



**UNIVERSITÉ
DE LORRAINE**

BioSE



**Ecole doctorale BIOSE
(Biologie, Santé, Environnement)**

Mémoire pour l'obtention du diplôme
D'Habilitation À Diriger des Recherches

Présenté par

Catherine BISSON

CNU 57-01

Soutenance le vendredi 5 décembre 2020

***Activités de recherche : Identification de nouveaux facteurs
immunologiques et microbiens dans l'étiopathogénie des parodontites***

Composition du jury

Rapporteurs: Marie-Laure COLOMBIER

– Professeur des Universités – UFR de Paris Descartes

Hervé BOUTIGNY-VELLA

– Professeur des Universités – UFR de Brest

Olivier HUCK

– Professeur des Universités – UFR de Strasbourg

Examineurs: Fani ANAGNOSTOU

– Professeur des Universités – UFR de Paris Diderot

Jean-Pol FRIPPIAT – Parrain scientifique

– Professeur des Universités – Université de Lorraine

– Directeur de l'EA 7300

Table des matières

1. Laboratoire(s) ou structure(s) de rattachement.....	9
• Actuellement : 2011 à aujourd’hui	9
• Précédemment :.....	9
○ 2009-2010	9
○ 2004-2008 : dans la cadre de ma thèse de Doctorat	9
2. Résumé de l’activité antérieure.....	9
2.1. Evaluation de l’activation immunitaire de cellules présentes dans le fluide crévicaire de patients atteints de parodontite et de sujet sain	9
2.2. Identification d’une nouvelle bactérie dans les poches parodontales et évaluation de ses facteurs de virulence potentiels	11
2.3. Evaluation de l’adhérence de <i>P. gingivalis</i> sur des surfaces de Ti présentant différentes anodisations	17
2.4. Evaluation d’une nouvelle molécule immunitaire dans la parodontite : TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloïd cells)-1.....	19
2.5. Evaluation de la présence de protozoaires dans le biofilm sous-gingival et des facteurs parodontaux associés	26
3. Le projet de recherche et perspectives	31
3.1. Evaluation de la prévalence des protozoaires dans le biofilm sous-gingival : projet à court terme	32
3.2. Evaluation de facteurs de virulence directs ou indirects des protozoaires : projet à moyen terme	33
3.3. Evaluation de la capacité de parasites à interagir avec certaines cellules de l’immunité innée (facteur de virulence direct) : projet à long terme.	36
3.4. Projets hors thématique.....	38
3.4.1. Collaboration	38
3.4.2. Autres	38
3.5. Financements	39
4. Mobilité.....	39
5. Travaux.....	40
5.1. Thèses et mémoires	40
5.2. Publications	41
5.2.1. Internationales	41
5.2.2. Nationales.....	43
5.2.3. Ouvrages.....	44
5.3. Communications.....	45
5.3.1. Internationales	45
5.3.2. Nationales.....	46

5.4.	Organisation de congrès ou colloques.....	48
6.	Activité d'encadrement	48
6.1.	Diplôme de Doctorat d'Université	48
6.2.	Diplôme de Master 2	48
6.3.	Stage d'Initiation à la Recherche et autres	49
6.4.	Stage de laboratoire	49
6.5.	Diplôme d'état de Docteur en Chirurgie-Dentaire.....	50
7.	Références bibliographiques	50

ABREVIATIONS

A. actinomycetemcomitans/A. a : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaires

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATCC : American Type Cell Collection

BoP : Bleeding on Probing

DAP12 : *DNA activating protein 12* = protéine activatrice de 12kDa

C. rectus/C. r : *Campylobacter rectus*

C. spp : *Capnocytophaga spp*

CFU : Colonie Formant Unité

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

D. fairfieldensis, D. desulfuricans : *Desulfovibrio fairfieldensis, Desulfovibrio desulfuricans*

E. corrodens/E. c : *Eikenella corrodens*

ELISA : *Enzyme linked ImmunoSorbent Assay* - essai immuno-enzymatique

E. gingivalis : *Entamoeba gingivalis*

E. histolytica : *Entamoeba histolytica*

E. nodatum/E. n : *Eubacterium nodatum*

F. nucleatum : *Fusobacterium nucleatum*

HLA-DR : Human Leucocyte Antigen -DR

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

LPS : Lipopolysaccharide

LR12 : Peptide synthétisé à partir des séquences de TREM-1 et TLT-1 de 12 acides aminés

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney

MMPs : Métalloprotéinases matricielles

MOI : Multiplicity of infection

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88 - réponse primaire de différenciation myéloïde 88

NET : Neutrophil Extracellular Trap

PAMPs : *Pathogen Associated Molecular Patterns* - motifs moléculaires caractéristiques des pathogènes

PAS : Periodic Acid Schiff

PCR : *Polymerase Chain Reaction* – amplification en chaîne par polymérase

P. gingivalis/P. g : *Porphyromonas gingivalis*

PGE2: Prostaglandine E2

P. intermedia/P. i : *Prevotella intermedia*

PII : *Plaque Index* – indice de plaque

P. micra/P. m : *Parvimonas micra*

PNN : polynucléaire neutrophile

PPD : *Periodontal pocket depth* -Profondeur de poche parodontale

PRRs : *Pattern Recognition Receptors* – Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires

PSD : *Polymicrobial synergy and dysbiosis* – synergie polymicrobienne et dysbiose

qPCR : PCR en temps réel

T. forsythia/T. f : *Tannerella forsythia*

T. denticola/T. d: *Treponema denticola*

T. vaginalis : *Trichomonas vaginalis*

T. tenax : *Trichomonas tenax*

TLRs: *Toll like receptors* – les récepteurs Toll

TNF α : *Tumor Necrosis Factor α* – Facteur de nécrose tumorale α

TREM: *Triggering receptor expressed on myeloid cells*

TREM-1s : TREM-1 soluble

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Proposition d'inclusion de l'amoxicilline dans la β -cyclodextrine.....	14
Figure 2. Variabilité de l'accumulation bactérienne selon l'état de surface des plaques de Titane.....	16
Figure 3. Boucle d'amplification de la production de cytokines induite par l'activation du récepteur TREM-1	17

**« Je n'ai pas de talent particulier.
Je suis passionnément curieux. »**

Albert Einstein

Je remercie les Professeurs Marie-Laure COLOMBIER, Hervé BOUTIGNY-VELLA et Olivier HUCK d'avoir accepté d'évaluer cette HDR et de m'avoir fait l'honneur de faire partie de ce jury.

Je suis de même très honorée de la présence des Professeurs Fani ANAGNOSTOU et Jean-Pol FRIPPIAT qui ont accepté d'examiner ce travail et de siéger au sein de ce jury.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé directement ou indirectement, de par leur expertise, leur conseil et leur soutien à l'aboutissement de tous les travaux exposés dans cet ouvrage.

A ma famille,

A mes enfants,

A mes ami(e)s.

1. Laboratoire(s) ou structure(s) de rattachement

- **Actuellement : 2011 à aujourd'hui**

EA 7300 SIMPA (Stress IMMunité Pathogènes).

Université de Lorraine

Faculté de Médecine.

9 avenue de la Forêt de Haye – Bâtiment AB

54500 Vandoeuvre les Nancy Cedex

Directeur du laboratoire : Pr. Jean Pol FRIPPIAT, PU Immunologie, Faculté des Sciences et Technologies

Pôle scientifique de rattachement : BMS (Biologie, Médecine, Santé)

Ecole Doctoral BioSE (Biologie, Santé, Environnement)

- **Précédemment :**

- 2009-2010

EA 4369 RHEM (Relation Hôte Environnement Microbien).

Faculté de Médecine

9 avenue de la Forêt de Haye – Bâtiment AB

54500 Vandoeuvre les Nancy Cedex

Directeur du laboratoire : Pr. Gilbert FAURE, PU-PH Immunologie, Faculté de Médecine, Responsable du laboratoire d'Immunologie, CHU de Nancy.

- 2004-2008 : dans la cadre de ma thèse de Doctorat

GEVSM (Groupe des Vecteur Supramoléculaires du Médicaments)

Faculté de Pharmacie

Rue Albert Lebrun

54000 Nancy

Directeur du laboratoire : Pr. J-B. REGNOUF-DE-VAINS,

Structure affiliée au SRSMC (Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes), UMR 7565, CNRS, Nancy Université, UFR des Sciences et Technologies, sous la direction du Pr. Y. FORT, PU Chimie organique, minérale, industrielle.

2. Résumé de l'activité antérieure

Les principaux thèmes des recherches effectuées s'organisent autour de l'étiopathogénie des parodontites. Différents aspects ont été évalués par le biais d'études cliniques et de modèles *in vitro* sur:

- L'activation d'une réponse immunitaire innée des patients atteints de parodontite ;
- L'étude du microbiote parodontal ;
- L'interface entre le microbiote et l'immunité innée développée dans les maladies parodontales.

2.1. Evaluation de l'activation immunitaire de cellules présentes dans le fluide créviculaire de patients atteints de parodontite et de sujet sain

Au cours de la validation du certificat d'immunologie de la faculté de Médecine de Nancy, un premier projet clinique a été mis en place et a permis d'étudier l'activation immunologique de cellules du fluide

crévulaire issues de sites sains mais aussi de sites présentant une gingivite et une parodontite de la cavité buccale de 23 patients ainsi que de sites sains issus de 10 sujets contrôles, indemnes de toute maladie parodontale. L'étude de l'activation immunologique s'est focalisée sur l'analyse de HLA-DR, une molécule de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité, exprimée de manière constitutive sur la membrane des macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B. Cette molécule permet la présentation d'antigène aux lymphocytes T et peut être exprimée par d'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales et les polynucléaires neutrophiles (PNN) dans des conditions inflammatoires particulières, stimulée par la production locale d'interféron gamma (IFN γ). De plus, le marqueur CD9, molécule tétraspanique, a été évalué au niveau des cellules collectées. Cette molécule est exprimée à la surface des cellules épithéliales, s'associe avec d'autres intégrines ou molécules tétraspaniques et est impliquée dans la mobilité, la différenciation et la maturation des cellules épithéliales. C'est un régulateur essentiel du turn-over épithélial qui aide au maintien de l'intégrité de l'épithélium sulculaire. Cet épithélium est, avec l'attache épithélio-conjonctive, la première barrière atteinte qui favorise la colonisation bactérienne des tissus conjonctifs sous-jacents aboutissant à la dégradation des tissus mous et osseux observée dans la parodontite.

