilisées (Johnson et al. 2008). Ceci confirme l'intérêt d'utiliser, lorsque cela est nécessaire des antibiotiques ou des formulations d'antibiotiques permettant de cibler ces sanctuaires intracellulaires tout en étant actifs sur les formes bactériennes extracellulaires résistantes à certains antibiotiques comme par exemple les β lactamines par production de β -lactamases. C'est ce qui nous avait conduits à étudier l'activité antibactérienne du complexe amox- β -CD sur des bactéries productrices de β -lactamases et sur des formes intracellulaires, après avoir étudié les caractéristiques physico-chimiques de ce complexe.

L'étude des caractéristiques physico-chimiques des complexes amox- β -CD a été réalisée par spectrométrie (Infrarouge, RMN), par CLHP et par thermogravimétrie.

L'analyse par spectrométrie infrarouge à TF a permis, de par l'absence de superposition des bandes caractéristiques de l'hôte et de l'invité, de déterminer les bandes d'absorption spécifiques à l'amoxicilline qui étaient comprises entre 1775 – 1240 cm^{-1} . Nous avons montré que le spectre de l'amoxicilline libre (zwitterion) comprenait des bandes caractéristiques de C=C aromatique, C=O et N-H de l'amide ($\nu_{\text{C=O}}$, ν_{NH}), C=O du cycle β -lactame, ($\nu_{\text{C=O}}$) et le carboxylate (ν_{sCOO^-} et ν_{asCOO^-}) comme décrit par Fogazzi et al. (2003) et Di Stephano et al. (2002). La complexation avec la β -CD a induit un déplacement des bandes d'absorption du

carbonyl du cycle β -lactame vers un nombre d'ondes plus faible et un déplacement de celles du carboxylate de l'amoxicilline vers des fréquences plus élevées. Le déplacement de la vibration vers des fréquences plus élevées est caractéristique d'une modification structurale du groupe carboxylate qui passe d'une forme zwitterionique COO^- , dans l'amoxicilline libre, à une forme type ester O-C=O après complexation (Di Stephano et al. 2002). Ceci est généralement le résultat de l'interaction entre la molécule invitée et la cyclodextrine hôte et s'explique par la rupture de liaisons hydrogènes intermoléculaires et l'établissement de liaisons plus fortes dans le système complexé. Les changements spectraux étant la conséquence des vibrations de groupes d'atomes directement impliqués dans l'interaction, ces résultats expérimentaux indiquent clairement que les groupements carboxylate et carbonyle ont participé à la complexation de tous les systèmes binaires amox- β -CD. Ceci est conforté par l'absence de mise en évidence de déplacement de ces mêmes groupements dans le mélange physique.

La comparaison des spectres RMN du proton de l'amoxicilline, de la β -CD et des complexes amox- β -CD avait montré un léger déplacement des protons H3, localisés à l'intérieur de la cavité de la cyclodextrine. Ces données sont en accord avec les résultats de Maffeo et al. (2006). Une absence de signal des protons H5 est apparue dès la première addition d'amoxicilline et était le fait d'un déplacement fort ceux-ci. L'absence de modification de la constante de couplage du quartet H5 et H6 de l'amoxicilline après complexation a confirmé la stabilité du cycle β -lactame.

Les déplacements chimiques vers les champs forts qui ont été observés pour les hydrogènes aromatiques, β -lactamiques et méthyléniques des complexes amox- β -CD de rapport molaire 1:1 à 1:5, sont le résultat d'interactions hydrophobes et la conséquence de l'inclusion de l'amoxicilline à l'intérieur de la cavité de la β -CD.

Cependant, aucune interaction dipolaire entre l'amoxicilline et la β -CD n'est observée dans le spectre ROESY 2D (données non montrées), ce qui suggère l'absence de toute association moléculaire définie en solution. Néanmoins, nous ne pouvons exclure la présence d'échanges intermoléculaires rapides empêchant l'observation d'une telle association à l'échelle de la RMN. La coexistence de deux isomères d'orientation différente pourrait aussi expliquer l'absence de déplacement chimique des protons de la cavité de la β -CD.

Les études par différentes techniques de spectrométrie ont permis d'évaluer les déplacements des groupements chimiques et ceux du proton de l'amoxicilline après

complexation. Ces analyses ont donc permis de connaître précisément les interactions entre la molécule invitée et la CD hôte.

La thermogravimétrie et la calorimétrie différentielle ont permis de quantifier des variations de masse et d'énergie de la molécule d'amoxicilline en fonction de la température. Le spectre DSC de l'amoxicilline seule a présenté un premier pic endothermique à 83,3°C correspondant à la déshydratation de la molécule. Un pic exothermique à 176,8 °C reflétant le passage de l'amoxicilline à un état cristallin, et un pic endothermique situé entre 202,8 et 242,8°C, correspondant à la dégradation par fusion de cette molécule ont été observés. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Marciniak et al. (2002) qui rapportait un point de fusion pour l'amoxicilline à 190,1°C dans une étude sous hélium et avec un chauffage de 5°C/minute. L'étude du spectre de masse des ions moléculaires de l'amoxicilline a confirmé les observations faites en DSC.

L'étude comparée des propriétés thermiques de l'amoxicilline, de la β -CD, du mélange physique des deux molécules et du complexe amox- β -CD a mis en évidence la disparition totale du pic exothermique de transition vitreuse et du pic endothermique de fusion-dégradation situé entre 202,8°C – 242,8°C, de l'amoxicilline après complexation. Par ailleurs, la formation du complexe d'inclusion a été confirmée après enregistrement du profil thermique en DSC du mélange physique qui correspond à la superposition du profil des deux composants (amoxicilline et β -CD). Ce profil aplati, obtenu pour le complexe, a été considéré comme apportant la preuve concluante de l'encapsulation de l'amoxicilline dans la cavité de la β -CD pour de nombreux auteurs (Fernandes et al. 2002, Giordano et al. 2001, Giordano et al. 1993, Szejtli et al. 1984).

Une augmentation de la solubilité de l'amoxicilline par liaison avec la β -CD a été mise en évidence par CLHP de par la diminution du temps de rétention de cet antibiotique après l'ajout d'une concentration croissante de β -CD. Le coefficient de complexation de 1878 M⁻¹ a été ainsi obtenu. Ceci suggère que ce complexe pourrait, du fait de sa stabilité être utilisé dans des préparations à visée thérapeutique (Dalmora et al. 1999; Rozou et al. 2005).

La complexation par l'amoxicilline anhydride avec la β -CD a été confirmée par RMN, IR-TF, CLHP et par l'analyse thermique. Les analyses par CLHP ont permis d'établir l'existence d'un complexe stable de stœchiométrie [1 :1]. Nous avons montré que le cycle phényle de l'amoxicilline était inclus dans la cavité de la cyclodextrine et que les groupements

carboxyles ionisés du cycle thiazolidique formaient des liaisons hydrogènes avec un groupement hydroxyle secondaires d'une autre cyclodextrine. Ces résultats sont concordants avec ceux rapportés par Maffeo et al. (2006) et suggèrent l'absence d'encapsulation du cycle β lactame de l'amoxicilline. Le schéma proposé du complexe est le suivant:

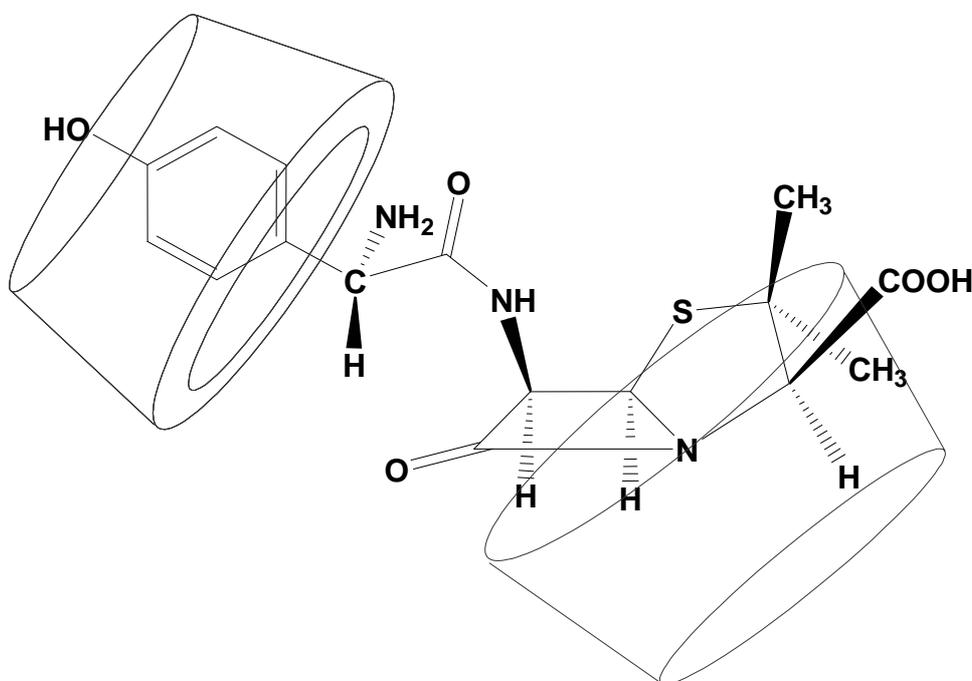


Figure 31. Hypothèse d'inclusion de l'amoxicilline dans la β -cyclodextrine.

Il a été montré que l' α -CD provoquait une hydrolyse de la pénicilline V (Qi et al. 1991). Dans notre étude, pour tous les isolats sensibles à l'amoxicilline, la complexation avec une β -CD n'a pas entraîné de modification de l'activité inhibitrice de l'amoxicilline. Par ailleurs, l'analyse en RMN nous a permis de vérifier que cette complexation n'altérait pas l'intégrité du cycle β -lactame.

Pour les souches productrices de β -lactamase, aucune amélioration significative de l'activité de l'amoxicilline n'a été mise en évidence après complexation. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude physico-chimique qui a montré une absence de protection du cycle β -lactame par la β -CD. A défaut d'une protection par l'introduction de ce cycle dans la cavité de la β -CD, un encombrement stérique de cette dernière aurait pu limiter l'hydrolyse du cycle β -lactame, en empêchant un bon positionnement de l'enzyme. Cette hypothèse est cependant peu probable eu égard à l'absence d'effet significatif de la complexation sur

l'activité antibactérienne de l'amoxicilline en présence de souches produisant une β lactamases. Nos résultats sont en désaccord, au moins partiellement, avec ceux rapportés par Athanassiou et al. (2003) qui ont montré qu'après complexation avec une β -CD, l'activité de l'ampicilline était partiellement restaurée vis-à-vis de certaines entérobactéries productrices de β lactamases. De telles discordances pourraient être expliquées par le fait que les espèces testées, les β -lactamases produites et l'antibiotique étudié étaient différents.

Il est à souligner que pour une souche clinique (LBN 303), ne produisant pas de β -lactamase mais résistante à l'amoxicilline, la complexation avec une β -CD ([1 :1] et [1 :3]) a néanmoins provoqué une légère amélioration de l'activité inhibitrice de cet antibiotique. Ce phénomène pourrait peut être dû à un encombrement stérique du complexe amoxicilline- β -CD qui, plus volumineux, serait plus difficile à éliminer par le système à efflux de la bactérie potentiellement impliqué dans le mécanisme de résistance (Pagès et al. 2009) et/ou au fait que l'amoxicilline pourrait emprunter une voie de pénétration additionnelle liée à des porines intervenant dans la diffusion de cyclodextrines à travers la membrane externe décrites chez certaines bactéries (Pajatsch et al. 1999).

La mauvaise diffusion tissulaire et cellulaire de l'amoxicilline est un inconvénient majeur dans le traitement des maladies parodontales. Cependant, cet antibiotique présente l'intérêt d'avoir un spectre d'action potentiellement plus intéressant, d'autant plus qu'il est associé à un inhibiteur de β -lactamase, que d'autres molécules couramment utilisées comme les tétracyclines ou les nitro-imidazolés, dont la diffusion tissulaire est meilleure.

L'utilisation locale d'amoxicilline, sous forme d'une préparation contenant des complexes amoxicilline- β -CD aurait pu permettre d'obtenir une action ciblée à des concentrations élevées sur les bactéries présentes au niveau des sites infectés. Bien que l'amoxicilline complexée ne soit pas significativement protégée vis-à-vis de l'action des β -lactamases produites par des bactéries parodontales, la complexation par les CD aurait pu présenter l'intérêt d'améliorer la diffusion intracellulaire de l'amoxicilline comme décrit pour d'autres molécules complexées en particulier des agents antiviraux. En effet, de nombreuses bactéries impliquées dans ces infections ont la capacité de coloniser les tissus profonds et de s'internaliser dans les cellules épithéliales. Les microorganismes évincent ainsi les défenses de l'hôte et échappent à l'action d'antibiotiques tels que les pénicillines. Néanmoins, aucune activité significative de l'amoxicilline n'a pu être mise en évidence sur les formes

intracellulaires de *P. gingivalis* ATCC 33277. Ceci suggère que la complexation de l'amoxicilline avec une β -cyclodextrine n'augmente pas la diffusion intracellulaire de cet antibiotique. D'autres auteurs ont montré que la complexation de la ribavirine pouvait augmenter l'action intracellulaire antivirale de cette molécule. Ces auteurs n'excluaient cependant pas le fait que ce phénomène pouvait n'être que le reflet d'une meilleure biodisponibilité de surface de cet antiviral présentant une capacité de diffusion intracellulaire intrinsèque (Grancher et al. 2004). Nos résultats sont en concordance avec cette hypothèse.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le principal objectif de ce travail était d'évaluer le potentiel pathogénique parodontal de deux espèces de bactéries sulfato-réductrices, *Desulfovibrio fairfieldensis* et *Desulfovibrio desulfuricans*, par l'étude des interactions de ces microorganismes avec les cellules épithéliales buccales. A l'aide d'un modèle d'infection *in vitro* de cellules KB, nous avons montré, pour la première fois, que ces microorganismes étaient capables d'envahir ces cellules, d'y survivre au sein du cytoplasme et de s'y multiplier. Cette internalisation était dépendante de la polymérisation des microtubules des cellules infectées mais au contraire indépendante du remodelage des microfilaments d'actine. Dans notre travail, nous avons également observé que la stimulation des cellules KB par *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* induisait une production accrue d'IL-6 et d'IL-8. Sous réserve d'extrapolation de ces résultats à l'homme, nos résultats suggèrent que l'internalisation de ces bactéries dans les cellules épithéliales buccales pourrait conduire, avec d'autres parodontopathogènes invasifs, à la constitution d'un réservoir, peu accessible aux défenses immunitaires et à un grand nombre d'antibiotiques. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, les recolonisations bactériennes des lésions après traitement par surfaçage et être un facteur favorisant la survenue de parodontites réfractaires qui, malgré une thérapie adaptée, ne sont pas stabilisées. Par ailleurs, l'induction de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires par les cellules eucaryotes infectées par *Desulfovibrio* pourrait contribuer au développement d'une réponse immunitaire conduisant à une destruction des tissus parodontaux.