L'analyse en immunofluorescence indirecte **des cellules épithéliales** a montré (i) un pourcentage d'activation de **l'expression de HLA-DR** inverse au degré d'atteinte parodontale au niveau de l'ensemble des cellules des sites chez les malades, l'expression de chaque site des malades étant significativement supérieure à celle des sites des sujets contrôles ($p < 0,05$). **Le pourcentage de PNN exprimant HLA-DR** augmente graduellement avec le niveau d'atteinte parodontale (différences d'expression des sites sains vs sites parodontites, $p < 0,002$; sites gingivite vs sites parodontites, $p < 0,03$). Aucune activation HLA-DR n'est détectée chez les neutrophiles des sites des sujets contrôles, contrairement à ceux des sites sains qui présentent, en absence de toute dégradation tissulaire et d'inflammation notable, cette molécule de classe II. De même une augmentation graduelle de la **détection de CD9 des PNN** avec le degré de sévérité de l'atteinte parodontale des sites est observée (différences d'expression des sites sains vs sites gingivites et sites sains vs sites parodontites, $p > 0,02$). Aucun neutrophile des sites contrôles n'a présenté de marquage CD9, montrant que seuls les neutrophiles activés issus des lésions parodontales expriment cette molécule qui pourrait selon certains auteurs faciliter le passage trans-endothélial de cette cellule vers les sites infectés (Pigott & Power, 1993). **L'intensité du marquage et le pourcentage de CD9 au niveau des cellules épithéliales** de tous les sites des patients est plus important que celui des sites des contrôles. Seules les cellules des sites gingivites présentent un pourcentage de cellules marquées CD9 significativement supérieur à celui des cellules issues des sites sains des patients contrôles ($p < 0,01$).

En conclusion : à la lumière de ces résultats, seuls les PNN des patients malades sont activés (expression de HLA-DR et CD9) de façon proportionnelle à l'atteinte parodontale. La diminution du nombre de cellules épithéliales exprimant HLA-DR des sites avec parodontite montre le niveau de dysfonctionnement de ces cellules, première barrière à lutter contre la colonisation bactérienne. Seules les cellules épithéliales au stade gingivite semblent présenter une augmentation significative de l'intensité de l'expression de CD9 par rapport aux sites contrôles.

Ce travail a donné lieu à une publication : Bisson-Boutelliez C, Miller N, Demarch D, Bene MC. CD9 and HLA-DR expression by crevicular epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils in periodontal disease. J Clin Periodontol. 2001 ;28(7):650-6. Rang SIGAP: A/ IF:1.736.

2.2. Identification d'une nouvelle bactérie dans les poches parodontales et évaluation de ses facteurs de virulence potentiels

La variation d'activation de nombreuses molécules de l'immunité telles que la molécule HLA-DR est la conséquence de la présence de micro-organismes, dont le nombre et la composition sont spécifiques à chaque patient, voire à chaque site (Cortelli et Coll. 2008). L'origine bactérienne des maladies parodontales est largement étayée dans la littérature internationale. Parmi ces micro-organismes, certains sont plus pathogènes et induisent une dérégulation de la réponse immunitaire de l'hôte qui a pour conséquence la destruction des tissus de soutien de la dent. En effet, Socransky et Coll. ont classé ces bactéries en complexe, dont le complexe rouge regroupe les bactéries les plus virulentes (Socransky et Coll. 1998). Cependant, les outils de biologie moléculaire ont permis de détecter de nombreuses espèces supplémentaires, dont certaines non cultivables, qui ne sont pas répertoriées dans ces complexes et dont l'impact dans la pathogénie des maladies parodontales reste inconnu. Ainsi, les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont des microorganismes anaérobies très fréquents dans l'environnement et ont été plus tardivement isolées chez l'homme (Postgate, 1984). Des auteurs ont détecté cette famille de bactéries dans les poches de patients avec une parodontite (Langendijk et Coll. 1999). Elles produisent entre autres de l'hydrogène sulfuré, molécule toxique pour les cellules, mais leur rôle dans les maladies parodontales reste inconnu. Afin de comprendre leur potentielle participation à la pathogénie de la parodontite, une étude évaluant leur impact sur certaines molécules du fluide crévulaire telles que le lysozyme et les immunoglobulines G de patients malades a été réalisée dans le cadre d'un DEA de Microbiologie, enzymologie, nutrition, « aspects moléculaires et cellulaires », sous la direction du Pr. Gilbert FAURE.

Les bactéries identifiées appartiennent principalement au genre *Desulfovibrio*, et ce sont trois espèces qui ont été détectées dans des échantillons humains : *D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis* et *D. piger* (Loubinoux et Coll. 2000, 2002). Ces bactéries semblent jouer un rôle dans la pathogénie humaine notamment dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales mais aussi dans les parodontites (Langendijk et Coll. 2000 et 1999, Loubinoux et Coll. 2002). Parmi le genre *Desulfovibrio*, deux nouvelles espèces de bactéries sulfato-réductrices ont été identifiées dans le biofilm issu de poche parodontale : *Desulfovibrio fairfieldensis* et *Desulfomicrobium orale* (Langendijk et Coll. 2001). Afin de mieux comprendre leur implication dans la maladie parodontale, une recherche clinique a été mise en place dans le département de parodontologie du CHU de Nancy incluant un échantillon de 34 patients avec une parodontite n'ayant reçu aucun traitement ni médicament qui aurait perturbé le biofilm parodontal, ainsi que 13 patients contrôles sans aucune maladie parodontale. Pour être sélectionné, les patients malades devaient présenter au moins 2 dents avec une profondeur de poche > 5mm, et un site sain sans atteinte de l'attache épithélio-conjonctive. Les paramètres parodontaux classiques ont été relevés pour chaque site prélevé : indice de plaque, indice gingival, profondeur de poche, niveau d'attache clinique, saignement et mobilité de la dent. De plus, après élimination de la salive et du biofilm supra-gingival, deux prélèvements de fluide crévulaire ont été réalisés : l'un pour l'étude bactériologique, l'autre pour l'analyse immunologique. L'échantillon du microbiote était immédiatement placé dans un milieu nutritif prêt à l'emploi, pour la détection des bactéries sulfato-réductrices (Kit Labège®, Compagnie Française de Géothermie, Orléans, France). Ce milieu, plus sensible que le milieu de Postgate usuel, permet la croissance de bactéries telles que *Desulfovibrio* spp., *Desulfotomaculum* spp., *Desulfobacter* spp. et *Desulfobulbus* spp. Une fois inoculé, le milieu était placé en étuve 37°C. Concernant les prélèvements réservés pour l'étude immunologique, ces derniers étaient congelés jusqu'à leur utilisation : pour l'analyse des immunoglobulines G (IgG) en immunonéphélométrie et western blot, et du lysozyme par immunonéphélométrie microparticulaire.

En collaboration avec le Docteur Julien LOUBINOX (laboratoire de bactériologie-virologie, Unité Mixte de Recherche 7565, Faculté de Médecine), une PCR multiplex ciblant l'ARNr 16s de *D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis* et *D. piger* a été mise en place pour identifier les BSR isolées des poches parodontales.

Les résultats de diverses analyses ont montré que la présence des BSR est détectée dans 59,7% des sites pathologiques prélevés, ainsi 80% des patients avaient au moins un des sites collectés BSR positif. Seul un site sain des patients malades présentait ces bactéries, et aucun des sites sains des patients contrôles. Les sites avec des poches parodontales de profondeur et de niveau d'attache importants, et saignant au sondage, sont statistiquement associés avec la présence de BSR ($p < 0,0001$). La PCR multiplex a permis de mettre en évidence uniquement l'espèce *Desulfovibrio fairfieldensis* dans les poches parodontales (Loubinoux et Coll. 2002).

Concernant l'étude immunologique, aucune oligoclonalité des IgG en fonction de la détection des BSR n'a pu être détectée dans les sites collectés. Aucune IgG n'a été détectée dans les sites des sujets contrôles et très peu dans les sites sains des patients. Ces anticorps (Ac) sont surtout présents dans les sites pathologiques et leur intensité de détection varie selon les échantillons. L'analyse du lysozyme dans les différents sites prélevés montre une quantité supérieure de cette enzyme dans les sites sains des sujets contrôles ($240,9 \text{ ng} \pm 10,4$) que dans les sites des patients (sites pathologiques ($194,7 \text{ ng} \pm 2,8$) et sites sains ($216,3 \text{ ng} \pm 4,2$)). Aucune association significative n'est observée entre les sites BSR positifs et le dosage des IgG et du lysozyme.

En conclusion, l'absence d'oligoclonalité des IgG issus des sites malades en fonction de la présence de ces bactéries montre la non-production d'Ac spécifique, soit la capacité d'induire une réponse immunitaire par l'hôte colonisé.

Ce travail a donné lieu à une publication : 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(5):321-3.

Les résultats de cette étude ne permettent pas d'incriminer les BSR et plus particulièrement *Desulfovibrio fairfieldensis* dans l'étiopathogénie des parodontites. Afin de mieux comprendre le rôle joué par cette bactérie dans l'apparition et le développement des maladies parodontales, certains facteurs de virulence ont été évalués lors de **ma thèse de Doctorat en Sciences Odontologiques de l'Université Henri Poincaré** : (i) capacité d'invasion dans des cellules non phagocytaires professionnelles, (ii) capacité de stimuler la production de cytokines par des cellules non immunitaires à l'aide de modèle cellulaire *in vitro*.

L'invasion cellulaire est un mécanisme utilisé par les principaux pathogènes de la parodontite : *Porphyromonas gingivalis* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Belton et Coll. 2004, Brissette & Fives-Taylor, 1999). Cette internalisation leur permet d'échapper à la phagocytose et bactéricidie des cellules de défense de l'hôte ainsi qu'à l'action de certains antibiotiques tels que l'amoxicilline. Cette capacité d'invasion cellulaire est donc un facteur de virulence notoire que toutes les bactéries colonisant le parodonte ne possèdent pas. A l'aide d'une lignée cellulaire, il a été montré la capacité d'internalisation de *D. fairfieldensis* ATCC 700045, *D. desulfuricans* ATCC 2774 et ATCC 29577 dans des cellules épithéliales KB ATCC CCL-17, par comptage des cellules viables après incubation à un MOI (Multiplication of Infection) de 100 bactéries/ 1 cellule épithéliale pendant 2 heures. Cette internalisation a été confirmée par microscopie électronique à balayage pour l'ensemble des souches testées, montrant la présence de bactéries libres dans le cytoplasme. Afin de visualiser les bactéries en microscopie à fluorescence, des Ac polychoraux spécifiques au genre *Desulfovibrio* ont été générés chez le lapin. Des tests de spécificité ont été réalisés à l'aide d'un marquage avec des IgG couplés avec un fluorophore (Fluorescein Isothiocyanate

= FITC) sur diverses bactéries parodontales. Ainsi, cette invasion cellulaire a aussi été démontrée par microscopie confocale pour *D. fairfieldensis* et a permis de confirmer l'absence de membrane autour de la bactérie intracellulaire. Le test d'invasion a été prolongé de 2h à 24h, 48h et 72h et a montré que ***D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* ATCC 33277 internalisées restaient viables après 48h d'incubation, montrant la capacité de ces bactéries à se multiplier dans le cytoplasme des cellules épithéliales.** L'entrée dans la cellule-hôte nécessite le réarrangement de microfilaments d'actine et/ou de microtubule. L'utilisation de différents inhibiteurs des molécules impliquées dans l'internalisation a permis de mettre en évidence le mécanisme par lequel ces bactéries rentrent dans la cellule épithéliale. Le nocodazole (inhibiteur des tubulines des microtubules) a induit une diminution du nombre de cellules internalisées alors que la cytochalasine D (molécule inhibitrice des microfilaments d'actine) a provoqué une augmentation de ces dernières. Ainsi, l'ensemble des **3 souches de *Desulfovibrio* testées semblent s'internaliser via un mécanisme microtubule dépendant.** L'augmentation du nombre de cellules internalisées induite par la cytochalasine D peut être liée à la capacité de cette molécule à renforcer les mouvements des lysosomes vers la périphérie cellulaire et favoriser l'invasion par fusion de la membrane plasmique avec les lysosomes recrutés.

La capacité des bactéries à induire une réponse inflammatoire est l'un des facteurs clés en faveur d'une participation à l'étiopathogénie des parodontites d'un microorganisme. L'incubation de *D. fairfieldensis* et *D. desulfuricans* ATCC 29577 avec les cellules KB a provoqué la production de deux cytokines : la cytokine pro-inflammatoire IL-6 et la chimiokine IL-8, mais pas d'IL-1 β . Cette chimiokine est rapidement détectée après 2 h de contamination et sa production peut être le résultat de la stimulation de divers mécanismes impliqués dans l'adhésion et l'internalisation des bactéries. Ces microorganismes participeraient donc en collaboration avec de nombreux autres pathogènes à favoriser la diapédèse et la migration des neutrophiles vers les sites infectieux. En revanche, la production d'IL-6 par les cellules KB est assez tardive et n'est détectable qu'après 24 à 48h d'incubation. Il semblerait que la synthèse de cette cytokine soit liée à la multiplication des bactéries intra-cytoplasmiques, évaluée lors du test de la viabilité des bactéries internalisées.

La capacité de certaines bactéries telles que des pathogènes parodontaux reconnus, mais aussi de *Desulfovibrio desulfuricans* et *D. fairfieldensis* comme démontré précédemment, à s'internaliser dans les cellules non phagocytaires telles que les cellules épithéliales est problématique (Belton et Coll. 2004, Deshpande et Coll. 1998). En effet, les bactéries internalisées échappent non seulement à l'action de cellules de l'immunité mais aussi à celle d'un antibiotique très utilisé dans le traitement des parodontites : l'amoxicilline. Il s'agit d'une aminopénicilline qui a une action bactéricide par inhibition de la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi bactérienne. Cet antibiotique à large spectre agissant tant sur les bactéries à Gram positif que sur certaines bactéries à Gram négatif, présente une bonne diffusion dans tous les espaces extracellulaires de l'organisme. Mais sa diffusion dans les tissus parodontaux est limitée, et reste inférieure à d'autres antibiotiques telles que les cyclines et le métronidazole (Mombelli et Coll. 2003). Sa concentration dans le tissu osseux est inférieure de plus de 80% à celle dans le sérum (Landersdorfer et Coll. 2009). De même, l'amoxicilline présente une très faible diffusion intra-cellulaire qui ne permet pas d'atteindre une concentration suffisante pour une action bactéricide de cette molécule sur les bactéries internalisées (Scaglione et Coll. 1993). De plus, certaines espèces bactériennes sont productrices de β -lactamases, enzyme capable d'hydrolyser le cycle β -lactame de l'amoxicilline à l'origine de son inactivation. Les bactéries à Gram négatif synthétisent cette enzyme dans leur espace périplasmique alors que celles à Gram positif l'excrètent dans leur environnement extracellulaire proche protégeant ainsi les bactéries voisines sensibles à l'action de cet antibiotique (Charlier et Coll. 1998). Ainsi, des résistances acquises par production de β -lactamases ont été décrites chez certaines 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 *Desulfovibrio* spp.

La recherche de l'amélioration de l'action thérapeutique de l'amoxicilline tant sur le plan de sa diffusion intra-tissulaire et intracellulaire que sur le plan de son inactivation par les β -lactamases est cruciale car cet antibiotique reste la molécule de 1^{ère} intention recommandée par l'AFSSAPS dans ses deux dernières directives nationales concernant la prescription des antibiotiques en pratique bucco-dentaire (AFSSAPS, 2011 et 2001).

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides cycliques présentant une cavité de différents diamètres selon le type de molécule (taille de cavité de α -CD < β -CD < γ -CD) qui forment des complexes par l'inclusion de diverses molécules invitées. Ces cyclodextrines permettent notamment d'augmenter la solubilité aqueuse, la stabilité et la biodisponibilité de nombreuses molécules actives lipophiles par l'internalisation totale ou partielle de ces dernières dans sa cavité hydrophobe, agissant comme un transporteur de drogue. La fonctionnalisation de ces cyclodextrines par le greffage de molécules permet un ciblage thérapeutique au niveau de certains récepteurs et crée des interactions sucres-protéines qui sont des liaisons fondamentales dans les processus pathologiques. La formation d'un complexe de l'amoxicilline avec une cyclodextrine pourrait potentiellement permettre d'améliorer l'hydrophilie de cet antibiotique et de protéger de la dégradation par les β -lactamases son cycle β -lactame par l'inclusion de ce dernier dans la cavité de la cyclodextrine ou par la création d'un encombrement stœchiométrique gênant voire inhibant le positionnement de l'enzyme. La complexation de l'amoxicilline avec une cyclodextrine permet selon certains auteurs d'augmenter l'activité bactéricide vis-à-vis de certaines bactéries et/ou de protéger le cycle β -lactame de l'action de souches productrices de β -lactamases (Athanassiou et Coll. 2005, Maffeo et Coll. 2006). Cependant les souches testées dans ces études étaient des bactéries, productrices de β -lactamases, non impliquées dans la pathogénie des parodontites.

Le choix de la cyclodextrine testée pour une potentielle complexation avec l'amoxicilline s'est porté sur la β -CD dont la taille semble être compatible avec celle de la molécule antibiotique. L'amélioration de l'activité bactéricide de l'amoxicilline après complexation avec une β -CD a été testée sur des souches *Desulfovibrio* mais aussi sur des parodontopathogènes reconnus, producteurs ou non de β -lactamases. La β -CD est d'autant plus intéressante que certains auteurs ont montré un système de transport spécifique de cette molécule dans la paroi cellulaire bactérienne (système de transport cym) chez *Klebsiella oxytoca* (Pajatsch et Coll. 1998, 1999).

Une caractérisation physico-chimique complète du mélange amoxicilline- β -CD ainsi que la détermination des CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) de ce mélange sur les formes extra et intra-cellulaires de souches *D. desulfuricans*, *D. fairfieldensis* et sur certaines bactéries impliquées dans l'étiopathogénie des maladies parodontales en milieu gélosé ont été réalisées.

Le complexe amoxicilline- β -CD a été caractérisé à l'aide de spectrométrie IR (Infra-Rouge), RMN (Résonance Magnétique Nucléaire), spectrométrie de masse, calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et HPLC (High Performance Liquid Chromatography), et ROESY 2D (Rotating-frame Overhauser Enhancement Spectroscopy, analyse RMN en deux dimensions).

Le complexe est formé par simple mélange d'amoxicilline et de β -CD dans de l'eau ultra-pure selon différents rapports molaires 1 :0.25, 1 :0.5, 1 :1, 1 :3, 1 :5 (amox : β -CD) à pH 5. La solution obtenue est lyophilisée pour permettre l'évaluation du mélange synthétisé.

L'étude par spectrométrie IR a permis de montrer la présence de complexe amox- β -CD par comparaison avec le spectre de l'amoxicilline seule. Le $\nu_{C=O}$ du cycle β -lactame présente une forte absorption à 1776 cm^{-1} avec un déplacement à 1769 cm^{-1} pour le complexe 1 :1. De même, le carboxylate ν_{asCOO^-} (1582 cm^{-1})

et ν_{COO^-} (1397 cm^{-1}) sont déplacés sur des fréquences plus hautes (1597 cm^{-1}) et (1404 cm^{-1}). Ces déplacements sont le résultat de la formation de liaison hydrogène forte entre le groupe carboxylate et le proton de la fonction alcool de la CD hôte, indiquant clairement l'implication du groupe carbonyle et carboxylate du cycle β -lactame dans la complexation de tous les systèmes amox- β -CD testés.

L'analyse en RMN de l'amoxicilline, β -CD et du potentiel complexe amox- β -CD a été réalisée dans l'eau deutérée. Le complexe amox- β -CD présente un faible déplacement des protons H-3 situés dans la cavité de la β -CD. L'amoxicilline complexée ne montre aucune modification chimique du phénol et des H-3 thiazol alors que des déplacements faibles ont été détectés au niveau des hydrogènes du cycle aromatique, du cycle β -lactame et des méthyls. Aucune interaction de proton dipolaire entre l'amoxicilline et la β -CD n'est détectée dans le spectre 2D ROESY ce qui suggère l'absence d'association moléculaire spécifique. Néanmoins, la coexistence de deux isomères d'orientation différente peut expliquer l'absence de déplacement chimique des protons de la cavité de la β -CD. De plus, il ne peut être exclu que la présence d'échanges intermoléculaires rapides qui empêchent la détection d'une association lors de l'analyse RMN.