Ce pouvoir invasif a confirmé l'intérêt d'utiliser des formulations d'antibiotiques permettant de cibler ces niches intracellulaires tout en étant actifs sur les formes bactériennes extracellulaires de *Desulfovibrio*.

Dans une autre partie de ce travail, mené en parallèle, nous avons tenté d'améliorer l'activité antibactérienne et la diffusion intracellulaire de l'amoxicilline par la création d'un système binaire amoxicilline- β -cyclodextrine (β -CD). La complexation de l'amoxicilline anhydride avec la β -CD a été confirmée par RMN, IR-FT, CLHP et par analyse thermique. Les analyses par CLHP ont permis d'établir l'existence d'un complexe stable de stœchiométrie [1:1] compatible avec son utilisation dans des préparations pharmaceutiques. La complexation de l'amoxicilline n'a cependant pas permis de restaurer l'activité de cet antibiotique sur des souches produisant une β -lactamase et appartenant à l'espèce *D. fairfieldensis* et à d'autres espèces habituellement isolées au niveau de sites parodontaux. Ces résultats sont concordants avec l'absence d'encapsulation du cycle β -lactame de l'amoxicilline par la cyclodextrine. Nous avons en effet montré que seul le cycle phényl de l'amoxicilline était inclus dans la cavité de la cyclodextrine et que le groupement carboxyle ionisé du cycle thiazolidique formait des liaisons hydrogènes avec un groupement hydroxyle

secondaire d'une autre cyclodextrine. Ces résultats ainsi que le fait que nous n'avons pas observé *in vitro* d'effet de l'amoxicilline complexée sur des formes intracellulaires de bactéries parodontopathogènes ne permettent pas de proposer d'utiliser ces complexes dans le cadre d'une thérapie locale.

La mise au point d'un modèle d'infection *in vitro* représente une base de travail qui nous permettra d'étudier la réponse cytokinique de cellules épithéliales humaines primaires et de fibroblastes après infection avec *Desulfovibrio* spp. seul ou associé avec d'autres parodontopathogènes, et permettra ainsi de mieux comprendre le rôle joué par *Desulfovibrio* sp. dans l'apparition et le développement des maladies parodontales. Nous poursuivrons nos investigations concernant l'évaluation d'un rôle putatif de *Desulfovibrio* dans la pathogénèse des maladies parodontales par l'étude chez l'animal des capacités de cette bactérie à provoquer une parodontite ou à potentialiser les destructions tissulaires parodontales induites par d'autres parodontopathogènes.

BIBLIOGRAPHIE

AFSSAPS: Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé. Prescription des antibiotiques en odontologie et stomatologie. Recommandations et argumentaires. 2001. Adresse URL : <http://www.agmed.sante.gouv.fr>.

Agatonovic-Kustrin, S., Williams, D., Ibrahim; N., Glass, B.D. 2007. Influence of sulfobutylether-beta-cyclodextrin on the stability of S- and R-omeprazole. *Curr Drug Discov Technol* **4**:192-197.

Aleem, O., B. Kuchekar, Y. Pore, and S. Late. 2008. Effect of beta-cyclodextrin and hydroxypropyl beta-cyclodextrin complexation on physicochemical properties and antimicrobial activity of cefdinir. *J Pharm Biomed Anal* **47**:535-540.

Allabashi, R., M. Arkas, G. Hormann, and D. Tsiourvas. 2007. Removal of some organic pollutants in water employing ceramic membranes impregnated with cross-linked silylated dendritic and cyclodextrin polymers. *Water Res* **41**:476-486.

Alonso, L., P. Cuesta, J. Fontecha, M. Juarez, and S. E. Gilliland. 2009. Use of beta-cyclodextrin to decrease the level of cholesterol in milk fat. *J Dairy Sci* **92**:863-869.

Amano, A. 2003. Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* **74**:90-96.

Amornchat, C., S. Rassameemasmaung, W. Sripairojthikoon, and S. Swasdison. 2003. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts in vitro. *J Int Acad Periodontol* **5**:98-105.

Andrian, E., D. Grenier, and M. Rouabhia. 2006. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* **85**:392-403.

Antlsperger, G., Schmid,, G. 1996. Toxicology comparison of cyclodextrins, p. 149-155. *In* J. Szejtli, Szenté (ed.), Proceedings of the eight international symposium on cyclodextrins. Kluwer Acad. Pub. Dordrecht, Budapest.

Armitage, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**:1-6.

Asakawa, R., H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, R. B. Goncalves, S. Izumi, T. Fujiwara, Y. Nakano, N. Suzuki, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M. A. Taubman, H. Kurihara, and M. Sugai. 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* **50**:1125-1139.

Asbahr, A. C., L. Franco, A. Barison, C. W. Silva, H. G. Ferraz, and L. N. Rodrigues. 2009. Binary and ternary inclusion complexes of finasteride in HPbetaCD and polymers: preparation and characterization. *Bioorg Med Chem* **17**:2718-2723.

Athanassiou, G., S. Michaleas, E. Lada-Chitiroglou, T. Tsitsa, and E. Antoniadou-Vyza. 2003. Antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance. *J Pharm Pharmacol* **55**:291-300.

- Axmann, R., C. Bohm, G. Kronke, J. Zwerina, J. Smolen, and G. Schett.** 2009. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis Rheum* **60**:2747-2756.
- Babidge, W., S. Millard, and W. Roediger.** 1998. Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Mol Cell Biochem* **181**:117-124.
- Bacon, D. J., R. A. Alm, D. H. Burr, L. Hu, D. J. Kopecko, C. P. Ewing, T. J. Trust, and P. Guerry.** 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun* **68**:4384-4390.
- Barzegar, A., A. A. Moosavi-Movahedi, S. Rezaei-Zarchi, A. A. Saboury, M. R. Ganjali, P. Norouzi, G. H. Hakimelahi, and F. Y. Tsai.** 2008. The mechanisms underlying the effect of alpha-cyclodextrin on the aggregation and stability of alcohol dehydrogenase. *Biotechnol Appl Biochem* **49**:203-211.
- Beech, I. B., Gaylarde, C.C.** 1989. Adhesion of *Desulfovibrio desulfuricans* and *Pseudomonas fluorescens* to mild steel surfaces. *J. Appl. bacteriol* **67**.
- Beerens, H., and C. Romond.** 1977. Sulfate-reducing anaerobic bacteria in human feces. *Am J Clin Nutr* **30**:1770-1776.
- Beni, S., Z. Szakacs, O. Csernak, L. Barcza, and B. Noszal.** 2007. Cyclodextrin/imatinib complexation: binding mode and charge dependent stabilities. *Eur J Pharm Sci* **30**:167-174.
- Bielejewska, A., K. Duszczak, A. Kwarczak, and D. Sybilska.** 2002. Comparative study on the enantiomer separation of 1,1'-binaphthyl-2,2'-diyl hydrogenphosphate and 1,1'-bi-2-naphthol by liquid chromatography and capillary electrophoresis using single and combined chiral selector systems. *J Chromatogr A* **977**:225-237.
- Bisson-Boutelliez, C.** 2003. Recherche d'impacts immunologiques des bactéries sulfato-réductrices sur le lysozyme et les immunoglobulines G. *Faculté de Médecine*.
- Bodet, C., F. Chandad, and D. Grenier.** 2006. Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* **8**:27-35.
- Bodet, C., F. Chandad, and D. Grenier.** 2007. [Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis]. *Pathol Biol (Paris)* **55**:154-162.
- Boopathy, R., M. Robichaux, D. LaFont, and M. Howell.** 2002. Activity of sulfate-reducing bacteria in human periodontal pocket. *Can J Microbiol* **48**:1099-1103.
- Boulmedarat, L., A. Bochot, S. Lesieur, and E. Fattal.** 2005. Evaluation of buccal methyl-beta-cyclodextrin toxicity on human oral epithelial cell culture model. *J Pharm Sci* **94**:1300-1309.
- Bourgeois, D., P. Bouchard, and C. Mattout.** 2007. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002-2003. *J Periodontal Res* **42**:219-227.

Brewster, M. E., Loftsson, T. Estes K.S., Lin, J.L., Frioriksdottir, H. 1992. Effects of various cyclodextrins on solution stability and dissolution rate of doxorubicin hydrochlorids. *Int J. Pharm* **79**:289-299.

Brewster, M. E., Mackie, C., Lampo, A., Noppe, M. Loftsson, T. 2007. The use of solubilizing excipients and approaches to generate toxicology vehicles for contemporary drug pipelines., p. 221-256. *In* P. Augustijns, Brewster, M.E. (ed.), *Solvent systems and their selection in pharmaceuticals and biopharmaceuticals*. American Association Pharmaceutical Scientists and Springer, New-York.

Brewster, M. E., and T. Loftsson. 2007. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv Drug Deliv Rev* **59**:645-666.

Brissette, C. A., and P. M. Fives-Taylor. 1999. Actinobacillus actinomycetemcomitans may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol* **14**:137-142.

Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros. 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* **39**:1211-1233.

Calenic, B., K. Yaegaki, T. Murata, T. Imai, I. Aoyama, T. Sato, and H. Ii. 2009. Oral malodorous compound triggers mitochondrial-dependent apoptosis and causes genomic DNA damage in human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res.* **8**: [epub ahead of print].

Cappello, B., G. De Rosa, L. Giannini, M. I. La Rotonda, G. Mensitieri, A. Miro, F. Quaglia, and R. Russo. 2006. Cyclodextrin-containing poly(ethyleneoxide) tablets for the delivery of poorly soluble drugs: potential as buccal delivery system. *Int J Pharm* **319**:63-70.

Chen, Q. C., S. J. Jeong, G. S. Hwang, K. H. Kim, and J. S. Kang. 2008. Enantioselective determination of chlorpheniramine in various formulations by HPLC using carboxymethyl-beta-cyclodextrin as a chiral additive. *Arch Pharm Res* **31**:523-529.

Chen, T., K. Nakayama, L. Belliveau, and M. J. Duncan. 2001. Porphyromonas gingivalis gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* **69**:3048-3056.

Choi, B. K., S. Y. Moon, J. H. Cha, K. W. Kim, and Y. J. Yoo. 2005. Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Treponema socranskii. *J Periodontol* **76**:813-820.

Claridge, T. D. W. 1999. *Organic chemistry*. Pergamon Press, Oxford.

Clark, E. A., and J. S. Brugge. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**:233-239.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standard, 7th ed.* CLSI document M11-A7, Wayne, P.A.

Colombo, A. V., C. M. da Silva, A. Haffajee, and A. P. Colombo. 2007. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence in situ hybridization. *J Periodontal Res* **42**:236-243.

Cooper, D. M., D. L. Swanson, S. M. Barns, and C. J. Gebhart. 1997. Comparison of the 16S ribosomal DNA sequences from the intracellular agents of proliferative enteritis in a hamster, deer, and ostrich with the sequence of a porcine isolate of *Lawsonia intracellularis*. *Int J Syst Bacteriol* **47**:635-639.

Cossart, P., Boquet, P., Normak, S., Rappuoli, R. 2005. Cellular microbiology, 2nd ed. ASM Press, Washington.

Cummings, J. H., and G. T. Macfarlane. 1997. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **21**:357-365.

Cutter, L. A., P. M. van Schie, and M. Fletcher. 2003. Adhesion of anaerobic microorganisms to solid surfaces and the effect of sequential attachment on adhesion characteristics. *Biofouling* **19**:9-18.

Dalmora, M. E., and A. G. Oliveira. 1999. Inclusion complex of piroxicam with beta-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion. *Int J Pharm* **184**:157-164.

David, S. 1995. Chimie moléculaire et supramoléculaire des sucres. EDP Sciences.

Davydova, M. N., and R. Z. Sabirova. 2003. Anti-oxidant defense of the cell *Desulfovibrio desulfuricans* B-1388. *Anaerobe* **9**:39-41.

de Melo, N. F., R. Grillo, A. H. Rosa, and L. F. Fraceto. 2008. Interaction between nitroheterocyclic compounds with beta-cyclodextrins: phase solubility and HPLC studies. *J Pharm Biomed Anal* **47**:865-869.

Defaye, J., J. M. Garcia Fernandez, and C. Ortiz Mellet. 2007. [Pharmaceutical use of cyclodextrines: perspectives for drug targeting and control of membrane interactions]. *Ann Pharm Fr* **65**:33-49.

Del Valle, M. E. M. 2004. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem* **39**:1033-1046.

Deshpande, R. G., M. B. Khan, and C. A. Genco. 1998. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **66**:5337-5343.

Di Stefano, R., M. Scopelliti, C. Pellerito, T. Fiore, R. Vitturi, M. S. Colomba, P. Gianguzza, G. C. Stocco, M. Consiglio, and L. Pellerito. 2002. Organometallic complexes with biological molecules. XVII. Triorganotin(IV) complexes with amoxicillin and ampicillin. *J Inorg Biochem* **89**:279-292.

Discipio, R. G., P. J. Daffern, M. Kawahara, R. Pike, J. Travis, T. E. Hugli, and J. Potempa. 1996. Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology* **87**:660-667.

- Dolla, A., M. Fournier, and Z. Dermoun.** 2006. Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *J Biotechnol* **126**:87-100.
- Dorn, B. R., J. N. Burks, K. N. Seifert, and A. Progulske-Fox.** 2000. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **187**:139-144.
- Dorn, B. R., W. A. Dunn, Jr., and A. Progulske-Fox.** 1999. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect Immun* **67**:5792-5798.
- Dorn, B. R., W. A. Dunn, Jr., and A. Progulske-Fox.** 2001. *Porphyromonas gingivalis* traffics to autophagosomes in human coronary artery endothelial cells. *Infect Immun* **69**:5698-5708.
- Dos Santos, W. G., I. Pacheco, M. Y. Liu, M. Teixeira, A. V. Xavier, and J. LeGall.** 2000. Purification and characterization of an iron superoxide dismutase and a catalase from the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio gigas*. *J Bacteriol* **182**:796-804.
- Du, L. D., and P. E. Kolenbrander.** 2000. Identification of saliva-regulated genes of *Streptococcus gordonii* DL1 by differential display using random arbitrarily primed PCR. *Infect Immun* **68**:4834-4837.
- Duchêne, D., Debruyères, B., Brétilon, A.** 1984. Les cyclodextrines. Nature, Origine et intérêts en pharmacie galénique. *Labo. Pharma.-Prob. Tech* **32**:842-850.
- Duncan, M. J., S. Nakao, Z. Skobe, and H. Xie.** 1993. Interactions of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* **61**:2260-2265.
- Edwards, A. M., T. J. Grossman, and J. D. Rudney.** 2006. *Fusobacterium nucleatum* transports noninvasive *Streptococcus cristatus* into human epithelial cells. *Infect Immun* **74**:654-662.
- Eick, S., A. Reissmann, J. Rodel, K. H. Schmidt, and W. Pfister.** 2006. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol* **21**:231-237.
- Eick, S., J. Rodel, J. W. Einax, and W. Pfister.** 2002. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with KB cells: comparison of different clinical isolates. *Oral Microbiol Immunol* **17**:201-208.
- Feres, M., A. D. Haffajee, K. Allard, S. Som, J. M. Goodson, and S. S. Socransky.** 2002. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* **29**:724-735.
- Fernandes, C. M., M. Teresa Vieira, and F. J. Veiga.** 2002. Physicochemical characterization and in vitro dissolution behavior of nicardipine-cyclodextrins inclusion compounds. *Eur J Pharm Sci* **15**:79-88.
- Feucht, E. C., C. L. DeSanti, and A. Weinberg.** 2003. Selective induction of human beta-defensin mRNAs by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in primary and immortalized oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* **18**:359-363.

- Fields, L. B.** 2008. Oral care intervention to reduce incidence of ventilator-associated pneumonia in the neurologic intensive care unit. *J Neurosci Nurs* **40**:291-298.
- Figueiras, A., J. M. Sarraguca, R. A. Carvalho, A. A. Pais, and F. J. Veiga.** 2007. Interaction of omeprazole with a methylated derivative of beta-cyclodextrin: phase solubility, NMR spectroscopy and molecular simulation. *Pharm Res* **24**:377-389.
- Finlay, B. B.** 1990. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **2**:815-820.
- Finlay, B. B., and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:136-169.
- Fite, A., G. T. Macfarlane, J. H. Cummings, M. J. Hopkins, S. C. Kong, E. Furrrie, and S. Macfarlane.** 2004. Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. *Gut* **53**:523-529.
- Fives-Taylor, P., D. Meyer, and K. Mintz.** 1995. Characteristics of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of and adhesion to cultured epithelial cells. *Adv Dent Res* **9**:55-62.
- Fives-Taylor, P. M., D. H. Meyer, K. P. Mintz, and C. Brissette.** 1999. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontol 2000* **20**:136-167.
- Fogazzi, G. B., M. Cantu, L. Saglimbeni, and M. Daudon.** 2003. Amoxicillin, a rare but possible cause of crystalluria. *Nephrol Dial Transplant* **18**:212-214.
- Fosse, T., I. Madinier, C. Hitzig, and Y. Charbit.** 1999. Prevalence of beta-lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* **14**:352-357.
- Foweraker, J. E., P. M. Hawkey, J. Heritage, and H. W. Van Landuyt.** 1990. Novel beta-lactamase from *Campylobacter* sp. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1501-1504.
- Fox, J. G., F. E. Dewhirst, G. J. Fraser, B. J. Paster, B. Shames, and J. C. Murphy.** 1994. Intracellular *Campylobacter*-like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. *J Clin Microbiol* **32**:1229-1237.
- Fujishima, N., Kusaka, K., Umino, T., Urushinata, T., Terumi, K.** 2001. Flour based foods containing highly branched cyclodextrins. Japanese patent.
- Gainet, J., P. M. Dang, S. Chollet-Martin, M. Brion, M. Sixou, J. Hakim, M. A. Gougerot-Pocidallo, and C. Elbim.** 1999. Neutrophil dysfunctions, IL-8, and soluble L-selectin plasma levels in rapidly progressive versus adult and localized juvenile periodontitis: variations according to disease severity and microbial flora. *J Immunol* **163**:5013-5019.
- Gebhart, C. J., S. M. Barns, S. McOrist, G. F. Lin, and G. H. Lawson.** 1993. Ileal symbiont intracellularis, an obligate intracellular bacterium of porcine intestines showing a relationship to *Desulfovibrio* species. *Int J Syst Bacteriol* **43**:533-538.

- Gibson , G. R., Cummings, J.H., Mc Farlane, G.T.** 1993. Growth and activities of sulfate-reducing bacteria in gut content of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol Ecol.* **86**:103-112.
- Gibson, G. R., G. T. Macfarlane, and J. H. Cummings.** 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *J Appl Bacteriol* **65**:103-111.
- Giordano, F., C. Novak, J. R Moyano.** 2001. Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds. *Thermochim Acta* **380**: 123-151.
- Giordano, F., G. Bruni, G.-P Bettinetti.**1992. Solid state microcalorimetry on drug-cyclodextrin binary systems. *J Therm Anal* **38**: 2683-2691.
- Gleissner, C., I. Springborn, and B. Willershausen.** 2003. Effect of periodontal therapy on sulcular sulphide level a longitudinal study. *Eur J Med Res* **8**:33-46.
- Goldstein, E. J., D. M. Citron, V. A. Peraino, and S. A. Cross.** 2003. Desulfovibrio desulfuricans bacteremia and review of human Desulfovibrio infections. *J Clin Microbiol* **41**:2752-2754.
- Gomez-Garcia, M., J. M. Benito, D. Rodriguez-Lucena, J. X. Yu, K. Chmurski, C. Ortiz Mellet, R. Gutierrez Gallego, A. Maestre, J. Defaye, and J. M. Garcia Fernandez.** 2005. Probing secondary carbohydrate-protein interactions with highly dense cyclodextrin-centered heteroglycoclusters: the heterocluster effect. *J Am Chem Soc* **127**:7970-7971.
- Gould, S., and R. C. Scott.** 2005. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem Toxicol* **43**:1451-1459.
- Gracieux, P., Robert, J.C., Bonnaure-Mallet, M.** 2006. Biofilms buccaux, p. 144-159. *In* H. Chardin, Barsotti, O., Bonnaure-Mallet, M. (ed.), *Microbiologie en odonto-stomatologie*. Maloine, Paris.
- Grancher, N., V. Venard, F. Kedzierewicz, W. Ammerlaan, C. Finance, C. P. Muller, and A. Le Faou.** 2004. Improved antiviral activity in vitro of ribavirin against measles virus after complexation with cyclodextrins. *Antiviral Res* **62**:135-137.
- Granlund-Edstedt, M., E. Johansson, R. Claesson, and J. Carlsson.** 1993. Effect of anaerobiosis and sulfide on killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res* **28**:346-353.
- Graves, D.** 2008. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* **79**:1585-1591.
- Haffajee, A. D., and S. S. Socransky.** 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**:78-111.
- Han, Y. W., W. Shi, G. T. Huang, S. Kinder Haake, N. H. Park, H. Kuramitsu, and R. J. Genco.** 2000. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* **68**:3140-3146.

- Handal, T., D. A. Caugant, and I. Olsen.** 2003. Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in a norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1443-1446.
- Handal, T., I. Olsen, C. B. Walker, and D. A. Caugant.** 2004. Beta-lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **19**:303-308.
- Handal, T., I. Olsen, C. B. Walker, and D. A. Caugant.** 2005. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett* **242**:319-324.
- Hasegawa, Y., J. J. Mans, S. Mao, M. C. Lopez, H. V. Baker, M. Handfield, and R. J. Lamont.** 2007. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. *Infect Immun* **75**:2540-2547.
- Hellstrom, U., E. C. Hallberg, J. Sandros, L. Rydberg, and A. E. Backer.** 2004. Carbohydrates act as receptors for the periodontitis-associated bacterium *Porphyromonas gingivalis*: a study of bacterial binding to glycolipids. *Glycobiology* **14**:511-519.
- Hensyl, W. R.** 1994. Dissimulatory sulfate or sulfur reducing bacteria., p. 335-346. *In* W. Lippincott (ed.), *Beergey's manual of determinative bacteriology*. Wilkins, Philadelphia.
- Herman, S., G. Kronke, and G. Schett.** 2008. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med* **14**:245-253.
- Herrera, D., A. J. van Winkelhoff, N. DelleMijn-Kippuw, E. G. Winkel, and M. Sanz.** 2000. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *J Clin Periodontol* **27**:520-525.
- Higushi, T., Connors, K.A.** 1965. Phase solubility techniques, p. 117-212. *In* C. N. Reilley (ed.), *Advances in analytical chemistry and instrumentation*.
- Holvoet, C., Y. V. Heyden, and J. Plaizier-Vercammen.** 2007. Development of an omeprazole parenteral formulation with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Pharm Dev Technol* **12**:327-336.
- Houalet-Jeanne, S., P. Pellen-Mussi, S. Tricot-Doleux, J. Apiou, and M. Bonnaure-Mallet.** 2001. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infect Immun* **69**:7146-7151.
- Houle, M. A., Grenier, D.** 2003. Maladies parodontales: connaissances actuelles. *Med. Mal. Infect.* **33**:331-340.
- Hu, L., and D. J. Kopecko.** 1999. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect Immun* **67**:4171-4182.
- Hugoson, A., and O. Norderyd.** 2008b. Has the prevalence of periodontitis changed during the last 30 years? *J Clin Periodontol* **35**:338-345.

- Hugoson, A., B. Sjodin, and O. Norderyd.** 2008a. Trends over 30 years, 1973-2003, in the prevalence and severity of periodontal disease. *J Clin Periodontol* **35**:405-414.
- Hujoel, P. P., M. Drangsholt, C. Spiekerman, and N. S. Weiss.** 2003. An exploration of the periodontitis-cancer association. *Ann Epidemiol* **13**:312-316.
- Hulten, K., R. Rigo, I. Gustafsson, and L. Engstrand.** 1996. New pharmacokinetic in vitro model for studies of antibiotic activity against intracellular microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* **40**:2727-2731.
- Imamura, T.** 2003. The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* **74**:111-118.
- Inagaki, S., S. Onishi, H. K. Kuramitsu, and A. Sharma.** 2006. Porphyromonas gingivalis vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "Tannerella forsythia". *Infect Immun* **74**:5023-5028.
- Irie, T., and K. Uekama.** 1997. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* **86**:147-162.
- Isberg, R. R., and G. T. Van Nhieu.** 1995. The mechanism of phagocytic uptake promoted by invasin-integrin interaction. *Trends Cell Biol* **5**:120-124.
- Ishimi, Y., C. Miyaura, C. H. Jin, T. Akatsu, E. Abe, Y. Nakamura, A. Yamaguchi, S. Yoshiki, T. Matsuda, T. Hirano, and et al.** 1990. IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *J Immunol* **145**:3297-3303.
- Jagels, M. A., J. A. Ember, J. Travis, J. Potempa, R. Pike, and T. E. Hugli.** 1996. Cleavage of the human C5A receptor by proteinases derived from Porphyromonas gingivalis: cleavage of leukocyte C5a receptor. *Adv Exp Med Biol* **389**:155-164.
- Jain, S. K., Y. Gupta, A. Jain, and S. Amin.** 2008. Elastic liposomes bearing meloxicam-beta-cyclodextrin for transdermal delivery. *Curr Drug Deliv* **5**:207-214.
- Ji, S., Y. Kim, B. M. Min, S. H. Han, and Y. Choi.** 2007. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* **42**:503-510.
- Johnson, J. D., R. Chen, P. A. Lenton, G. Zhang, J. E. Hinrichs, and J. D. Rudney.** 2008. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol* **79**:2305-2312.
- Johnson, C. C., and S. M. Finegold.** 1987. Uncommonly encountered, motile, anaerobic gram-negative bacilli associated with infection. *Rev Infect Dis* **9**:1150-1162.
- Kadowaki, T., K. Nakayama, K. Okamoto, N. Abe, A. Baba, Y. Shi, D. B. Ratnayake, and K. Yamamoto.** 2000. Porphyromonas gingivalis proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem* **128**:153-159.
- Katz, J., V. Sambandam, J. H. Wu, S. M. Michalek, and D. F. Balkovetz.** 2000. Characterization of Porphyromonas gingivalis-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun* **68**:1441-1449.

- Khan, S. A., K. S. Patil, and P. G. Yeole.** 2008. Intranasal mucoadhesive buspirone formulation: in vitro characterization and nasal clearance studies. *Pharmazie* **63**:348-351.
- Kinane, D., and P. Bouchard.** 2008. Periodontal diseases and health: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol* **35**:333-337.
- Koeman, M., A. J. van der Ven, E. Hak, H. C. Joore, K. Kaasjager, A. G. de Smet, G. Ramsay, T. P. Dormans, L. P. Aarts, E. E. de Bel, W. N. Hustinx, I. van der Tweel, A. M. Hoepelman, and M. J. Bonten.** 2006. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **173**:1348-1355.
- Konkel, M. E., D. J. Mead, S. F. Hayes, and W. Cieplak, Jr.** 1992. Translocation of *Campylobacter jejuni* across human polarized epithelial cell monolayer cultures. *J Infect Dis* **166**:308-315.
- La Scola, B., and D. Raoult.** 1999. Third human isolate of a *Desulfovibrio* sp. identical to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* **37**:3076-3077.
- Lacroix, J. M., and C. Walker.** 1991. Characterization of a beta-lactamase found in *Eikenella corrodens*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**:886-891.
- Lambert, C., K. A. Morehouse, C. Y. Chang, and R. E. Sockett.** 2006. *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Curr Opin Microbiol* **9**:639-644.
- Lamont, R. J., A. Chan, C. M. Belton, K. T. Izutsu, D. Vasel, and A. Weinberg.** 1995. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* **63**:3878-3885.
- Lamont, R. J., and H. F. Jenkinson.** 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **15**:341-349.
- Lamont, R. J., D. Oda, R. E. Persson, and G. R. Persson.** 1992. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol Immunol* **7**:364-367.
- Langendijk, P. S., J. Hagemann, and J. S. van der Hoeven.** 1999. Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites. *J Clin Periodontol* **26**:596-599.
- Langendijk, P. S., J. T. Hanssen, and J. S. Van der Hoeven.** 2000. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* **27**:943-950.
- Langendijk, P. S., E. M. Kulik, H. Sandmeier, J. Meyer, and J. S. van der Hoeven.** 2001. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**:1035-1044.
- Langendijk-Genevaux, P. S., W. D. Grimm, and J. S. van der Hoeven.** 2001. Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* **28**:1151-1157.
- Langendijk-Genevaux, P. S., J. T. Hanssen, and J. S. van der Hoeven.** 2001. Decrease of sulfate-reducing bacteria after initial periodontal treatment. *J Dent Res* **80**:1637-1642.