La spectrométrie de masse, thermogravimétrie et la calorimétrie différentielle à balayage (DSC = Differential Scanning Calorimetry) sont des techniques d'analyse permettant de caractériser des systèmes binaires ou à composants multiples tels que des composés d'inclusion à l'état solide. Des thermogrammes de l'amoxicilline seule, de la β -CD, du mélange physique amox et β -CD et du complexe [amox- β -CD] [1 :1] sont réalisés. Le thermogramme du complexe [1 :1] montre une complète disparition des pics exothermiques et endothermiques entre $200,5^\circ\text{C}$ et $242,5^\circ\text{C}$ visibles chez l'amoxicilline seule, preuve d'une encapsulation moléculaire de l'amoxicilline dans la cavité de la β -CD. Le profil DSC du mélange physique des deux poudres montre une superposition du thermogramme de chaque molécule seule alors que celui du complexe montre une disparition des pics exo ($176,8^\circ\text{C}$) et endothermique (entre $202,8^\circ\text{C}$ et $242,8^\circ\text{C}$).

Enfin, une constante de stabilité du complexe [amox- β -CD] a été déterminée par HPLC. Un tampon dihydrogénophosphate de potassium a été utilisé dans la phase mobile car les anions phosphate ne peuvent interférer avec le processus de complexation. Il a été montré qu'une concentration croissante de β -CD dans le tampon phosphate résulte dans un temps de rétention plus court pour l'amoxicilline, indiquant une augmentation de la solubilité de ce composé par liaison avec la β -CD. Un complexe de stœchiométrie 1 :1 a été obtenu avec les analyses en HPLC. Une constante de stabilité de $1,878 \text{ M}^{-1}$ a été trouvée pour le complexe [amox- β -CD] (coefficient de corrélation $r^2=0,99$) ce qui correspond à la proportion d'antibiotique et de β -CD libre dans la solution versus la concentration de complexe [amox- β -CD]. La constante de stabilité importante rend le complexe approprié à une utilisation pharmaceutique.

Considérant l'ensemble des analyses, la taille et la structure de l'amoxicilline, nous avons pu conclure que l'amoxicilline n'est pas totalement incluse dans la cavité de la β -CD qui est trop petite. Il est toutefois possible que des isomères de complexe d'orientation différente existent : chaque complexe pouvant inclure une partie opposée de l'amoxicilline (Figure 1). Cependant, malgré l'absence d'inclusion totale de l'amoxicilline, la présence de la cyclodextrine pourrait, du fait d'un encombrement stœchiométrique, gêner la liaison des β -lactamases sur le cycle β -lactam et ainsi protéger cette molécule antibiotique de toute dégradation conduisant à son inactivation. Ainsi, après la caractérisation du complexe, les CMI de l'amoxicilline seule et complexée ([amox- β -CD] [1 :1] et [1 :3]) de diverses bactéries résistantes (productrices de bêta-lactamases) et de souches sensibles ont été déterminées selon les recommandations du Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) afin d'évaluer les variations de l'activité bactéricide de l'antibiotique complexé (CLSI, M11-A7, 2007). Pour chacune des souches testées, sauf pour *Desulfovibrio fairfieldensis* LBN 303 (souches-patient du laboratoire de bactériologie, CHU de

Nancy), 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.

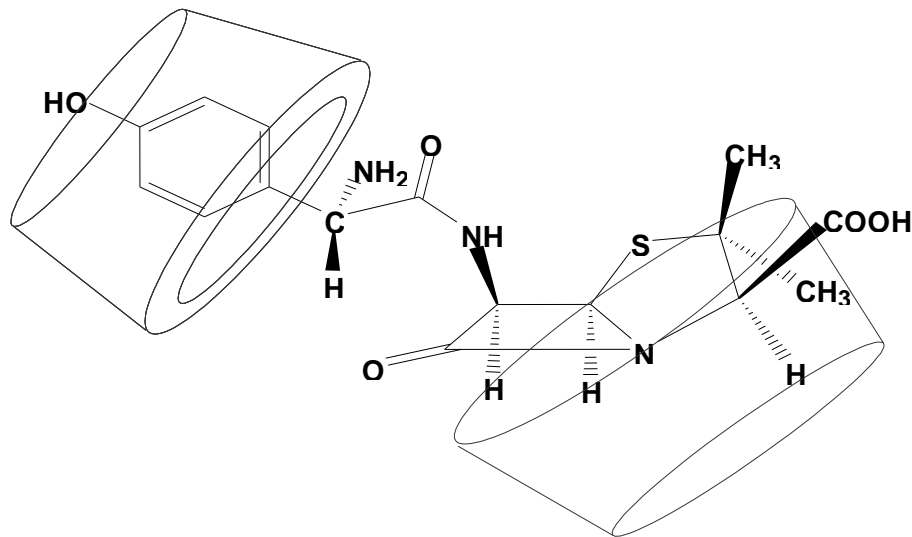


Figure 1. Proposition d'inclusion de l'amoxicilline dans la β -cyclodextrine.

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 *Desulfovibrio*, *Prevotella*, *Fusobacterium* et *Bacteroides* testées. Cependant, il a été constaté que la complexation de l'amoxicilline avec la β -CD (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 -lactamases et dont le mécanisme de résistance vis-à-vis des pénicillines n'a pas encore été déterminé.

L'évaluation de l'activité de l'amoxicilline complexée sur les bactéries intracellulaires a tout d'abord été réalisée avec *P. gingivalis* ATCC 33277 internalisé dans les cellules épithéliales KB. Cette bactérie a été choisie car son taux d'internalisation est plus élevé que celui des souches de *Desulfovibrio*. Aucune activité intracellulaire de l'amoxicilline n'a été mise en évidence après 2 heures d'incubation des complexes [amox- β -CD] avec des cellules KB préalablement infectées par *P. gingivalis*, et ce quelle que soit la concentration d'amoxicilline testée (1 CMI ou 10 CMI). Il est à souligner que les concentrations intracellulaires de *P. gingivalis* observées étaient celles attendues eu égard à la littérature. Etant donné l'absence d'activité intracellulaire de l'amoxicilline complexée constatée au cours d'essais répétés avec *P. gingivalis* internalisés, aucun test avec un modèle d'internalisation avec *Desulfovibrio* n'a été mis en place.

Ce travail a montré les capacités de ces bactéries à stimuler l'immunité innée et à s'internaliser dans des cellules épithéliales : deux éléments d'intérêt qui abondent dans le sens d'une potentielle participation de ces bactéries dans l'étiopathogénie des maladies parodontales. D'autres auteurs ont par la suite pu identifier d'autres facteurs de virulence de ces bactéries : capacités de migrer dans les tissus gingivaux, d'induire la production de cytokines par des fibroblastes (Dzierzewicz et coll. 2010, Heggendorf et coll. 2014). L'évaluation de la pathogénicité d'un microorganisme nécessite de répondre à différents critères. Ainsi, selon les postulats de Koch revisités par Socransky (Socransky et Haffajee, 1992), une bactérie n'est considérée comme pathogène que si elle est (i) présente en grande quantité dans les sites pathologiques et peu dans les sites sains, (ii) présente en faible quantité ou absente dans les sites cicatrisés, (iii) capable d'induire une réponse des cellules de l'immunité, (iv) capable de dégrader les tissus du parodonte, et (v) capable de reproduire la maladie dans un modèle animal.

En conclusion :

Parmi les postulats de Koch revisités par Socransky, certains ont été explorés lors de notre étude, notamment les points (i) et (iii). Le modèle animal n'a pu être mis en place à l'époque de ce travail car les conditions d'accès à l'animalerie étaient compliquées pour le modèle envisagé, soit l'utilisation de souris germ free. De plus, la complexation de l'amoxicilline avec une β -cyclodextrine n'a pas permis de mettre en évidence une protection vis à vis des bactéries productrices de β -lactamase ni une augmentation de la diffusion intracellulaire de cette molécule antibiotique.

Ce travail a donné lieu à 2 publications :

- Bisson-Boutelliez C, Massin F, Dumas D, Miller N, Lozniewski A. Desulfovibrio spp. survive within KB cells and modulate inflammatory responses. Mol Oral Microbiol. 2010;25(3):226-35.
- Bisson-Boutelliez C, Fontanay S, Finance C, Kedzierewicz F. Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin beta-cyclodextrin complexes. AAPS PharmSciTech. 2010;11(2):574-81.

2.3. Evaluation de l'adhérence de *P. gingivalis* sur des surfaces de Ti présentant différentes anodisations

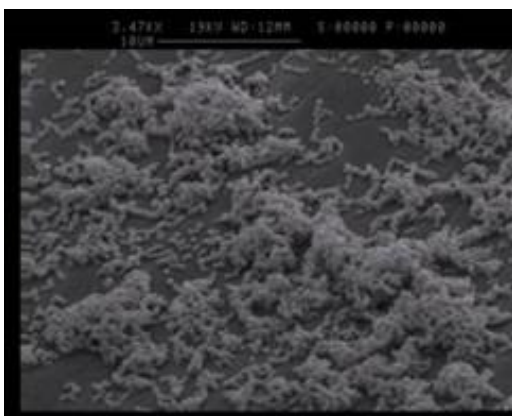
L'avènement de nouvelles techniques chirurgicales telles que l'implantologie devaient assurer à nos patients des restaurations prothétiques fiables et fonctionnelles. Cependant, de nombreux auteurs ont montré l'apparition de lésions tissulaires autour de certains implants à plus ou moins longue échéance. La destruction tissulaire déclenchée par les bactéries affecte aussi l'ensemble des tissus entourant l'implant induisant une péri-implantite, soit une dégradation identique à celle observée autour des dents naturelles. Afin de limiter et/ou d'inhiber ce phénomène, les industriels évaluent de nouvelles surfaces implantaires biocompatibles qui permettraient une ostéointégration pérenne tout en limitant l'adhésion et la colonisation bactérienne afin d'éviter toute dégradation induite par une réaction immuno-inflammatoire. Nous avons alors participé à une étude évaluant l'adhésion de *P. gingivalis* sur des plots de titane présentant différents états de surface dans le cadre d'une codirection de thèse avec l'équipe du Professeur RAPIN, directeur de l'Unité mixte de recherche (UMR 7198), de l'Institut Jean Lamour rattachée à l'Institut de chimie du CNRS et à l'Université de Lorraine. Le Professeur RAPIN encadrerait la thèse du Docteur Dimitrios PONGAS qui s'était engagé dans une carrière hospitalo-universitaire, en vue d'un poste de Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier, dans le département de parodontologie, UFR de Nancy.