- Lawson, G. H., A. C. Rowland, and N. MacIntyre.** 1985. Demonstration of a new intracellular antigen in porcine intestinal adenomatosis and hamster proliferative ileitis. *Vet Microbiol* **10**:303-313.
- Leeson, R. M., S. Harrison, C. C. Ernst, D. A. Hamilton, F. H. Mermelstein, D. G. Gawarecki, M. Moshman, and D. B. Carr.** 2007. Dyloject, a novel injectable diclofenac formulation, offers greater safety and efficacy than voltarol for postoperative dental pain. *Reg Anesth Pain Med* **32**:303-310.
- Li, L., R. Michel, J. Cohen, A. Decarlo, and E. Kozarov.** 2008. Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol* **8**:26.
- Li, Y. H., N. Tang, M. B. Aspiras, P. C. Lau, J. H. Lee, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch.** 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **184**:2699-2708.
- Lina, B. A., and A. Bar.** 2004. Subchronic oral toxicity studies with alpha-cyclodextrin in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **39 Suppl 1**:S14-26.
- Lobo, S. A., A. M. Melo, J. N. Carita, M. Teixeira, and L. M. Saraiva.** 2007. The anaerobe *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 grows at nearly atmospheric oxygen levels. *FEBS Lett* **581**:433-436.
- Loftsson, T., and M. E. Brewster.** 1996. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* **85**:1017-1025.
- Loftsson, T., and D. Duchene.** 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int J Pharm* **329**:1-11.
- Lopez, A., M. Prior, S. Yong, M. Albassam, and L. E. Lillie.** 1987. Biochemical and cytologic alterations in the respiratory tract of rats exposed for 4 hours to hydrogen sulfide. *Fundam Appl Toxicol* **9**:753-762.
- Lopez-Jimenes, G., Leborgne, S., Loera, O., Ramirez, F., Monroy, O., Fernandez, L.L.** 2001. Presented at the Conference IPEC: integrated Petroleum Environmental Consortium.
- Loubinoux, J., C. Bisson-Boutelliez, N. Miller, and A. E. Le Faou.** 2002. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* **17**:321-323.
- Loubinoux, J., J. P. Bronowicki, I. A. Pereira, J. L. Mouguel, and A. E. Faou.** 2002. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* **40**:107-112.
- Loubinoux, J., B. Jaulhac, Y. Piemont, H. Monteil, and A. E. Le Faou.** 2003. Isolation of sulfate-reducing bacteria from human thoracoabdominal pus. *J Clin Microbiol* **41**:1304-1306.
- Loubinoux, J., F. Mory, I. A. Pereira, and A. E. Le Faou.** 2000. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* **38**:931-934.

- Loubinoux, J., F. M. Valente, I. A. Pereira, A. Costa, P. A. Grimont, and A. E. Le Faou.** 2002. Reclassification of the only species of the genus *Desulfomonas*, *Desulfomonas pigra*, as *Desulfovibrio piger* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**:1305-1308.
- Lozniewski, A., R. Labia, X. Haristoy, and F. Mory.** 2001. Antimicrobial susceptibilities of clinical *Desulfovibrio* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2933-2935.
- Lozniewski, A., P. Maurer, H. Schuhmacher, J. P. Carlier, and F. Mory.** 1999. First isolation of *Desulfovibrio* species as part of a polymicrobial infection from a brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **18**:602-603.
- Madianos, P. N., P. N. Papapanou, U. Nannmark, G. Dahlen, and J. Sandros.** 1996. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun* **64**:660-664.
- Madinier, I., T. Fosse, J. Giudicelli, and R. Labia.** 2001. Cloning and biochemical characterization of a class A beta-lactamase from *Prevotella intermedia*. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2386-2389.
- Maestre, J. R., A. Bascones, P. Sanchez, P. Matesanz, L. Aguilar, M. J. Gimenez, I. Perez-Balcabao, J. J. Granizo, and J. Prieto.** 2007. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter* **20**:61-67.
- Maffeo, D., L. Leondiadis, I. M. Mavridis, and K. Yannakopoulou.** 2006. Positive effect of natural and negatively charged cyclodextrins on the stabilization of penicillins towards beta-lactamase degradation due to inclusion and external guest-host association. An NMR and MS study. *Org Biomol Chem* **4**:1297-1304.
- Marciniec, B., Plotkowiak, Z., Wachowski, I., Kozak M., Popiela, R.Z., Brezinska, M.** 2002. Analytical of beta-irradiated antibiotics in solid state. *J. Therm. Anal. Calorim* **68**:423-436.
- Mc Roberts, M.** 2002. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development., p. 280-297. *In* J. Slots (ed.), *Antimicrobial periodontal therapy*, vol. 28. Blackwell, Munksgaard.
- McCormack, P. L., and L. J. Scott.** 2008. Diclofenac sodium injection (Dyloject): in postoperative pain. *Drugs* **68**:123-130.
- McDougall, R., J. Robson, D. Paterson, and W. Tee.** 1997. Bacteremia caused by a recently described novel *Desulfovibrio* species. *J Clin Microbiol* **35**:1805-1808.
- McOrist, S., C. J. Gebhart, R. Boid, and S. M. Barns.** 1995. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the obligately intracellular bacterium of porcine proliferative enteropathy. *Int J Syst Bacteriol* **45**:820-825.
- McOrist, S., S. Jasni, R. A. Mackie, N. MacIntyre, N. Neef, and G. H. Lawson.** 1993. Reproduction of porcine proliferative enteropathy with pure cultures of ileal symbiont *intracellularis*. *Infect Immun* **61**:4286-4292.
- McOrist, S., and G. H. Lawson.** 1989. Reproduction of proliferative enteritis in gnotobiotic pigs. *Res Vet Sci* **46**:27-33.

- Meyer, D. H., J. E. Lippmann, and P. M. Fives-Taylor.** 1996. Invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a dynamic, multistep process. *Infect Immun* **64**:2988-2997.
- Meyer, D. H., K. P. Mintz, and P. M. Fives-Taylor.** 1997. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* **8**:389-409.
- Meyer, D. H., J. E. Rose, J. E. Lippmann, and P. M. Fives-Taylor.** 1999. Microtubules are associated with intracellular movement and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **67**:6518-6525.
- Meyer, D. H., P. K. Sreenivasan, and P. M. Fives-Taylor.** 1991. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **59**:2719-2726.
- Michaud, D. S., K. Joshipura, E. Giovannucci, and C. S. Fuchs.** 2007. A prospective study of periodontal disease and pancreatic cancer in US male health professionals. *J Natl Cancer Inst* **99**:171-175.
- Miyamoto, M., K. Ishihara, and K. Okuda.** 2006. The *Treponema denticola* surface protease dentilisin degrades interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* **74**:2462-2467.
- Miyazaki, H., T. Pilot, M. H. Leclercq, and D. E. Barmes.** 1991. Profiles of periodontal conditions in adolescents measured by CPITN. *Int Dent J* **41**:67-73.
- Moeder, C., O'Brian, T., Thompson, R., Bicker, G. .** 1996. Determination of stoichiometric coefficients and apparent stability constant for alpha and beta-CD complexes of terpenes using reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr A* **736**:1-9.
- Monbelli, A.** 2003. the use of antibiotics in periodontal therapy., p. 494-511. *In* J. Lindhe, Karring, T., Lang, K.P. (ed.), *Clinical periodontology and implant dentistry*, 4th ed. Blackwell, Munksgaard.
- Morin, A. S., L. Poirel, F. Mory, R. Labia, and P. Nordmann.** 2002. Biochemical-genetic analysis and distribution of DES-1, an Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3215-3222.
- Morita, M., and H. L. Wang.** 2001. Relationship of sulcular sulfide level to severity of periodontal disease and BANA test. *J Periodontol* **72**:74-78.
- Morris, J. F., and D. L. Sewell.** 1994. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. *Clin Infect Dis* **18**:450-452.
- Mosca, A., L. Miragliotta, M. A. Iodice, A. Abbinante, and G. Miragliotta.** 2007. Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents* **30**:521-524.
- Mouton C., J. C. Robert.** *Bactériologie bucco-dentaire*. 2ème ed. Paris: Masson. 1994. - 184.

- Ng, W., and J. Tonzetich.** 1984. Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. *J Dent Res* **63**:994-997.
- Nicholson, R. A., S. H. Roth, A. Zhang, J. Zheng, J. Brookes, B. Skrajny, and R. Bennington.** 1998. Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *J Toxicol Environ Health A* **54**:491-507.
- Nicolazzi, C., S. Abdou, J. Collomb, A. Marsura, and C. Finance.** 2001. Effect of the complexation with cyclodextrins on the in vitro antiviral activity of ganciclovir against human cytomegalovirus. *Bioorg Med Chem* **9**:275-282.
- Nisengard, R. J., Haake, S.K., Newman, M.G., Miyasaki, K.T.** 2006. Microbial interaction with the host in periodontal disease, p. 228-250. *In* T. Newman, Klollefeld, Carranza (ed.), *Clinical periodontology*, 10ème ed. Elsevier, St Louis.
- Numanoglu, U., T. Sen, N. Tarimci, M. Kartal, O. M. Koo, and H. Onyuksel.** 2007. Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: linalool and benzyl acetate. *AAPS PharmSciTech* **8**:E85.
- Nyfors, S., E. Kononen, R. Syrjanen, E. Komulainen, and H. Jousimies-Somer.** 2003. Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother* **51**:107-112.
- O'Brien-Simpson, N. M., R. D. Pathirana, G. D. Walker, and E. C. Reynolds.** 2009. *Porphyromonas gingivalis* RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes penetrate gingival tissue and induce proinflammatory cytokines or apoptosis in a concentration-dependent manner. *Infect Immun* **77**:1246-1261.
- Oda, Y., N. Kobayashi, T. Yamanoi, K. Katsuraya, K. Takahashi, and K. Hattori.** 2008. Beta-cyclodextrin conjugates with glucose moieties designed as drug carriers: their syntheses, evaluations using concanavalin A and doxorubicin, and structural analyses by NMR spectroscopy. *Med Chem* **4**:244-255.
- Oelschlaeger, T. A., P. Guerry, and D. J. Kopecko.** 1993. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:6884-6888.
- Pages, J. M., J. P. Lavigne, V. Leflon-Guibout, E. Marcon, F. Bert, L. Noussair, and M. H. Nicolas-Chanoine.** 2009. Efflux pump, the masked side of beta-lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One* **4**:e4817.
- Pajatsch, M., C. Andersen, A. Mathes, A. Bock, R. Benz, and H. Engelhardt.** 1999. Properties of a cyclodextrin-specific, unusual porin from *Klebsiella oxytoca*. *J Biol Chem* **274**:25159-25166.
- Papapanou, P. N.** 1999. Epidemiology of periodontal diseases: an update. *J Int Acad Periodontol* **1**:110-116.
- Persson, G. R., and R. E. Persson.** 2008. Cardiovascular disease and periodontitis: an update on the associations and risk. *J Clin Periodontol* **35**:362-379.

- Persson, S.** 1992. Hydrogen sulfide and methyl mercaptan in periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* **7**:378-379.
- Persson, S., M. B. Edlund, R. Claesson, and J. Carlsson.** 1990. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* **5**:195-201.
- Pilot, T., and H. Miyazaki.** 1991. Periodontal conditions in Europe. *J Clin Periodontol* **18**:353-357.
- Pilot, T., H. Miyazaki, M. H. Leclercq, and D. E. Barmes.** 1992. Profiles of periodontal conditions in older age cohorts, measured by CPITN. *Int Dent J* **42**:23-30.
- Pimentel, J. D., and R. C. Chan.** 2007. *Desulfovibrio fairfieldensis* bacteremia associated with choledocholithiasis and endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *J Clin Microbiol* **45**:2747-2750.
- Pitcher, M. C., E. R. Beatty, and J. H. Cummings.** 2000. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* **46**:64-72.
- Pitha, J., Milecki, J., Fales, H., Pannell, L., Uekama, K.** 1986. Hydroxylpropyl-beta-cyclodextrin: preparation and characterisation: effects on solubility of drugs. *Int J. Pharm* **29**:73-82.
- Porschen, R. K., and P. Chan.** 1977. Anaerobic vibrio-like organisms cultured from blood: *Desulfovibrio desulfuricans* and *Succinivibrio* species. *J Clin Microbiol* **5**:444-447.
- Qi, Z. H., Mak, V., Diaz, L., Grant, D.M., Chang, C.J.** 1991. Molecular recognition: alpha-cyclodextrin and penicillin V inclusion complexation. *J Am Chem Soc* **56**:1537-1542.
- Rizzo, A., R. Paolillo, E. Buommino, A. G. Lanza, L. Guida, M. Annunziata, and C. R. Carratelli.** 2008. Modulation of cytokine and beta-defensin 2 expressions in human gingival fibroblasts infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Int Immunopharmacol* **8**:1239-1247.
- Roberts, M. C.** 1998. Antibiotic resistance in oral/respiratory bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**:522-540.
- Roberts, M. C.** 1989. Plasmids of *Neisseria gonorrhoeae* and other *Neisseria* species. *Clin Microbiol Rev* **2 Suppl**:S18-23.
- Rotger, R., E. Garcia-Valdes, and E. P. Trallero.** 1986. Characterization of a beta-lactamase-specifying plasmid isolated from *Eikenella corrodens* and its relationship to a commensal *Neisseria* plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **30**:508-509.
- Rowan, F. E., N. G. Docherty, J. C. Coffey, and P. R. O'Connell.** 2009. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg* **96**:151-158.
- Rozou, S., S. Michaleas, and E. Antoniadou-Vyza.** 2005. Study of structural features and thermodynamic parameters, determining the chromatographic behaviour of drug-cyclodextrin complexes. *J Chromatogr A* **1087**:86-94.

- Rudney, J. D., R. Chen, and G. J. Sedgewick.** 2005. Actinobacillus actinomycetemcomitans, Porphyromonas gingivalis, and Tannerella forsythensis are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res* **84**:59-63.
- Saglie, F. R., A. Marfany, and P. Camargo.** 1988. Intra- gingival occurrence of Actinobacillus actinomycetemcomitans and Bacteroides gingivalis in active destructive periodontal lesions. *J Periodontol* **59**:259-265.
- Saito, A., S. Inagaki, R. Kimizuka, K. Okuda, Y. Hosaka, T. Nakagawa, and K. Ishihara.** 2008. Fusobacterium nucleatum enhances invasion of human gingival epithelial and aortic endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**:349-355.
- Salvi, G. E., B. Carollo-Bittel, and N. P. Lang.** 2008. Effects of diabetes mellitus on periodontal and peri-implant conditions: update on associations and risks. *J Clin Periodontol* **35**:398-409.
- Sandros, J., P. N. Papapanou, U. Nannmark, and G. Dahlen.** 1994. Porphyromonas gingivalis invades human pocket epithelium in vitro. *J Periodontal Res* **29**:62-69.
- Scaglione, F., G. Demartini, S. Dugnani, and F. Fraschini.** 1993. A new model examining intracellular and extracellular activity of amoxicillin, azithromycin, and clarithromycin in infected cells. *Chemotherapy* **39**:416-423.
- Scalia, S., R. Tursilli, and V. Iannuccelli.** 2007. Complexation of the sunscreen agent, 4-methylbenzylidene camphor with cyclodextrins: effect on photostability and human stratum corneum penetration. *J Pharm Biomed Anal* **44**:29-34.
- Schmid, G.** 1989. Cyclodextrin glycosyltransferase production: yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol* **7**:244-248.
- Schoeb, T. R., and J. G. Fox.** 1990. Enterococcolitis associated with intraepithelial Campylobacter-like bacteria in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Pathol* **27**:73-80.
- Sefer, M., and I. Calinescu.** 1969. [Sulfate-reducing bacteria (genus Desulfovibrio) isolated from dental caries in humans]. *Microbiol Parazitol Epidemiol (Bucur)* **14**:231-235.
- Sela, M. N.** 2001. Role of Treponema denticola in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* **12**:399-413.
- Seymour, R. A., and P. A. Heasman.** 1995. Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. *J Dent* **23**:5-14.
- Sjogren, P., E. Nilsson, M. Forsell, O. Johansson, and J. Hoogstraate.** 2008. A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* **56**:2124-2130.
- Slots, J., and M. Ting.** 2002. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000* **28**:106-176.

Socransky, S. S., Haffajee, A.P. 2003. Microbiology of the periodontal disease, p. 106-149. *In* J. Lindhe (ed.), *Clinical periodontology and implant dentistry*, 4th edition ed. Blackwell, Munksgaard.

Socransky, S. S., and A. D. Haffajee. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol* **63**:322-331.

Sreenivasan, P. K., D. H. Meyer, and P. M. Fives-Taylor. 1993. Requirements for invasion of epithelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **61**:1239-1245.

Steele, C., and P. L. Fidel, Jr. 2002. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* **70**:577-583.

Stella, V. J., and Q. He. 2008. Cyclodextrins. *Toxicol Pathol* **36**:30-42.

Stevens, D. A. 1999. Itraconazole in cyclodextrin solution. *Pharmacotherapy* **19**:603-611.

Stoltenberg, J. L., J. B. Osborn, B. L. Pihlstrom, N. A. Hardie, D. M. Aeppli, B. A. Huso, M. B. Bakdash, and G. E. Fischer. 1993. Prevalence of periodontal disease in a health maintenance organization and comparisons to the national survey of oral health. *J Periodontol* **64**:853-858.

Stolzenberg-Solomon, R. Z., K. W. Dodd, M. J. Blaser, J. Virtamo, P. R. Taylor, and D. Albanes. 2003. Tooth loss, pancreatic cancer, and *Helicobacter pylori*. *Am J Clin Nutr* **78**:176-181.

Szejtli, J., and L. Szente. 2005. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur J Pharm Biopharm* **61**:115-125.

Szejtli, J. 2004. Cyclodextrins, p. 440. *In* T. Piotr (ed.), *Chemical and functional properties of food saccharides*. CRC Press LLC, Florida.

Szejtli, J. *In* physical properties and applications. Atwood, J. L., Davies J. E. D.; Mac Nicol. D.D (eds), *inclusion Compounds*, vol. 3. Academic Press : London, 1984 ; p 331.

Tardieux, I., P. Webster, J. Ravesloot, W. Boron, J. A. Lunn, J. E. Heuser, and N. W. Andrews. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* **71**:1117-1130.

Tee, W., M. Dyall-Smith, W. Woods, and D. Eisen. 1996. Probable new species of *Desulfovibrio* isolated from a pyogenic liver abscess. *J Clin Microbiol* **34**:1760-1764.

Terpenning, M. S., G. W. Taylor, D. E. Lopatin, C. K. Kerr, B. L. Dominguez, and W. J. Loesche. 2001. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* **49**:557-563.

Thériaque 2009, posting date. Banque de donnée du médicament [www.theriaque.org].

Tissot, S., Pichard, A. 2000, posting date. Seuils de toxicité aiguë de l'hydrogène sulfuré [www.ineris.fr].

- Torresyap, G., A. D. Haffajee, N. G. Uzel, and S. S. Socransky.** 2003. Relationship between periodontal pocket sulfide levels and subgingival species. *J Clin Periodontol* **30**:1003-1010.
- Tuner, K., L. Lindqvist, and C. E. Nord.** 1985. Purification and properties of a novel beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob Agents Chemother* **27**:943-947.
- Uekama, K.** 2004. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **52**:900-915.
- Uekama, K., Hirayama, F., Nasu, S., Matsuo, N., Irie, T.** 1978. Determination of the stability constant for inclusion complexes of cyclodextrins with the various drug molecules by high performance liquid chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **26**:3477-3484.
- Ulloth, J. E., F. G. Almaguel, A. Padilla, L. Bu, J. W. Liu, and M. De Leon.** 2007. Characterization of methyl-beta-cyclodextrin toxicity in NGF-differentiated PC12 cell death. *Neurotoxicology* **28**:613-621.
- Valle, G., L. M. Quiros, M. T. Andres, and J. F. Fierro.** 1998. A beta-lactamase belonging to group 2e from oral clinical isolates of *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol Lett* **158**:191-194.
- van der Hoeven, J. S., C. W. van den Kieboom, and M. J. Schaeken.** 1995. Sulfate-reducing bacteria in the periodontal pocket. *Oral Microbiol Immunol* **10**:288-290.
- Van Steenberg, T. J. M., Van der Mispel, L.M.S., De Graaf, J.** 1983. Effects of ammonia and volatils fatty acids produced by oral bacteria on tissue culture cells. *J. Dent. Res.* **65**:909-912.
- Venketaraman, V., A. K. Lin, A. Le, S. C. Kachlany, N. D. Connell, and J. B. Kaplan.** 2008. Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. *Microb Pathog* **45**:173-180.
- Vianna, M. E., S. Holtgraewe, I. Seyfarth, G. Conrads, and H. P. Horz.** 2008. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J Bacteriol* **190**:3779-3785.
- Vidal (ed.).** 2009. 85ème édition, ed., Issy-les Moulineaux.
- Villiers, A.** 1891. Chimie organique: sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique. *C.R. Acad. Sci.* **112**:536.
- Voha, C., J. D. Docquier, G. M. Rossolini, and T. Fosse.** 2006. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:2673-2679.
- von Mach, M. A., J. Burhenne, and L. S. Weilemann.** 2006. Accumulation of the solvent vehicle sulphobutylether beta cyclodextrin sodium in critically ill patients treated with intravenous voriconazole under renal replacement therapy. *BMC Clin Pharmacol* **6**:6.

- Waalkens-Berendsen, D. H., and A. Bar.** 2004. Embryotoxicity and teratogenicity study with alpha-cyclodextrin in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **39 Suppl 1**:S34-39.
- Walker, C. B., K. Z. Tyler, S. B. Low, and C. J. King.** 1987. Penicillin-degrading enzymes in sites associated with adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **2**:129-131.
- Wan, J., S. Yuan, J. Chen, T. Li, L. Lin, and X. Lu.** 2009. Solubility-enhanced electrokinetic movement of hexachlorobenzene in sediments: a comparison of cosolvent and cyclodextrin. *J Hazard Mater* **166**:221-226.
- Weglarz, L., Z. Dzierzewicz, A. Orchel, J. Szczerba, M. Jaworska-Kik, and T. Wilczok.** 2003. Biological activity of *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides evaluated via interleukin-8 secretion by Caco-2 cells. *Scand J Gastroenterol* **38**:73-79.
- Weglarz, L., Z. Dzierzewicz, B. Skop, A. Orchel, B. Parfiniewicz, B. Wisniowska, L. Swiatkowska, and T. Wilczok.** 2003. *Desulfovibrio desulfuricans* lipopolysaccharides induce endothelial cell IL-6 and IL-8 secretion and E-selectin and VCAM-1 expression. *Cell Mol Biol Lett* **8**:991-1003.
- Weglarz, L., J. Wawszczyk, A. Orchel, M. Jaworska-Kik, and Z. Dzierzewicz.** 2007. Phytic acid modulates in vitro IL-8 and IL-6 release from colonic epithelial cells stimulated with LPS and IL-1beta. *Dig Dis Sci* **52**:93-102.
- Weinberg, A., C. M. Belton, Y. Park, and R. J. Lamont.** 1997. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* **65**:313-316.
- Willis, C. L., J. H. Cummings, G. Neale, and G. R. Gibson.** 1997. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr Microbiol* **35**:294-298.
- Wimmer, G., and B. L. Pihlstrom.** 2008. A critical assessment of adverse pregnancy outcome and periodontal disease. *J Clin Periodontol* **35**:380-397.
- Wu, C., H. Qi, W. Chen, C. Huang, C. Su, W. Li, and S. Hou.** 2007. Preparation and evaluation of a Carbopol/HPMC-based in situ gelling ophthalmic system for puerarin. *Yakugaku Zasshi* **127**:183-191.
- Yang, J., C. J. Wiley, D. A. Godwin, and L. A. Felton.** 2008. Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on transdermal penetration and photostability of avobenzone. *Eur J Pharm Biopharm* **69**:605-612.
- Yilmaz, O., P. Verbeke, R. J. Lamont, and D. M. Ojcius.** 2006. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun* **74**:703-710.
- Yilmaz, O., K. Watanabe, and R. J. Lamont.** 2002. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol* **4**:305-314.
- Yilmaz, O., P. A. Young, R. J. Lamont, and G. E. Kenny.** 2003. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiology* **149**:2417-2426.

Yip, K. H., M. H. Zheng, H. T. Feng, J. H. Steer, D. A. Joyce, and J. Xu. 2004. Sesquiterpene lactone parthenolide blocks lipopolysaccharide-induced osteolysis through the suppression of NF-kappaB activity. *J Bone Miner Res* **19**:1905-1916.

Yoshida, S., and C. Sasakawa. 2003. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol* **11**:139-143.

Yuan, L., P. H. Rodrigues, M. Belanger, W. Dunn, Jr., and A. Progulske-Fox. 2007. The *Porphyromonas gingivalis* clpB gene is involved in cellular invasion in vitro and virulence in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol* **51**:388-398.

Zhang, G., R. Chen, and J. D. Rudney. 2008. *Streptococcus cristatus* attenuates *Fusobacterium nucleatum*-induced interleukin-8 expression in oral epithelial cells. *J Periodontal Res* **43**:408-416.

PUBLICATION

***Desulfovibrio* spp. survive within KB cells and modulate inflammatory responses.**

Catherine Bisson-Boutelliez,^{1,2} Frédéric Massin,³ Dominique Dumas,⁴ Neal Miller,² and Alain Lozniewski^{1*}

Laboratoire de Bactériologie-UMR CNRS 7565,¹ Laboratoire d'Immunologie,³ and UMR CNRS 7563,⁴ Faculté de Médecine, and Département de Parodontologie et d'Implantologie, Faculté d'Odontologie,² Nancy Université, Nancy, France.

Corresponding author. Mailing address : Neal Miller, Département de Parodontologie et d'Implantologie, Faculté d'Odontologie, 96 avenue de Lattres de Tassigny, 54004 Nancy Cedex, France. Phone: (33) 3 83 85 29 52. Fax: (33) 3 83 68 29 81. E-mail: neal.miller@odonto.uhp-nancy.fr

Key-words: *Desulfovibrio*, invasion, epithelial cells, cytokines

Running title: KB Cell–*Desulfovibrio* interactions

Introduction: *Desulfovibrio* are sulfate-reducing anaerobic Gram-negative rods that have been proposed as potential periodontopathogens. We investigated the capacity of *Desulfovibrio* to invade epithelial cells and induce cytokine secretion from these cells.

Methods: *Desulfovibrio* strains were co-cultured with KB cells. The count of intracellular bacteria was evaluated up to 3 days after infection. Cytoskeletal inhibitors were used. Contaminated cells were observed with transmission electronic and confocal microscopy.

In addition, the concentrations of cytokines interleukin -1 β (IL-1 β), IL-6 and IL-8 were measured.

Results: *D. desulfuricans* and *D. fairfieldensis* were able to survive within epithelial cells.

Intracytoplasmic location of both bacteria was confirmed by confocal laser scanning and transmission microscopy. Invasion was sensitive to nocodazole, an inhibitor of microtubule polymerization, but not to cytochalasin D, a microfilament inhibitor, suggesting that microtubule rearrangements are involved in the internalization of *Desulfovibrio* strains in KB cells. Infection by *Desulfovibrio* resulted in an increase of the production of IL-6 and IL-8 by KB cells.

Conclusion: The ability of *D. desulfuricans* and *D. fairfieldensis* to survive within oral epithelial cells and to modulate the epithelial immune response may contribute to the initiation and progression of periodontal diseases.