Ainsi, en collaboration avec les docteurs Delphine VEYS-RENAUX et Emmanuel ROCCA de l'Institut Jean Lamour, UMR CNRS 7198 et de moi-même, RHEM (Relation Hôte Environnement Micro-organismes, Faculté de Médecine, sous la direction du Pr. Gilbert FAURE), EA 4369, le docteur Dimitrios PONGAS a mené un travail dans le cadre sa de sa thèse de Doctorat. Dans un premier temps a été évaluée la corrosion de différents systèmes implantaires Il mettait en contact des implants avec des solutions simulant la salive, le fluide crévulaire et l'inflammation, puis il réalisait des mesures électrochimiques (suivi de potentiels de corrosion, résistance de polarisation, courbes de polarisation cycliques : les analyses ont été réalisées sous la direction des docteurs VEYS-RENAUX et ROCCA). Puis il a évalué l'adhérence du parodontopathogène majeur, *P. gingivalis* ATCC 33277, sur des échantillons de titane ayant subi des traitements de surface par anodisation par un système micro arc utilisant différents bains ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \pm$ glycérophosphate de Calcium ou acétate de Calcium). L'anodisation plasma du titane conduit à la formation d'un film d'oxyde superficiel de plusieurs micromètres d'épaisseurs parsemé de pores. Ce film d'oxyde rugueux présente selon les conditions d'anodisation (temps variant 75 à 900sec ;

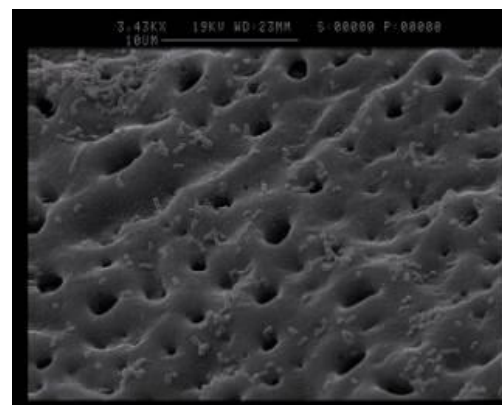
type de bain) une épaisseur et une largeur de pore variable. Toutes les propriétés physico-chimiques des surfaces créées ont été caractérisées par l'équipe du Dr. VEYS-RENAUX. L'impact des différentes conditions d'anodisation des plaques de Ti sur l'adhésion de *P. gingivalis* à leur surface a été testé. Le Ti anodisé E13 a permis de réduire de manière significative la présence de cette bactérie à sa surface par comparaison avec un Ti poli sans traitement (Figure 2).

Un an après son inscription, le doctorant a finalement décidé de privilégier son activité libérale et d'interrompre l'étude engagée. Malgré des résultats préliminaires très intéressants, l'équipe de l'Institut Jean Lamour n'a pas pu continuer les expérimentations sur ce sujet. Nous n'avons malheureusement pas pu publier les résultats obtenus par manque de quelques manips de répétabilité de l'adhérence de ce pathogène sur les différents types de surface de titane créées afin de confirmer les résultats préliminaires observés.

En conclusion, la surface de Ti anodisé E13 semble être un traitement de surface intéressant permettant une diminution de l'adhésion de bactéries anaérobies. Ce traitement de surface nécessite d'autres investigations en laboratoire avant d'être testé chez l'homme.



Ti poli centre – MEB – X 3.47K



Ti anodisé E13 centre – MEB – X 3.43 k

Figure 2.

E13 = Ti anodisé [$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \pm \text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})$ = acétate de calcium].

Protocole d'adhésion : $2,5 \cdot 10^7$ bactéries/ml par plaque de Ti dans du MEM, 10% SVF. Mise en étuve à 37°C, en anaérobie, sur plateau agitateur à 100 tr/min pendant 24h.

La structure de recherche RHEM, EA 4369, a évolué vers l'EA SIMPA 7300 (Stress Immunité Pathogènes) en 2011, son directeur actuel est le Professeur Jean-Pol FRIPPIAT. Cette nouvelle EA de l'Université de Lorraine résulte du rapprochement d'immunologistes, de microbiologistes et de neurobiologistes qui étudient ensemble l'impact de stress socio-environnementaux ou gravitaires chroniques sur le système immunitaire, le système nerveux et les microbiotes, soit des enseignants-chercheurs issus de l'UFR des Sciences et Technologies, des UFR de Médecine et d'Odontologie de l'Université de Lorraine.

Dans ce contexte, un troisième projet a été mis en place afin d'évaluer (i) la réponse immunitaire développée chez les patients atteints de parodontite suite à l'apparition de la dysbiose du microbiote buccal, (ii) les microorganismes qui composent ce microbiote et qui pourraient jouer un rôle dans l'étiopathogénie de cette maladie.

2.4. Evaluation d'une nouvelle molécule immunitaire dans la parodontite : TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells)-1

La parodontite est une maladie inflammatoire multifactorielle résultant d'une communauté microbienne dysbiotique de pathobiontes et pathogènes clé qui induisent la destruction des tissus de support de la dent. Dans un biofilm sous-gingival mature, les pathobiontes et les pathogènes produisent de nombreux facteurs de virulence, d'antigènes ou de produits de catabolisme qui leur permettent d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte et qui sont capables d'induire des lésions cellulaires et tissulaires directement ou indirectement par la dérégulation des réponses inflammatoires. La sur-régulation de la production cytokinique joue un rôle majeur dans la destruction des tissus parodontaux. L'évolution des recherches en immunologie ont mis en évidence de nouveaux acteurs et/ou molécules de l'immunité non évalués dans les maladies parodontales et qui pourraient être impliqués dans l'étiopathogénie de ces dernières

Une nouvelle voie d'amplification des cytokines pro-inflammatoires, la voie de **Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1) /DAP12**, a été mise en évidence notamment dans les chocs septiques. La sur-production de cytokines inflammatoires dans les parodontites est largement documenté dans de nombreux travaux, Ainsi, une étude clinique a recherché la participation potentielle de cette nouvelle voie dans l'étiopathogénie des maladies parodontales et a évalué la présence et le niveau d'activation du récepteur TREM-1 chez des patients atteints de parodontite.

TREM-1, récepteur exprimé à la surface de certaines cellules immunitaires, a été identifié par Bouchon et Coll. en 2000, et semblent participer à la sur-production de cytokines. Son expression est sur-régulée dans différents contextes infectieux (pneumonie, sepsis et choc septique) et au cours de diverses maladies inflammatoires non-infectieuses (Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales, pancréatite aigüe, polyarthrite rhumatoïde). Ce récepteur initialement identifié au niveau de la membrane des polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages matures a été plus récemment mise en évidence aussi à la surface de kératinocytes (McMahon et Coll. 2011). TREM-1 appartient à la superfamille des Immunoglobulines et active les voies de signalisation via un adaptateur DNA activating protein de 12kDa (DAP12) en réponse à certains motifs moléculaires exprimés par de nombreux pathogènes (PAMP, Pathogen Associated Molecular Patterns). Le rôle de TREM dans l'amplification de la réponse inflammatoire a été confirmé dans des modèles de sepsis chez la souris où le blocage de la voie de signalisation de TREM-1 induisait une diminution de la production de cytokines (Gibot et Coll. 2004). L'activation de TREM-1 en présence du ligand des TLR (Toll-Like Receptor) -2 et -4 amplifie la production de cytokines pro-inflammatoires telles qu'IL-1 β , TNF α , inhibe celle d'IL-10 et favorise le « burst oxydative » des neutrophiles (Figure 3).

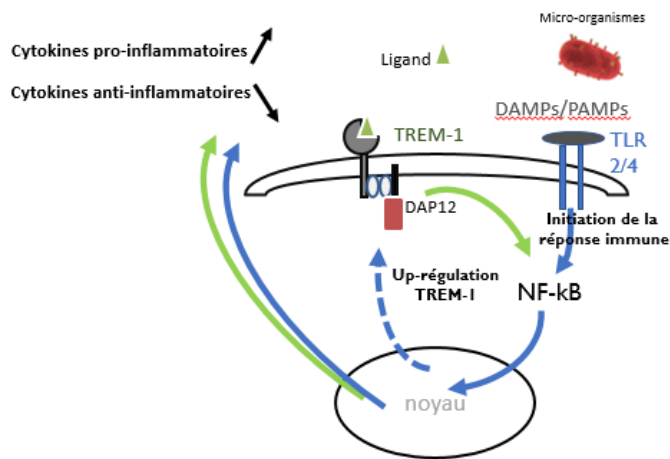


Figure 3. Boucle d'amplification de la production de cytokines induite par l'activation du récepteur TREM-1 (adapté d'après les publications de Tessarz et Cerwenka, 2008; Gibot 2004; Klesney-Tait et al. 2006)

→ **Boucle d'amplification TREM**

Les cellules phagocytaires activées relarguent une forme soluble du récepteur TREM-1 dans différents fluides tels que les lavages bronchoalvéolaires, le plasma, le fluide synoviale, le liquide pleural et l'urine, suite au clivage de son domaine extra-membranaire par des métalloprotéinases.

Une étude clinique a été mise en place afin d'évaluer (i) la présence de cette molécule dans le fluide crévicaire de sites avec une poche parodontale et (ii) **les variations de sa concentration en fonction des différents paramètres parodontaux usuels**. L'étude incluait 17 patients présentant une parodontite et 23 patients indemnes de toute maladie parodontale. Le niveau de concentration de TREM-1 soluble permettrait potentiellement d'affiner le diagnostic de la parodontite ainsi que le risque de développer cette pathologie chez les patients.

Pour être sélectionnés, les patients devaient présenter une parodontite (chronique ou agressive selon la classification d'Armitage, 1998) généralisée (soit de stade 3 ou 4, grade A à C, selon la classification de 2017, Papapanou et coll. 2017), (i) avec au moins trois dents présentant une poche parodontale ≥ 5 mm et un site sain, (ii) ne pas être affectés par une maladie systémique ni prendre des médicaments pouvant influencer leur statut immunitaire. Les prélèvements de fluide crévicaire devaient être effectués avant tout traitement initial. Les principaux indices cliniques parodontaux usuels ont été relevés. Le fluide collecté a été analysé par la technique ELISA et a permis de montrer une augmentation très importante dans les sites malades et légère dans les sites sains des patients malades de la concentration de TREM-1 soluble : cette concentration dans les sites sains des malades était significativement plus élevée que celle dans les sites sains des sujets contrôles. La molécule de TREM-1 soluble est retrouvée en concentration statistiquement plus importante dès que la quantité de plaque augmente ainsi que l'inflammation gingivale, sans toutefois présenter un gradient qui suivait celui des indices cliniques (PII : Indice de plaque ; GI : Indice gingival). En effet, les sites avec des indices de PII et GI de 3 et 4 ne présentaient pas des concentrations de TREM-1 différentes. Un phénomène presque similaire était observé en fonction de la profondeur de poche où la concentration de la molécule soluble variait peu avec des profondeurs de poche de 5 à 8 mm, puis au-delà sa concentration chutait. Cette diminution pourrait s'expliquer par la présence d'enzymes dégradant cette molécule comme déjà décrit pour les cytokines.