Periodontitis is a multifactorial disease involving complex interactions between various anaerobic bacteria and host cells, which may lead to periodontal tissue destruction. Epithelial cell invasion has been suggested to play an important role in the pathogenesis of periodontitis (6, 16, 18). Cell invasion may allow periodontopathogens to persist within oral epithelial cells, to evade the immune system and possibly to disseminate through underlying tissues (1). So far, invasion potential has been shown in vitro and/or in vivo for several bacteria associated with periodontal diseases, including *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, “*Tannerella forsythia*”, and *Treponema denticola* (6-8, 29, 12). While the interaction of all these pathogens with epithelial cells may contribute to the release of inflammatory mediators, it has been shown that the expression of various cytokines, including IL-1 β , IL-6 and IL-8, by epithelial cells infected with *P. gingivalis* may be positively correlated with its invasive capacity (9). Thus, epithelial invasion may also have a direct impact on disease progression and the inflammatory processes.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) are a diverse group of organisms that are found in the environment but may also colonize the digestive tract of animals and humans (10, 42, 38, 4). These organisms have been reported to be causes of human infections including bacteremia and brain and liver abscesses, and may play a role in inflammatory bowel diseases (32, 36). Recent findings suggest that SRB may also be involved in periodontitis (21-24, 4, 35). Different isolates of SRB have been isolated from the oral cavity, generally belonging to the genus *Desulfovibrio* (20, 24, 4). So far, *Desulfovibrio fairfieldensis* and, to a lesser extent, *Desulfovibrio desulfuricans*, are the two *Desulfovibrio* species that have been isolated from the oral cavity (24, 2). However, their role in the pathogenesis of periodontitis remains unclear. In order to further investigate the potential pathogenic role of *D. fairfieldensis* and *D. desulfuricans*, we studied their potential ability to invade non

professional phagocytic cells and their capacity to induce inflammatory response from these cells.

Material and methods

Bacteria strains and tissue culture conditions

Strains used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA): *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577, *D. desulfuricans* ATCC 27774, *Desulfovibrio fairfieldensis* ATCC 700045, and *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. All strains were stored at -80°C in Brucella broth containing 15% glycerol (w/v). Prior to testing, bacteria were grown anaerobically at 37°C on Brucella agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, during 24h for *P. gingivalis* ATCC 33277 and 72h for *Desulfovibrio* strains.

The KB cell line ATCC CCL-17 was routinely cultured in flasks under a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C in RPMI-1640 medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% L-glutamine (Gibco), 16 µg/ml amikacin and 128 µg/ml amoxicillin.

Invasion assay

Invasion of epithelial cells was determined using an antibiotic protection and invasion assay as previously described by Han et al. (12). For each strain, plate cultures were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in unsupplemented cell culture medium at a concentration of 5×10^7 cells per ml determined by optical density. Bacterial suspensions (1 ml) were added to confluent KB monolayers (multiplicity of infection, MOI: 100 bacteria per cell) in 24-well plates. After 2 h of incubation at 37°C, unattached bacteria were removed by three washes with unsupplemented RPMI medium. External adherent cells were killed by incubating the infected monolayers with fresh medium containing metronidazole (200 µg/ml) and gentamicin (300 µg/ml) for 1 h. The cell culture

medium was removed and cells were washed three times with PBS. Intracellular bacteria were then released by lysis of the cells in sterile distilled water for 20 min. To assess intracellular persistence and multiplication of *Desulfovibrio*, monolayers infected by *Desulfovibrio fairfieldensis* ATCC 700045 and *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 29577 were further incubated in antibiotic- and FCS-free medium for 24, 48 and 72 h. Prior to cell lysis, 0.1 ml aliquots of the supernatant were sampled and examined for the presence of extracellular bacteria. Serial dilutions of the lysates were performed in sterile 0.9% NaCl, and 0.1-ml aliquots of the dilutions were plated onto Brucella agar. Bacterial counts were expressed as CFU per well.

Inhibitor assays of internalization

Inhibitor assays were performed using cytochalasin D (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), an actin microfilament polymerization inhibitor, and nocodazole (Sigma), a microtubule polymerization inhibitor. Stock solutions of inhibitors were prepared in DMSO and frozen at -20°C prior to assays. These solutions were diluted in unsupplemented RPMI to obtain final assay concentrations of $1\mu\text{g/ml}$ of nocodazole and $10\mu\text{g/ml}$ of cytochalasin D. The KB cells were incubated with cytochalasin D for 30 min prior to bacterial contamination. Nocodazole was added to the monolayers for 1 h on ice, and then warmed to 37°C for 30 minutes prior to the addition of bacteria. Each inhibitor was present during the assay. The invasion assay was conducted as previously described. For each *Desulfovibrio* strain tested, intracellular viable counts were determined at 2 h postinfection. At the concentrations used, inhibitors affected neither the viability of epithelial cells as determined by examining the confluency of the monolayers and by trypan blue exclusion, nor the viability of bacterial strains as assessed by viable cell counting.

Electron microscopy

For each *Desulfovibrio* strain tested, ultrastructural studies of KB cells were performed at 2 h postinfection using transmission electron microscopy (TEM). Infected cell monolayers were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.4). Following rinses with cacodylate buffer, the samples were postfixed for 1 h in 0.1 M cacodylate buffer containing 1% (wt/vol) osmium tetroxide. The monolayers were dehydrated using increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, 80 and 90% [5 min for each step], 100% [20 min, three times]), and three changes of propylene oxide (20 min for each step). The samples were placed in a propylene oxide-epoxy resin (Epikote 812; Consortium International Pharmaceutique et Chimique, Paris, France) (vol/vol) mixture for 1 h at room temperature before being placed in 100% epoxy resin overnight as described by Luft et al (25). Then, they were embedded in fresh epoxy resin for 3 days at 56°C. Ultra thin sections were cut on a Reichert OMU₃ ultramicrotome using a diamond knife, collected on copper grids, and stained with uranium acetate and Reynold's lead citrate. Sections were observed using a Philips CM12 transmission electron microscope at 80 kV.

Generation of antibodies

D. fairfieldensis ATCC 700045 was cultured as previously described on supplemented Brucella blood agar for 72 h. Bacterial cells were washed three times with PBS, resuspended in sterile 0.9% NaCl at a final concentration of 10⁸ cells per ml and finally inactivated using UV light. Inactivated bacteria were sent to Covalab Laboratory (Lyon, France) for the generation of polyclonal antibodies in rabbits. Specificity of the immune serum was evaluated by indirect immunofluorescence on *D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. desulfuricans* ATCC 29577, *P. gingivalis* ATCC 33277, *Fusobacterium nucleatum* Roger, and *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and *P. buccae* ATCC 33574. Briefly, a 50- μ l sample of cell suspension of each strain was spotted onto a slide for immunofluorescence tests, air dried, and fixed in cold ethanol. Smears were incubated with antiserum used at dilutions of 1:100, 1:200

or 1:500 for 30 min at 37°C in a moist chamber. After three washes in PBS, fluorescein-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (Ig) G antibody (Sigma) was added and incubated for another 30 min. After being washed with PBS, slides were examined with an Olympus fluorescence microscope at a magnification $\times 400$. Specific reactivity was observed up to a dilution of 1:500 for both *Desulfovibrio* strains. No cross-reactivity was found with any of the other strains tested.

Confocal scanning laser microscopy

KB cells were seeded in eight-well Labteck II chambers (Nunc, Dutscher, France) at a concentration of 5×10^4 cells per well and incubated for 48 h. Before contamination, KB cells were stained with 2 μ M 1',3',3'',3'''-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiIC₁₆) (Molecular Probe) in RPMI for 2 min. DiIC₁₆ is a lipophilic carbocyanine membrane probe suitable for labelling cell surface membranes as well as intracytoplasmic membranes (31). Invasion assays were performed with *D. fairfieldensis* ATCC 700045 and *D. desulfuricans* ATCC 29577 as described above. At 2 h postinfection, cells were washed three times with unsupplemented RPMI medium and fixed in 2% paraformaldehyde at 4°C for 15 min. After three washes with PBS, cell monolayers were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min. Cells were washed twice and incubated in PBS containing 5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) for 20 min at room temperature (17). After removing the supernatant, cells were incubated overnight with rabbit anti-*Desulfovibrio* serum diluted at 1:200. Cells were then incubated with an isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100) (Sigma) for 45 minutes followed by Alexa Fluor 488 anti-fluorescein conjugated rabbit polyclonal IgG (1:100) (Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 45 minutes. Samples were observed with a confocal laser scanning microscope SP2-AOBS (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), constituted by an inverted epifluorescence microscope equipped with an argon laser source at 488 nm and an helium/neon laser at 543 nm. The

intensity of the fluorescence signal was measured between 500-520 nm for Alexa 488 (coded in green) and between 520-580 nm for DiI (coded in red) with a 63× objective (water immersion/1.32 NA). For each frame, the collection of fluorescence signal was adjusted spectrally to avoid the overlapping of the two emission dyes with a sequential mode. Different controls were achieved to eliminate non specific detections. Uninfected cells with antibodies (Ab) I, II and III, and infected cells with Ab II, III were used as negative control to determine the threshold value of positive detection. Images were achieved with a z step of 0.2µm with a format of 512 × 512 pixels, 400 Hz, and analyzed with a Leica software LCS. Images were pseudocolored according to their respective emission and overloaded with Leica/ Metamorph software.

Cytokine induction assay

Culture media from 24 h, 48 h, and 72 h infected or uninfected KB cells were collected at the end of the experiments and stored at -20°C until being assayed using enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IL-1β, IL-8 (RayBio, Norcross, GA), and IL-6 (Bender Medsystems, Vienna, Austria) responses. Samples were processed according to the manufacturer's instructions. Plates were read at 450 nm by using a microplate reader (Sunrise, Tecan, Lyon, France). The detection levels were 3, 8, and 0.98 pg/ mL for IL-1β, IL-8, and IL-6, respectively. Cytokine concentrations were determined in triplicate by comparison with a standard curve prepared for each kit. Data were presented as means ± standard deviations (SDs). Cytokine levels were compared using the unpaired Student *t* test (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA). Significances were defined as having *P* value of <0.05.

Results

Entry and survival of *Desulfovibrio* in KB cells

Two hours after infection, all three *Desulfovibrio* strains tested exhibited similar invasion efficiencies as assessed by the antibiotic protection assay (Table 1). However, the invasion efficiency of these strains (0.05 to 0.13% of the initial inoculum) was lower than those observed with *P. gingivalis* ATCC 33277 (0.69% of the initial inoculum) which was used as positive control (14). For *D. fairfieldensis* ATCC 700045, the mean number of internalized viable bacteria was 3.5 times higher ($P < 0.01$) at 24 h postinfection than at 2 h postinfection, suggesting intracellular replication (Fig. 1). Thereafter, the viable intracellular counts gradually decreased ($P < 0.01$) down to about 57% of the initial intracellular count at 72 h postinfection. Similar results were found, as expected (14), for *P. gingivalis* ATCC 33277. For *D. desulfuricans* ATCC 29577, a statistically significant twofold increase ($P < 0.01$) of the mean number of viable intracellular bacteria occurred at 48 h. Thereafter, the intracellular counts decreased but remained slightly higher than those found at 2 h postinfection. The numbers provide evidence of an intracellular replication for *D. fairfieldensis* ATCC 700045 and a similar pattern is apparent for *D. desulfuricans* ATCC 29577 although the bacterial proliferation starts somewhat later. At no time point, did the supernatant counts exceed 7% of the intracellular recovered bacteria.

Tubulin-dependent KB cells invasion by *Desulfovibrio* strains

Entry of bacteria into host cells requires microtubule and/or microfilament rearrangements (28). In order to assess whether internalization of *Desulfovibrio* strains is actin- and/or tubulin-dependent, we evaluated the effects of cytochalasin D and nocodazole pre-treatment of KB cells on the internalization of the three *Desulfovibrio* strains tested. Treatment of the KB cells with cytochalasin D resulted in an increase of internalized organisms at 2 h postinfection (Table 3). In contrast, for all three *Desulfovibrio* strains tested, the counts of

internalized viable bacteria at 2 h postinfection were lower in nocodazole pretreated KB cells than in control cells, indicating that microtubule formation was required for cell invasion.

Intracytoplasmic localization of *Desulfovibrio* in KB cells

Once inside host cells, invasive bacteria either replicate within endosomal organelles or escape from the endosomal pathway to the cytoplasm. At 2 h postinfection, TEM examination of KB cells infected with either *D. fairfieldensis* or *D. desulfuricans* showed that numerous bacteria adhered to the cell surface while all observed intracellular bacteria appeared to be free in the cytoplasm without surrounding membranes (Fig. 2). The intracytoplasmic localization of both organisms tested was further confirmed by using confocal microscopy. Indeed, while numerous immunolabelled bacteria were shown to adhere to the epithelial cell surface 2 h postinfection, a few bacteria could be visualized within the cytoplasm of KB cells (Fig. 3). Internalized bacteria could be clearly differentiated from adherent bacteria by superimposing FITC-Alexia 488 and DiI images of serial sections (0.2 μm). No colocalization of intracellular immuno-labelled bacteria with intracytoplasmic DiI-stained vesicles was observed suggesting that observed intracellular bacteria were free in the cytoplasm.

Production of cytokines by infected KB cells

The levels of IL-1 β , IL-6, and IL-8 secreted by KB cells at 2, 24, 48 and 72 h after infection by *D. desulfuricans* 29577 ATCC and *D. fairfieldensis* ATCC 700045 were also measured. KB cells secreted significantly higher amounts of IL-8 at 2 h after infection with *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (642 ± 65 pg/ml) or *D. desulfuricans* 29577 ATCC (744 ± 121 pg/ml) than uninfected KB cells (356 ± 73 pg/ml) (Fig. 4). This difference was no longer observed at 24, 48 and 72 h after infection with any of the strains tested. No IL-6 was detected in the supernatants of uninfected or infected cells at 2 h time point. KB cells constitutively

expressed low levels of IL-6 at 24 h (2 ± 0.6 pg/ml), 48 h (2.4 ± 0.9 pg/ml), and 72 h (4.48 ± 1.9 pg/ml). In contrast, the amount of IL-6 released from KB cells infected with *D. desulfuricans* ATCC 29577 was significantly increased compared to the control cells at 24 h (4.1 ± 0.4 pg/ml) and 48 h (5.7 ± 0.7 pg/ml) (Fig. 5). When compared to uninfected cells, an increase, although not statistically significant, of IL-6 production was also observed for KB cells at 24 h (4.2 ± 1.5 pg/ml) and 48 h (4.7 ± 1.2 pg/ml) ($P = 0.07$) after infection with *D. fairfieldensis* ATCC 700045. For both strains, IL-1 β concentrations in supernatants from infected KB cells were found to be similar at each time point studied to those measured in supernatants from control uninfected cells.