En conclusion, TREM-1 soluble semble être un marqueur intéressant de l'état inflammatoire et de la destruction tissulaire parodontale des sites présentant une poche parodontale.

Ce travail a donné lieu à une publication: Bisson C, Massin F, Lefevre PA, Thilly N, Miller N, Gibot S. Increased gingival crevicular fluid levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)-1 in severe periodontitis. J Clin Periodontol. 2012;39(12):1141-8.

Afin de mieux comprendre le rôle de TREM-1 dans la pathogénie de la parodontite, deux axes de recherche ont été mis en place.

- D'une part, un **modèle *in vitro* a étudié l'impact du LPS de *P. gingivalis* et d'un inhibiteur LR12** sur la production de TREM-1 membranaire et soluble par des monocytes de lignée primaire,
- Et d'autre part, une étude clinique a été mise en place pour détecter les concentrations de **TREM-1 soluble crévicaire et salivaire issu de patients avec une parodontite** et de patients contrôles afin (i) de **quantifier l'évolution** de cette molécule crévicaire après traitement initial, ainsi que **d'estimer son rôle pronostique** dans l'amélioration des sites pathologiques chez les malades et (ii) de rechercher une **potentielle relation de cette molécule avec le stress** et les bactéries parodontales.

Les travaux ont été entrepris dans le cadre du **M2 et de la thèse de Doctorat de Mademoiselle Marie DUBAR, interne en Médecine Bucco-Dentaire**. En effet, la forme soluble de TREM-1 semble agir comme un leurre en piégeant le ligand de TREM-1 afin d'empêcher sa liaison avec son récepteur et donc son activation. La modulation de l'activation de la voie TREM-1 semble avoir un effet bénéfique montré dans de nombreuses études. Dans un modèle animal de sepsis, l'administration de LR12, un peptide inhibiteur synthétique du récepteur TREM-1, mimant des séquences hautement conservées de son domaine extracellulaire, avait un effet protecteur, non seulement par la diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires, mais aussi par une augmentation du nombre de souris survivantes. Ce peptide pourrait être une molécule intéressante dans le traitement des maladies parodontales car elle permettrait de limiter la production de certaines cytokines pro-inflammatoires via la modulation de l'activation de TREM-1. La production de cytokines est induite par la reconnaissance des PAMPs par les TLRs de la cellule. Seule la boucle conduisant à la sur-production de cytokines est inhibée lors de la modulation du récepteur TREM-1 par l'agoniste LR12.

A ce jour, certains auteurs ont montré l'implication de *P. gingivalis*, bactérie entière W50 ou bactérie avec une mutation de Arg-gingipain A/B ou Lys-gingipain, dans la stimulation de la production de TREM-1 soluble et membranaire par des monocytes de lignée continue, mais aussi de neutrophiles de lignée primaire (Bostanci & Belibasakis 2012 ; Bostanci et Coll. 2013 ; Bostanci et Coll. 2013). Le modèle *in vitro* testé dans notre étude a permis de montrer l'implication du LPS de *P. gingivalis* dans la production de TREM-1 membranaire et soluble par des monocytes de lignée primaire. Après incubation des cellules avec la molécule LR12, il a été observé une diminution significative de la production de TREM-1 soluble et membranaire, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF α) et de la chimiokine IL-8. L'analyse des ARNm a montré que cette diminution était la conséquence d'une synthèse diminuée de ces cytokines suite à l'inhibition de l'activation de TREM-1 induite par la liaison du peptide agoniste LR12 avec le ligand de TREM-1, et non celui d'une dégradation de ces molécules par des enzymes.

Afin d'améliorer l'efficacité de l'agoniste LR12 sur la diminution de la production des cytokines, différents protocoles ont été testés : ajout de diverses concentrations de LR12 (25, 50 ou 100 μ g/ml à T0). Les concentrations de 50 et 100 μ g/ml testées induisent une même diminution significative de la production de cytokines que celle de 25 μ g/ml. Afin de limiter l'effet de l'oxydation spontanée du LR12 observée dans un tampon phosphaté l'empêchant ainsi d'inhiber la stimulation de TREM-1, une concentration de 25 μ g/ml de LR12 a été ajoutée toutes les 2 heures. Ces ajouts itératifs n'ont pas permis de majorer la diminution de la production cytokinique observée avec celle lors du premier ajout.

Enfin, les types de TLR (Toll like Receptor) impliqués dans la stimulation de la synthèse de TREM-1 ont été évalués à l'aide de divers agonistes de TLR1 à 9. L'évaluation du niveau d'expression de TREM-1 par cytométrie en flux a montré la capacité des agonistes des TLR-1, TLR2, TLR4 et TLR5 à induire la production de ce récepteur précisant ainsi ses voies de stimulation.

En conclusion, ce modèle cellulaire a permis (i) d'affiner les molécules capables de stimuler la production de TREM-1 (ici le LPS de *P. gingivalis*), (ii) de montrer l'intérêt de l'agoniste LR12 dans la diminution de la production de cytokines (IL-1 β , -8 et TNF α) et des formes membranaires et solubles de TREM-1.

Ce travail a donné lieu à une publication :

Dubar M, Carrasco K, Gibot S, Bisson C. Effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes. J Clin Periodontol. 2018;45(7):799-805.

L'étude clinique sur TREM-1 soluble a concerné 30 patients atteints de parodontite modérée à sévère et 30 sujets contrôles, indemne de toute pathologie, se présentant pour un traitement parodontal ou une consultation de routine au département de parodontologie du CHU Odontologie de Nancy, secteur Heydenreich, d'avril 2016 à octobre 2017. L'étude TREM-1 soluble a été mise en place avec l'aide de la PARC (Plateforme d'Aide à la Recherche Clinique) et acceptée par le comité d'éthique de la DRI du CHU de Nancy, puis enregistrée au clinicaltrials.com sous le N° NCT02873949. Pour l'ensemble de la population incluse dans cet essai clinique, plusieurs paramètres biologiques ont été évalués :

- Paramètre immunologique : concentration de TREM-1 soluble dans le fluide crévicaire de chaque site prélevé et la salive évaluée par ELISA
- Paramètre microbiologique : dans chaque site prélevé a été identifié 11 espèces bactériennes par un test semi-quantitatif (Kit MicroIDent).
- Paramètres de stress/anxiété : concentration de cortisol salivaire évaluée par ELISA, ainsi que l'évaluation du stress et de l'anxiété à l'aide d'auto-questionnaires (questionnaire de stress de Cohen, questionnaire d'anxiété d'état et général de Spielberger, STAI [State Trait Anxiety Inventory]-YA et -YB respectivement).

Ainsi dans le groupe malade, 2 sites avec une profondeur de poche ≥ 5 mm et un site sain ont été prélevés à deux reprises, la première pour l'étude microbiologique (pointes de papier stériles) et la seconde pour l'étude immunologique (strips). Les mêmes prélèvements ont été réalisés dans le site sain des sujets du groupe contrôle. Pour chaque patient inclus, un prélèvement salivaire a été fait par la personne elle-même à son lever et avant toute activité, à l'aide d'une salivette.

Le principal objectif était de quantifier l'évolution de la concentration de TREM-1 soluble crévicaire après traitement parodontal non chirurgical et de rechercher une potentielle association de cette concentration avec le niveau de cicatrisation des sites malades (soit la diminution de la profondeur des poches parodontales) après la thérapeutique initiale. Le deuxième objectif était d'identifier et suivre les interactions entre les niveaux de TREM-1 soluble avec les facteurs psychosociaux, les indices parodontaux et la présence de certains parodontopathogènes avant et après traitement.

Les résultats cliniques du traitement initial des patients avec parodontite ont montré une diminution de tous les indices cliniques usuels (indice de plaque et gingival, profondeur de poche parodontale, niveau d'attache clinique, saignement au sondage, mobilité dentaire). Concernant TREM-1 soluble, une diminution de la concentration crévicaire a été observée sauf dans les sites pathologiques ne présentant pas d'amélioration de leur profondeur de poche (stagnation ou augmentation de la poche parodontale). Les sites sains du groupe malade après traitement présentaient une concentration de TREM-1 soluble crévicaire similaire à celle des sites sains des contrôles.

Concernant les facteurs associés à de fortes concentrations de TREM-1 soluble crévicaire : l'analyse multivariée avant traitement a montré que ces concentrations étaient associées significativement avec l'indice de plaque, le saignement et la mobilité dentaire. Cette même analyse après traitement ne montre plus aucune significativité de ces indices cliniques avec les concentrations de TREM-1 soluble. Cette

molécule est l'un des marqueurs de l'inflammation des maladies parodontales qui diminue avec le traitement non chirurgical.

Ces mêmes analyses ont été réalisées avec le microbiote. **Avant traitement**, *E. corrodens* était significativement associé avec des hautes concentrations de TREM-1 soluble crévulaire, dans l'analyse bivariée, alors qu'*A. actinomycetemcomitans* était significativement inversement proportionnel à ces mêmes concentrations de TREM-1, dans l'analyse bi- et multivariée. **Après traitement**, l'analyse multivariée n'a montré aucune corrélation significative avec les bactéries parodontales, seule l'analyse bivariée a associé significativement certains pathogènes du complexe rouge, *P. gingivalis* et *Treponema denticola* mais aussi *Campylobacter rectus* avec de fortes concentrations de TREM-1 soluble, une association presque significative a été observée pour *T. forsythia* et *E. corrodens*. Cette variabilité d'association des concentrations de TREM-1 avec les différentes espèces bactériennes détectées peut s'expliquer par les modifications de la composition du microbiote avant et après traitement qui est site- et patient-spécifique. Chaque bactérie a une capacité propre à stimuler l'immunité comme observé pour la production de cytokines par différents types cellulaires avec des biofilms mono ou pluri espèces dans des modèles *in vitro*, mais aussi a ses propres facteurs de virulence et notamment celui de dégrader les protéines (Bodet et Grenier 2010). En effet, certaines études ont montré que *P. gingivalis* découpe TREM-1 soluble à l'aide de la lys-gingipaïne dans une étude *in vitro* (Bostanci et al. 2013). De plus, la synergie bactérienne peut varier en fonction des espèces en présence et pourrait expliquer cette variabilité. La faible concentration de TREM-1 soluble observée en présence d'*A. actinomycetemcomitans* pourrait être la conséquence de facteurs de virulence de cette bactérie comme la leucotoxine qui induit l'apoptose de cellules immunitaires telles que les monocytes et les polynucléaires neutrophiles qui sont des cellules exprimant TREM-1. Ces résultats devront être confirmés lors de l'analyse d'une cohorte de patients plus importante.