Discussion

In the present study, we have shown for the first time that two putative periodontopathogens, *D. fairfieldensis* and *D. desulfuricans*, have the ability to invade oral epithelial cells. The intracellular location of *D. fairfieldensis* ATCC 700045 and *D. desulfuricans* ATCC 29577 was confirmed by both electron- and confocal-microscopic examination of infected monolayers. For these strains, 0.05 to 0.13% of the total number of bacteria initially added were recovered intracellularly at 2 h post infection. For *P. gingivalis* ATCC 33277, 0.69% of the initial inoculum were recovered after lysis of the infected KB cells, which is very close to the 0.6% obtained by Houalet-Jeanne et al. (14) who examined the invasive potential of this isolate using similar experimental conditions. In our study, early internalization levels observed with *D. fairfieldensis* and *D. desulfuricans* were 5 to 15-fold lower than those observed with *P. gingivalis*. However, to exclude the possibility that invasion profiles were strain specific instead of species specific more strains need to be evaluated. Similar levels of internalization were reported by Han et al. (12) for another putative periodontopathogen, *P. intermedia*, the invasion level of which has been reported as being 1/20 of that of *P. gingivalis* 381 and *F. nucleatum* 12230. Thus, the *Desulfovibrio* spp. strains tested appeared to be

weakly invasive. However, it cannot be ruled out that other more invasive *Desulfovibrio* strains may exist or that interactions with other oral bacteria may enhance the invasion potential of *Desulfovibrio* as shown for “*T. forsythia*” interacting with *P. gingivalis* (15). Also, it must be stressed that KB cells, which are transformed cells, are less efficient than epithelial cells from primary gingival tissue cultures (3).

As previously reported by Houalet-Jeanne et al. (14), we also observed that for *P. gingivalis* ATCC 33277, the number of intracellular viable bacteria increased about 1.5-fold at 24 h postinfection in KB-infected cells. Quite similar results were also reported with another *P. gingivalis* strain (*P. gingivalis* FDC381) by Madianos et al. (26) suggesting that *P. gingivalis* has the ability to multiply within KB cells. This could be of great clinical importance since Johnson et al. (16) have demonstrated the presence of *P. gingivalis* in buccal epithelial cells and insist on the fact that non surgical periodontal treatment does not decrease the number of internalized bacteria. It suggests a mechanism by which bacteria would be protected from the host response and antimicrobial therapy, enabling them to recolonize debrided sites and perhaps contribute to the onset of refractory disease. Likewise, host cells could constitute a reservoir of *Desulfovibrio*. In the present study, the average number of intracellular viable bacteria increased during the first 24 h for *D. fairfieldensis* ATCC 700045 and during the first 48 h for *D. desulfuricans* ATCC 29577. These findings suggest that *Desulfovibrio* is able to multiply within KB cells. Preliminary experiments permitted us to ensure that the antibiotic concentrations used were effective in killing the entire bacterial inoculum within 1 h and that supernatant bacterial counts remained low ($\leq 7\%$ of the intracellular counts) during the whole study period. Therefore, the possibility of an invasion artefact is unlikely. However, the fact that some intracellular organisms may exit the initially infected cells and then enter and multiply in new cells as shown for other periodontopathogens invading oral epithelial cells such as *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* (27, 39), cannot be ruled out and needs further study.

In our study, TEM examination revealed that, at 2 h post infection, all intracellular *Desulfovibrio* organisms appeared free within the cell cytoplasm. Moreover, no colocalization of intracellular bacteria within intracytoplasmic vesicles was found by confocal microscopic observation, suggesting that *Desulfovibrio* may escape their vacuole in the early stage of invasion as described for other pathogens (14, 28).

For many bacterial pathogens, internalization in epithelial cells is dependent on rearrangements of the actin skeleton. Additionally, some pathogenic bacteria enter epithelial cells via a microtubule-dependent mechanism (40). Among periodontopathogens, *P. gingivalis* and *F. nucleatum* have been shown to enter epithelial cells via both a microtubule- and actin-dependent mechanism (19, 12). It has also been reported that a few strains of *A. actinomycetemcomitans* utilize a microtubule-dependent mode of invasion while most strains utilize an actin-dependent mode of entry into epithelial cells (27, 5). In the present study, treatment with nocodazole, a microtubule-destabilizing agent, resulted in a significant inhibition of bacterial invasion whereas internalization was enhanced in cytochalasin D pretreated cells. These data suggest that the internalization of all three *Desulfovibrio* strains tested was microtubule-dependent. It is noteworthy that the invasion of these strains was increased by cytochalasin D. Similar observations were reported for other organisms that require microtubule rearrangement for invasion and may be related to the fact that cytochalasin D enhanced lysosome movement to the cell periphery and hence invasion due to the lysosome recruitment and fusion at the plasma membrane (34).

Besides bacterial internalization, inflammation appears to be another important factor that may be involved in the progression of periodontal infections and local tissue destruction. It has been shown that the production of various cytokines, including IL-6 and IL-8, by oral epithelial cells following stimulation by periodontopathogens are early events which participate in the cascade of events leading to inflammation and tissue destruction, and hence be critical for the progression of periodontitis (11). In vitro studies have suggested that

cytokines production by epithelial cells may be triggered by their invasion by various bacterial pathogens including *P. gingivalis* (33, 9). Weglarz et al. (37) demonstrated that *D. desulfuricans* have the ability to induce the secretion of IL-6 and IL-8 from human colon cell line Caco-2. In our study, both *Desulfovibrio* strains tested stimulated the production of these cytokines by KB cells. A significant increase in IL-8 secretion by epithelial cells was observed at 2 h post-infection. This effect may be due to various mechanisms triggered both by bacterial adhesion or invasion and may play a role in the local immune response as IL-8 acts as a chemokine directing neutrophil migration to the infectious site. It can not be excluded that soluble products from *Desulfovibrio* strains directly stimulate epithelial cells and induce up-regulation of IL-8 as described for *Eikenella corrodens* (41). In contrast, increased production of IL-6, was only detected at 24 and 48 h after infection with *D. desulfuricans* ATCC 29577 and, to a lesser extent, with *D. fairfieldensis* ATCC 700045, suggesting that this epithelial response might be more predominantly associated with the presence of intracellular bacteria. IL-6 has also been identified as a periodontal disease marker and its release by host cells may participate in the inflammatory reaction as well as in tissue destruction via the activation of osteoclasts (13, 30).

In conclusion, this study provides the first evidence that *D. fairfieldensis* and *D. desulfuricans*, two putative periodontopathogens, may invade oral epithelial cells via a microtubule-dependent process. We have also shown that, once inside the cells, these bacteria have the capacity to remain viable for a prolonged period and were able to elicit a minor host cell response that may contribute to the development of periodontal disease. Further studies of these bacterium-host cell interactions are necessary to increase our insight into the role of these sulphate-reducing bacteria in periodontitis.

References

1. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration, destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2004; **72**: 4689-4698.
2. Beerens H, Tahon-Castel M. Infections humaines à bactéries anaérobies non toxigènes. Presses Académiques Européennes. Bruxelles, 1965.
3. Belton CM, Goodwin PC, Fatherazi S, Schubert MM, Lamont RJ, Izutsu KT. Calcium oscillations in gingival epithelial cells infected with *Porphyromonas gingivalis*. *Microbes Infect* 2004; **6**: 440-447.
4. Boopathy R, Robichaux M, LaFont D, Howell M. Activity of sulphate reducing bacteria in human periodontal pocket. *Can J Microbiol* 2002; **48**: 1099-1103.
5. Brissette CA, Fives-Taylor PM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol Immunol* 1999; **14**: 137-142.
6. Colombo AV, da Silva CM, Haffajee A, Colombo APV. Identification of intracellular oral species within human crevicular epithelial cells from subjects with chronic periodontitis by fluorescence *in situ* hybridization. *J Periodontal Res* 2007; **42**: 236-243.
7. Dorn BR, Leung KP, Progulsk-Fox A. Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect Immun* 1998; **66**: 6054-6057.
8. Duncan MJ, Nakao S, Skobe Z, Xie H. Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with epithelial cells. *Infect Immun* 1993; **61**: 2260-2265.
9. Eick S, Reissmann A, Rödel J, Schmidt KH, Pfister W. *Porphyromonas gingivalis* survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol* 2006; **21**: 231-237.
10. Gibson GR. Physiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. *J Appl Bacteriol* 1990; **69**: 769-797.

11. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008; **79**: 1585-1591.
12. Han YW, Shi W, Huang GTJ, Haake SK, Park NH, Kuramitsu H, Genco RJ. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* 2000; **68**: 3140-3146.
13. Herman S, Krönke G, Schett G. Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy. *Trends Mol Med* 2008; **14**: 245-253.
14. Houalet-Jeanne S, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Apiou J, Bonnaure-Mallet M. Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infect Immun* 2001; **69**: 7146-7151.
15. Inagaki S, Onishi S, Kuramitsu HK, Sharma A. *Porphyromonas gingivalis* vesicles enhance attachment, and the leucine-rich repeat BspA protein is required for invasion of epithelial cells by "*Tannerella forsythia*". *Infect Immun* 2006; **74**: 5023-5028.
16. Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2008; **79**: 2305-2312.
17. Kuehnel MP, Goethe R, Habermann A, Mueller E, Rohde M, Griffiths G, Valentin-Weigand P. Characterization of the intracellular survival of *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis: phagosomal pH and fusogenicity in J774 macrophages compared with other mycobacteria. *Cell Microbiol* 2001; **3**: 551-566.
18. Lamont RJ, Yilmaz O. In or out: the invasiveness of oral bacteria. *Periodontol 2000* 2002; **30**: 60-69.
19. Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun* 1995; **63**: 3878-3885.
20. Langendijk PS, Kulik EM, Sandmeier H, Meyer J, van der Hoeven JS. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. and *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing

- bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001: **51**: 1035-1044.
21. Langendijk-Genevaux PS, Grimm WD, van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in relation with other potential periodontal pathogens. *J Clin Periodontol* 2001: **28**: 1151-1157.
 22. Langendijk PS, Hanssen JT, Van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000: **27**: 943-950.
 23. Langendijk PS, Hagemann J, van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in health oral sites. *J Clin Periodontol* 1999: **26**: 596-599.
 24. Loubinoux J, Bisson-Boutelliez C, Miller N, Le Faou AE. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* 2002: **17**: 321-323.
 25. Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J Biophys Biochem Cytol* 1961: **9**: 409-411.
 26. Madianos PN, Papapanou PN, Nannmark U, Dahlen G, Sandros J. *Porphyromonas gingivalis* FDC381 multiplies and persists within human oral epithelial cells in vitro. *Infect Immun* 1996: **64**: 660-664.
 27. Meyer DH, Rose JE, Lippmann JE, Fives-Taylor PM. Microtubules are associated with intracellular movements and spread of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1999: **67**: 6518-6525.
 28. Meyer DH, Mintz KP, Fives-Taylor PM. Models of invasion of enteric and periodontal pathogens into epithelial cells: a comparative analysis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997: **8**: 389-409.
 29. Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM. Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* 1991: **59**: 2719-2726.

30. Moreira PR, Lima PM, Sathler KO, Imanishi SA, Costa JE, Gomes RS, Gollob KJ, Dutra WO. Interleukin-6 expression and gene polymorphism are associated with severity of periodontal disease in a sample of Brazilian individuals. *Clin Exp Immunol* 2007; **148**: 119-126.
31. Mukherjee S, Soe TT, Maxfield FR. Endocytic sorting of lipid analogues differing solely in the chemistry of their hydrophobic tails. *J Cell Biol* 1999; **144**: 1271-1284.
32. Rowan FE, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg* 2009; **2**: 151-8.
33. Sandros J, Karlsson C, Lappin DF, Madianos PN, Kinane DF, Papapanou PN. Cytokine responses of oral epithelial cells to *Porphyromonas gingivalis* infection. *J Dent Res* 2000; **79**: 1808-1814.
34. Tardieux I, Webster P, Ravestrot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 1992; **71**: 1117-1130.
35. Vianna ME, Holtgraewe S, Seyfarth I, Conrads G, Horz HP. Quantitative analysis of three hydrogenotrophic microbial groups, methanogenic archaea, sulfate-reducing bacteria, and acetogenic bacteria, within plaque biofilms associated with human periodontal disease. *J Bacteriol* 2008; **190**: 3779-3785.
36. Watanabe K, Mikamo H, Tanaka K. Clinical significance of sulfate-reducing bacteria for ulcerative colitis. *Nippon Rinsho* 2007; **65**: 1337-1346.
37. Weglarz L, Wawszczyk J, Orchel A, Jaworska-Kik M, Dzierzewicz Z. Phytic acid modulates in vitro IL-8 and IL-6 release from colonic epithelial cells stimulated with LPS and IL-1beta. *Dig Dis Sci* 2007; **52**: 93-102.
38. Willis CL, Gibson GR, Allison C, Mac-Farlane S, Holt JS. Growth, incidence and activities of dissimilatory sulfate-reducing bacteria in the human oral cavity. *FEMS Microbiol Lett* 1995; **129**: 267-272.

39. Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM. Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun* 2006; **74**: 703-710.
40. Yoshida S, Sasakawa C. Exploiting host-microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol* 2003; **11**: 139-143.
41. Yumoto H, Yamada M, Shinohara C, Nakae H, Takahashi K, Azakami H, Ebisu S, Matsuo T. Soluble products from *Eikenella corrodens* induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Oral Microbiol Immunol* 2007; **22**: 36-45.
42. Zinkevich V, Beech IB. Screening of sulphate-reducing bacteria in colonoscopy samples from healthy and colitic human gut mucosa. *FEMS Microbiol Ecol* 2000; **34**: 147-155.

Figure legends

Fig. 1. Intracellular viability of *D. desulfuricans* ATCC 29577, *D. fairfieldensis* and *P. gingivalis* ATCC 33277. Values represent the means \pm standard deviations from triplicate independent determination at 2, 24, 48 and 72h post-infection. Differences are statistically significant between connected values (* $P < 0.01$).

Fig. 2. Transmission electron micrograph of *D. desulfuricans* ATCC 29577 (arrow) inside the cytoplasm of a KB cell, at 2 hours post-infection. Bar: 1 μ m.

Fig. 3. Invasion of KB cell by *D. fairfieldensis* ATCC 700045 visualized by confocal scanning laser microscopy. A: *D. fairfieldensis* were stained green (arrow); B: Intracytoplasmic vesicles stained with DiI appeared red; C: digital overlapping of images A and B. No vesicles were colocalized with intracytoplasmic bacteria.

Fig. 4. Secretion of IL-8 by KB cells at 2 h, 24 h, 48 h and 72 h after infection with *D. desulfuricans* ATCC 29577 (Dd) and *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (Df). The bars indicate the means and the standard deviations from three independent experiments.

Statistically significant ($P < 0.01$) induction of cytokine production compared to control epithelial cells (C).

Fig. 5. Secretion of IL-6 by KB cells at 2 h, 24 h, 48 h and 72 h after infection with *D. desulfuricans* ATCC 29577 (Dd) and *D. fairfieldensis* ATCC 700045 (Df). The bars indicate the means and the standard deviations from three independent experiments. Statistically significant ($P < 0.01$) induction of cytokine production compared to control epithelial cells (C).