Le stress et l'anxiété ne semblent pas avoir d'impact sur la concentration de TREM-1 soluble salivaire chez les patients avec parodontite. Une corrélation statistiquement significative entre les scores des réponses aux questionnaires de stress et d'anxiété générale a été observée pour les hommes et les femmes des deux groupes confortant ainsi la validité de l'évaluation des facteurs psychosociaux des personnes incluses. Aucune corrélation significative n'a été détectée entre les scores des différents questionnaires et la concentration de cortisol salivaire chez les malades et chez les contrôles. Cependant, la concentration de cette molécule était statistiquement plus élevée chez les malades avant traitement que chez les contrôles.

L'impact immunosuppresseur du stress/anxiété a pu être constaté chez les sujets hommes contrôles qui présentait une concentration de TREM-1 soluble salivaire plus faible chez ceux avec un stress et une anxiété sévère ($p < 0,03$ et $p = 0,059$ respectivement). En revanche dans le groupe malade, aucune corrélation n'a été observée entre les scores de stress et d'anxiété avec les concentrations de TREM-1 salivaire tant chez les hommes que les femmes inclus. La capacité de s'adapter aux événements de la vie et d'y répondre est spécifique à chaque personne, ce qui peut expliquer l'absence de corrélation entre les marqueurs psychosociaux et certains marqueurs de l'immunité chez les patients. De plus, il semble que cette immunosuppression soit limitée voire dépassée par la stimulation par des nombreux pathogènes présents chez les malades. Le taux de cortisol salivaire est statistiquement plus important dans le groupe des malades que dans le groupe contrôle et apparaît dans cette étude corrélé avec l'augmentation de la profondeur de poche. Le cortisol est l'un des principaux marqueurs biologiques du stress psychologique et permet d'évaluer la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien. La production de cette hormone glucocorticoïde n'induit pas uniquement des réactions organiques liées au stress, mais peut aussi stimuler la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, s'ajoutant à celle provoquée par les pathogènes. Ainsi le cortisol pourrait participer à la dégradation des tissus parodontaux observée chez les malades.

La concentration de TREM-1 soluble crévulaire avant traitement n'est pas prédictive du niveau de cicatrisation des lésions tissulaires (objectivé par une diminution de la profondeur de la poche) après la thérapeutique non chirurgicale. Dans certaines pathologies telles que le choc septique, la tuberculose et le cancer pulmonaire, un niveau sérique de TREM-1 soluble plus bas est un marqueur prédictif indépendant d'une baisse de la mortalité et d'une augmentation de la résolution de la maladie.

A l'instar de ces pathologies, l'impact de la concentration de TREM-1 avant traitement sur la réponse tissulaire à la thérapeutique initiale a été évalué. Le rôle de TREM-1 soluble n'est pas totalement éclairci, mais pourrait avoir un rôle anti-inflammatoire. En effet, comme précédemment exposé, un peptide mimant un domaine hautement conservé de la partie extracellulaire du récepteur TREM-1 permet de limiter la production excessive de cytokines pro-inflammatoires et ainsi diminuer le taux de mortalité dans un modèle animal de choc septique (Gibot et Coll. 2004). Dans notre étude, le bas niveau de TREM-1 soluble crévulaire à J0 n'est pas prédictif d'une amélioration plus importante des sites avec parodontite après traitement initial. Seule la diminution de la flore totale et de l'indice gingival était corrélée significativement avec une cicatrisation des sites malades, soit une diminution de la profondeur de poche (sachant que 77% des sites pathologiques prélevés présentaient une diminution de 2mm et plus). Néanmoins, eu égard des résultats montrés dans d'autres modèles infectieux, il pourrait être intéressant de tester la molécule agoniste de TREM-1, LR12, afin d'évaluer son impact sur le niveau de dégradation osseuse dans un modèle animal. En effet, la parodontite est une pathologie provoquée par les bactéries mais la réponse immunitaire de l'hôte joue un rôle majeur dans la progression de cette maladie ; les dysfonctionnements immuno-inflammatoires participant à la dégradation des tissus parodontaux (Hajishengallis & Lamont, 2012).

En conclusion, cette étude a montré que (i) la concentration de la forme soluble de TREM-1 avant traitement n'est pas une molécule prédictive de l'évolution de la diminution de la poche parodontale des patients atteints de parodontite après surfaçage/débridement, (ii) que la concentration de TREM-1 soluble reste élevée dans les sites sans amélioration clinique, et présente une concentration variable selon le microbiote identifié dans la poche. De même la concentration de TREM-1 soluble ne semble pas affectée par le niveau de stress et d'anxiété des patients malades.

L'évaluation de l'action de l'agoniste LR12 sur le développement des parodontites est une voie innovante qui reste à explorer tout d'abord dans un modèle animal puis, si les résultats sont pertinents, chez l'homme. En effet la diminution de l'inflammation déclenchée par la présence des microorganismes dans la poche parodontale semble jouer un rôle central dans l'initiation de la parodontite comme détaillée dans la méta-analyse menée par Barthold et Van Dyke (2019).

Cependant, l'étude de l'action de cet agoniste dans le traitement des parodontites chez l'homme nécessite en amont :

- la mise en place d'un modèle animal de parodontite
- la mise au point d'un système de libération locale à l'instar de ce qui existe pour les antibiotiques afin d'apporter une quantité suffisante de LR12 dans les sites avec une poche parodontale.

Si le modèle animal de parodontite montre une diminution de la résorption osseuse corrélée à l'adjonction de la molécule LR12, une étude chez l'homme pourra être mise en place en double aveugle versus un placebo pour évaluer son efficacité dans le traitement parodontal non chirurgical dans un premier temps.

Ce travail a donné lieu à : un article le Journal of Clinical Periodontology : Dubar M., JP. Fripiat, Remen T., Boufenzer A., C. Alauzet, Baumann C., Gibot S., Bisson C. Comparison of sTREM-1 levels and associated periodontal, bacterial and psychosocial factors before and after periodontal treatment. J. Clin. Periodontol. 2020, 30.

La détection de certaines bactéries parodontales semble être corrélée à certains niveaux de stress et d'anxiété, ainsi qu'avec le cortisol chez les malades.

La parodontite est une pathologie pluri factorielle d'origine bactérienne, modulée par des facteurs de risque tels que le diabète et la consommation tabagique. D'autres facteurs tels que le stress et l'anxiété semblent jouer un rôle dans l'apparition et l'évolution des maladies parodontales, par un impact direct sur la réponse immunitaire ou indirect par le biais via une attitude conduisant notamment à une mauvaise hygiène, une nutrition déséquilibrée. Depuis quelques années un autre rôle du stress est apparu, notamment celui joué dans la composition et la fonction du microbiote intestinal. Le paradigme de notre compréhension de l'axe cerveau-intestin a changé car un nombre exponentiel de données a décrit des interactions bidirectionnelles entre le microbiote intestinal, le système nerveux central et les systèmes immunitaire et gastro-intestinal (Martin et coll. 2018). Ainsi de nombreuses études précliniques ont montré une altération de la composition et des activités métaboliques du microbiote intestinal liée à différents facteurs de stress (Karl et coll. 2018). Il est possible que des relations similaires existent pour le microbiote buccal, ces modifications bactériennes en fonction de facteurs psychologiques restent très peu explorées à ce jour en parodontologie.

L'objectif primaire de l'étude clinique était d'évaluer l'impact des facteurs psychosociaux sur la sévérité de la parodontite ainsi que sur un marqueur de l'immunité, en l'occurrence TREM-1 soluble qui est la molécule d'intérêt de notre travail, prélevé dans le fluide crévulaire. L'état psychologique des patients inclus a été évalué d'une part par les scores résultants des auto-questionnaires sur le stress et l'anxiété et d'autre part par la quantification du cortisol salivaire, qui est l'un des principaux marqueurs biologiques du stress psychologique (Questionnaire de Stress de Cohen, d'anxiété d'état et général de Spielberger) (Cohen et Coll. 1983 ; Spielberger et Coll. 1970 ; Spielberger, 1983). Nos résultats ont montré qu'aucun paramètre clinique n'était corrélé au niveau de stress et d'anxiété des patients malades, à part l'indice de plaque De même, le taux du TREM-1 soluble salivaire n'était pas associé avec les niveaux de stress et d'anxiété des patients malades. Seuls les sujets contrôles homme présentaient un taux de TREM-1 soluble salivaire inversement corrélé au score de stress et d'anxiété ($p < 0,03$ et $p = 0,06$).

Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre les niveaux de cortisol salivaire et les scores tant du stress que de l'anxiété générale. Pourtant, **le taux de cortisol était plus élevé dans le groupe malade que dans le groupe contrôle**. Cette différence n'étant pas liée au niveau de stress-anxiété des patients, d'autres facteurs ont été recherchés pour expliquer la variabilité entre les contrôles et les malades. Ainsi, dans une analyse multivariée, la concentration du cortisol salivaire était significativement corrélée positivement avec la profondeur de poche et négativement avec la présence de *Parvimonas micra* (une faible concentration de cortisol est associée avec la présence de cette bactérie, $p = 0,057$).

De même, la détection de certaines bactéries parodontales variait selon les niveaux d'anxiété et de stress des patients malades (non-anxieux/anxieux/très anxieux, non-stressé/sachant géré son stress/très stressé). Ainsi avant traitement parodontal, *T. forsythia* est détecté majoritairement chez les patients avec un stress sévère ($p = 0,025$) et *A. actinomycetemcomitans* n'est pas identifié chez les patients malades anxieux et très anxieux ($p = 0,076$). D'autres corrélations entre les facteurs psychosociaux et la détection bactérienne ont été observées après traitement parodontal non chirurgical. L'évaluation de l'impact des facteurs psychosociaux sur la variabilité de la détection de certaines bactéries avant et après traitement a montré que la présence de *T. forsythia*, mais aussi de *F. nucleatum* et de *C. rectus* est statistiquement corrélée au niveau de stress des patients malades ($p < 0,02$, $p < 0,05$ et $p = 0,009$ respectivement). Concernant les niveaux d'anxiété d'état (anxiété éprouvée dans une situation particulière), seul *P. gingivalis* semble statistiquement corrélé avec ce facteur et n'est jamais identifié chez les patients très anxieux après traitement ($p = 0,034$).