Table 1. Comparison of invasion of KB cells by *Desulfovibrio* spp. and *P. gingivalis*.

Strain	CFU/well recovered after antimicrobial treatment ^a
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	$(1.53 \pm 0.6) \times 10^4$
<i>D. desulfuricans</i> ATCC 29577	$(6.5 \pm 2) \times 10^4$
<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	$(3.81 \pm 0.44) \times 10^4$
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	$(3.86 \pm 0.17) \times 10^5$

^a Values represent the means \pm standard deviations from quadruplicate independent determination 2 h post-infection.

Table 2. Effects of metabolic inhibitors on invasion of KB cells by *D. Desulfovibrio* and *D. fairfieldensis*.

Strains	Percentage of invasion after treatment by ^a :	
	Nocodazole	Cytochalasine D
<i>D. fairfieldensis</i> ATCC 700045	23.3 ± 3.8	237.5 ± 39.2
<i>D. desulfuricans</i> ATCC 29774	52.6 ± 1.9	138.3 ± 11.6
<i>D. desulfuricans</i> ATCC 27774	10.7 ± 1.8	139.6 ± 11

^a The level of invasion was expressed as a percentage of the control level without any inhibitor. Values represent the means \pm standard deviations from triplicate independent determination 2 h post-infection.

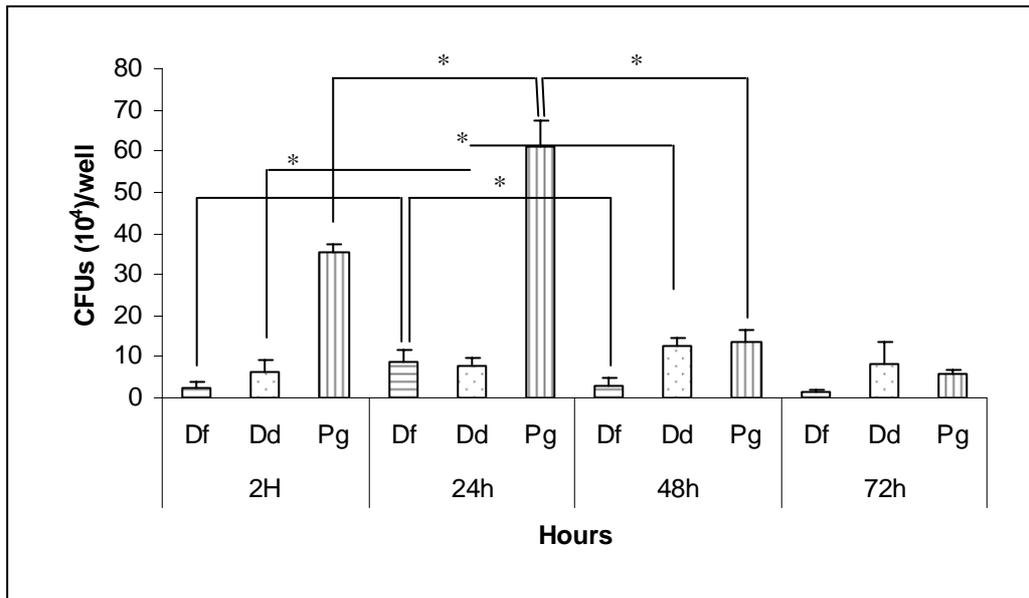


Fig 1.

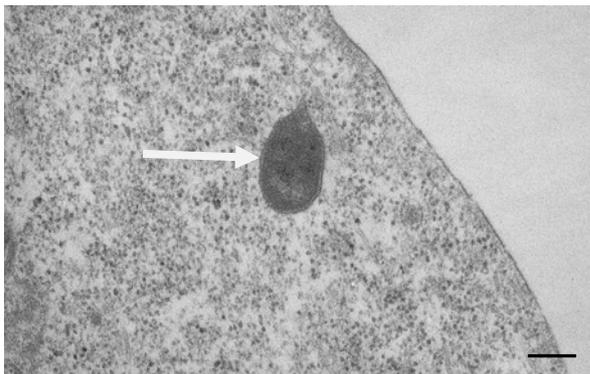


Fig. 2.

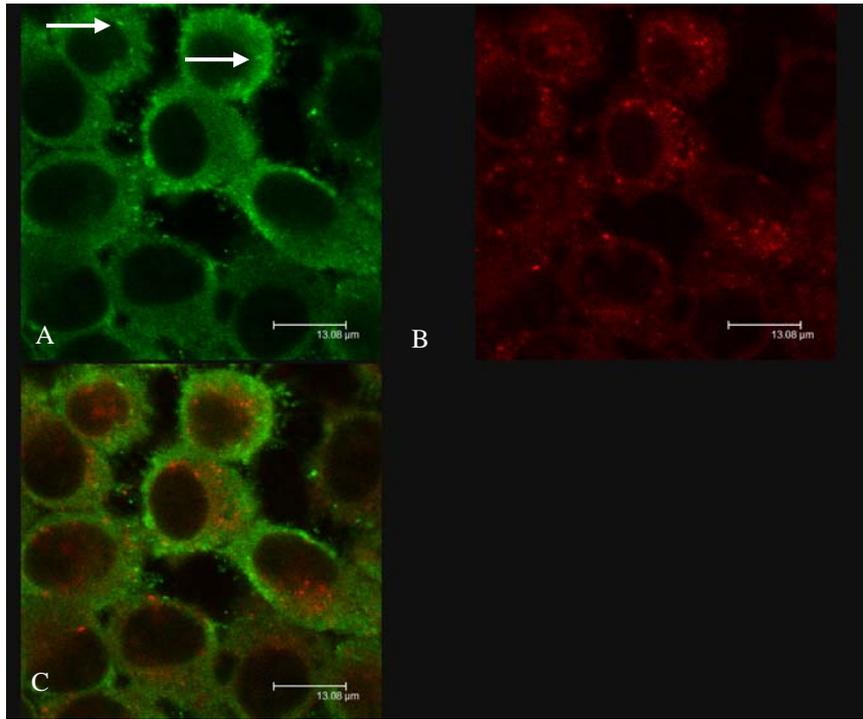


Fig. 3.

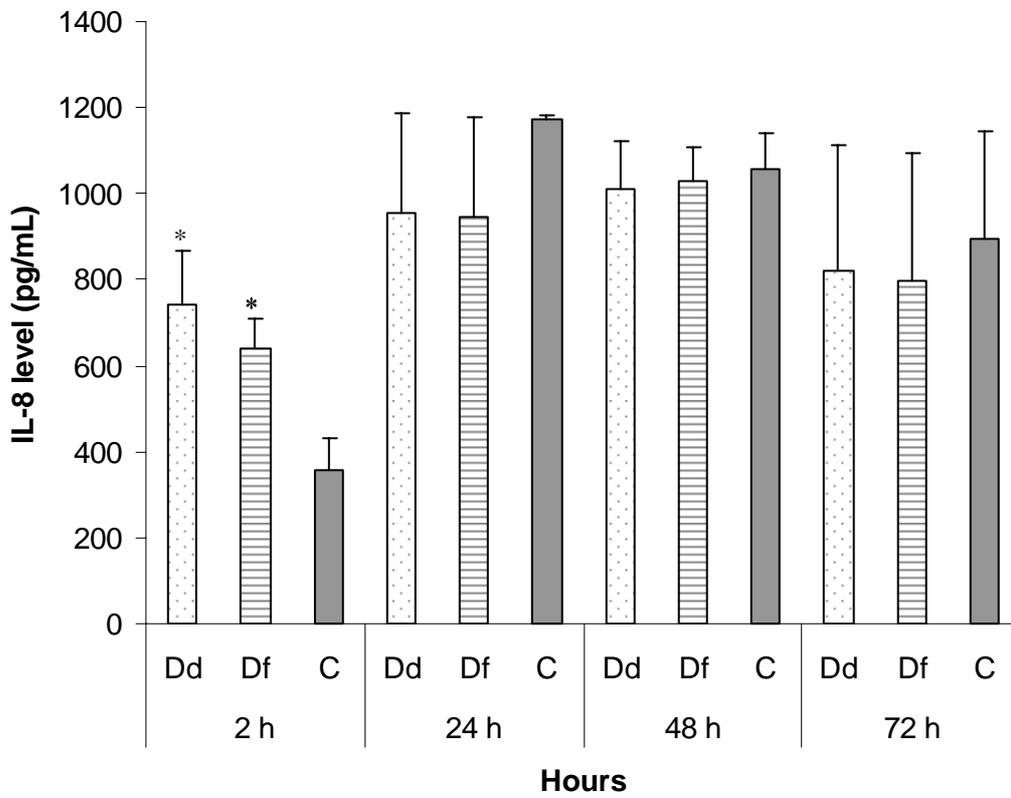


Fig. 4.

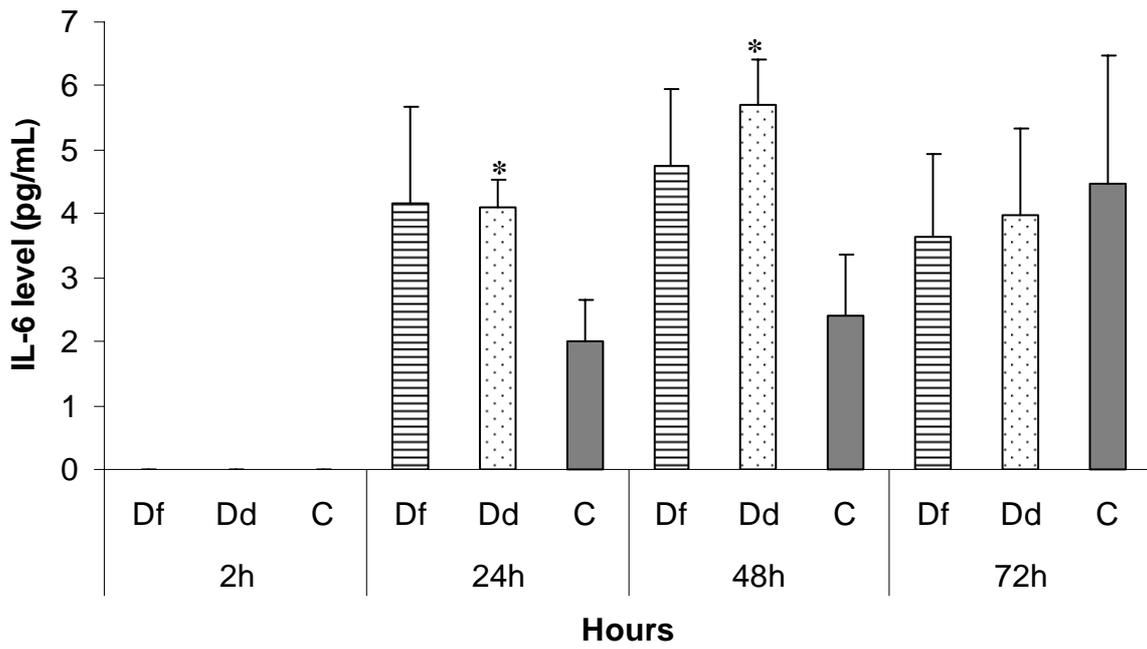


Fig. 5.

It has been suggested that *Desulfovibrio*, which are sulfate-reducing anaerobic bacteria, may be involved in periodontitis. We investigated the capacity of *Desulfovibrio* to invade epithelial cells and induce cytokine secretion from these cells. We showed that *Desulfovibrio desulfuricans* and *Desulfovibrio fairfieldensis* were able to invade and to multiply within oral epithelial cells (KB cells). Intracytoplasmic location of both bacteria was confirmed by confocal laser scanning and transmission microscopy. Invasion of these strains involved microtubule but not microfilament polymerization. Infection by *Desulfovibrio* resulted in an increase of the production of IL-6 and IL-8 by KB cells. The ability of *D. desulfuricans* and *D. fairfieldensis* to survive within oral epithelial cells and to modulate the epithelial immune response may contribute to the initiation and progression of periodontal diseases. *Desulfovibrio* as well as other periodontopathogens may produce β -lactamases and have the capacity to invade epithelial cells. It has been suggested that the hydrolysis of amoxicillin might be prevented by using an amoxicillin- β -cyclodextrin (β CD) complex and that intracellular diffusion of antimicrobial agents might be enhanced after complexation with β CDs. A stable [1:1] amoxicillin- β CD complex, characterized by spectroscopic and thermal analysis, did neither improve the activity of amoxicillin against β -lactamase producing strains nor enhance the intracellular diffusion of this compound.

Key-words: *Desulfovibrio*, invasion, KB cells, cytokine, amoxicillin, cyclodextrin

Il a été suggéré que les *Desulfovibrio*, qui sont des bactéries anaérobies sulfato-réductrices, pourraient être impliqués dans les parodontites. Nous avons évalué le pouvoir invasif de *Desulfovibrio* vis-à-vis de cellules épithéliales et leur capacité à induire la production de cytokines par ces cellules. Nous avons montré que *Desulfovibrio desulfuricans* et *Desulfovibrio fairfieldensis* sont capables d'envahir et de se multiplier dans les cellules épithéliales buccales (cellules KB). La localisation intracytoplasmique de ces deux bactéries a été confirmée par microscopie confocale et électronique à transmission. L'internalisation de ces souches était dépendante de la polymérisation des microtubules mais pas de celle de l'actine. L'infection avec *Desulfovibrio* était responsable d'une augmentation de la production d'IL-6 et d'IL-8 par les cellules KB. La capacité de *D. desulfuricans* et de *D. fairfieldensis* à survivre dans les cellules épithéliales et à moduler leur réponse immunitaire pourrait contribuer au développement des maladies parodontales. *Desulfovibrio* ainsi que d'autres parodontopathogènes peuvent produire des β -lactamases et sont capables d'envahir les cellules épithéliales. Il a été suggéré que l'hydrolyse de l'amoxicilline pourrait être évitée grâce à l'utilisation d'un complexe amoxicilline- β -cyclodextrine (β CD) et que la diffusion intracellulaire d'agents antimicrobiens pourrait être améliorée après complexation avec des β CD. Un complexe stable amoxicilline- β CD, caractérisé après analyse spectrale et thermique, n'a ni amélioré l'activité de l'amoxicilline vis-à-vis de souches produisant des β -lactamases ni augmenté la diffusion intracellulaire de ce composé.

Mots clés : *Desulfovibrio*, invasion, cellules KB, cytokine, amoxicilline, cyclodextrine.