Cette variabilité de corrélation de la détection de certaines bactéries avec les facteurs psychosociaux avant et après traitement parodontal pourrait être la conséquence des différentes synergies bactérienne résultant de la modulation de la quantité de chaque bactérie suite à la thérapie et des espèces en présence

dans le biofilm. De plus, certains auteurs ont montré que le stress pouvait moduler la composition du microbiote et que la croissance de nombreuses bactéries anaérobies pouvait être modifiée par les hormones de stress délivrées dans la salive (Alauzet et Coll. 2019). En effet, les glucocorticoïdes et les catécholamines produits lors d'un stress pourraient influencer la croissance de certaines bactéries pathogènes comme observé dans des modèles cellulaires (Roberts et coll. 2002 ; Akcali et Coll. 2013). L'association entre le stress/ anxiété et le microbiote oral est un concept innovant très peu décrit dans la littérature concernant les bactéries parodontales. Dans l'étude TREM-microbiote-facteurs psychosociaux, toutes les bactéries corrélées significativement au stress/anxiété de certains patients sont à Gram négatif. Les résultats de cette étude sont à considérer avec prudence car ils concernent des petits groupes de patients et nécessitent d'être confirmés dans une cohorte plus importante.

En conclusion, ce travail a montré que (i) la concentration du cortisol salivaire n'est pas corrélée avec le niveau de stress et d'anxiété des patients et qu'elle est positivement corrélée avec la profondeur de poche et inversement corrélée avec la présence de *P. micra* ; et (ii) les niveaux de stress et d'anxiété sont corrélés avec certaines bactéries et que cette corrélation est différente avant et après traitement non chirurgical.

A l'instar du modèle microbiote intestinal- cerveau déjà traité dans de nombreuses publications, ce concept au niveau du microbiote buccal nécessite la mise en place de nombreuses études afin de comprendre les différentes interactions et phénomènes biologiques régulant les modifications de composition du microbiote en corrélation avec les molécules du stress et de l'immunité.

Ce travail a abouti à un article :

“Relations of psychosocial factors and cortisol with periodontal and bacterial parameters: A prospective clinical study in 30 patients with periodontitis before and after non-surgical treatment”. Dubar M., Clerc-Urmes I., Baumann C., Alauzet C., Bisson C. Int. J. Environ. Res. Public Health. 2020,17,7651.

2.5. Evaluation de la présence de protozoaires dans le biofilm sous-gingival et des facteurs parodontaux associés

Malgré la connaissance des nombreux facteurs de virulence développés par les bactéries, et des mécanismes immuno-inflammatoires impliqués dans l'étiopathogénie de cette maladie, les raisons de l'absence de réponse tissulaire favorable après un traitement conventionnel de certains de nos patients restent inconnues. De même, pourquoi une dent présente une lésion osseuse alors que sa voisine est presque indemne de toute atteinte tissulaire ? Chaque jour, le praticien est confronté à ces paradoxes cliniques observables chez ses patients sans pouvoir y apporter de réponses. De ces observations est née la nécessité d'explorer d'autres facteurs étiologiques des maladies parodontales.

Les interactions entre le microbiote parodontal et l'immunité sont la clé de l'apparition et de l'évolution des dégradations tissulaires observées dans la parodontite. Le microbiote parodontal se compose de nombreux micro-organismes parmi lesquels ont été principalement identifiés des bactéries, des levures, des virus et aussi des protozoaires. Ces derniers ont souvent été détectés dans la cavité buccale de patients avec ou sans maladie parodontale à l'aide d'un microscope, et seulement quelques études ont utilisé des outils de biologie moléculaire, seule technique fiable permettant l'identification d'un micro-organisme. Parmi ces protozoaires, deux ont été détectés dans la cavité buccale des patients avec ou sans maladie parodontale : l'amibe *Entamoeba gingivalis* et le flagellé *Trichomonas tenax* et sont très souvent considérés comme des commensaux de la flore buccale. Parmi les articles traitant des protozoaires dans les maladies parodontales, seule un a recherché la présence de l'amibe *E. gingivalis* en fonction de la profondeur de poche (Linke et Gannon, 1989). Aucune étude à ce jour n'a évalué l'ensemble des

paramètres cliniques parodontaux usuels afin de connaître le contexte parodontal, soit le niveau de dégradation tissulaire et d'inflammation, dans lequel ces protozoaires sont détectés.

L'étude de ces protozoaires d'un point de vue strictement parodontal n'a donc jamais été réalisée. De plus, les interactions entre les bactéries et ces protozoaires dans le biofilm sous gingival n'ont jamais été évaluées, et pourraient peut-être expliquer certains cas de parodontites récidivantes et/ou réfractaires à tout traitement parodontal.

Avant de mettre en place une recherche plus spécifique des liens entre parodontite et protozoaires, une revue de littérature a été menée sur *T. tenax* selon les critères PRISMA adaptés aux postulats de Koch revisités par Socransky en 1998. Cette revue systématique a cherché à établir le rôle de ce protozoaire dans l'étiopathogénie des parodontites par la consultation de toutes les publications parues dans cinq moteurs de recherche : Medline, Science Direct, Web of science, Dentistry and Oral Science Sources et Cochrane central register of controlled trials, entre l'année 1960 et mars 2019. Sur les 376 publications identifiées, seules 25 ont remplis les critères d'éligibilité. La plupart de ces études étaient des articles de recherche sur des modèles *in vitro* évaluant les facteurs de virulence potentiel de *T. tenax*, d'autres étaient des études cliniques de type cas-contrôles ou étude contrôlée randomisée et des case-reports.

En conclusion, l'analyse de ces articles ont montré que : (i) *T. tenax* est plus fréquemment détecté dans le biofilm dentaire des sites avec parodontite que dans les sites sains, (ii) l'impact du traitement non-chirurgical de la parodontite sur la présence de ce micro-organisme n'a pas été réellement exploré à ce jour, (iii) le flagellé semble capable de produire différentes enzymes qui pourraient participer à la destruction des tissus parodontaux mais pas de provoquer la synthèse de cytokines par des macrophages après incubation avec ces derniers, (iv) ce protozoaire adhère sur différentes cellules épithéliales, (v) aucun modèle animal n'a évalué la capacité du flagellé à induire une parodontite.

A la lumière de ces articles, il n'est pas possible de confirmer l'implication de *T. tenax* dans la pathogénie de la parodontite.

Ce travail a donné lieu à une publication :

Bisson C., Dridi SM., Machouart M. Assessment of the role of *Trichomonas tenax* in the etiopathogenesis of human periodontitis: a systematic review. PlosONE. 2019 Dec 17;14(12):e0226266.

Concernant l'impact d'*E. gingivalis* dans la parodontite, seul le postulat « Association d'un microorganisme avec une maladie (ici la parodontite) » a été validé dans la littérature même si le type de biofilm prélevé n'est pas toujours indiqué (biofilm sous ou supra-gingival) et montre que l'amibe est plus fréquemment identifiée chez les patients avec parodontite que ceux avec un parodonte sain. A ce jour, aucune étude n'a évalué ni les facteurs de virulence de cette amibe (production d'enzymes), ni la capacité de ce micro-organisme à déclencher une réponse immunitaire ou une destruction tissulaire parodontale dans un modèle animal. Avant d'évaluer les potentiels facteurs de virulence de l'amibe, nous avons entrepris une étude clinique afin d'évaluer les facteurs parodontaux associés à la présence d'*E. gingivalis* mais aussi de *T. tenax* issus du biofilm sous-gingival détectés par microscopie à contraste de phase. Les échantillons prélevés positifs à ces deux protozoaires seront utilisés dans un second temps pour la mise au point d'amorces afin de les identifier par PCR.

Evaluation de la présence de protozoaires dans le biofilm sous-gingival à l'aide d'un microscope à contraste de phase au niveau des sites sains et malades de patients avec une parodontite et de sites sains de patients contrôles : postulat de Koch revisité par Socransky N°1.

Une première étude a été montée dans le cadre d'un SIR (Stage Initiation Recherche) avec 2 étudiants en Odontologie (PH. Lec et B. Kabongo). Du biofilm sous-gingival a été prélevé, après élimination de la plaque supra-gingivale, dans au minimum deux poches parodontales ≥ 5 mm et un site sain, chez 50 patients atteints d'une parodontite. Les genres *Trichomonas* et *Entamoeba* ont été recherché à l'aide d'un microscope à contraste de phase (grossissement X100). Sur les 145 échantillons examinés, 17 étaient positifs au genre *Trichomonas*, et 38 au genre *Entamoeba*. Certains indices cliniques étaient corrélés avec la présence de *Trichomonas* : mobilité dentaire, plaque supra-gingivale importante, et perte d'attache clinique sévère, avec une prédominance de détection chez l'homme de 50 ans. Seuls les résultats d'évaluation de *Trichomonas* avec les indices parodontaux ont été retenus car le genre *Entamoeba* présentant des similitudes phénotypiques avec certaines cellules de l'immunité telles que les macrophages n'a pas été évalué pour des problèmes d'absence de spécificité.

En conclusion, ce travail a montré la présence de *T. tenax* dans le biofilm sous-gingival de poches parodontales et une corrélation de ce protozoaire avec la mobilité dentaire, une quantité importante de plaque supra-gingivale et une perte d'attache clinique sévère.

Ce travail a donné lieu à une publication :

Bisson C., Lec PH., Blique M., Thilly N., Machouart M. Presence of Trichomonads in subgingival biofilm of patients with periodontitis: preliminary results. Parasitol. Res. 2018;117(12):3767-3774.

Création de sondes PCR pour l'identification d'*Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax* : technique TaqMan au laboratoire SIMPA.

La nécessité d'identifier *E. gingivalis* et *T. tenax* par une technique de biologie moléculaire étant incontournable, nous avons entrepris de mettre au point des sondes spécifiques à ces deux protozoaires par la technique TaqMan avec l'équipe du Pr. MACHOUART, au laboratoire SIMPA.

Les échantillons dans lesquels les parasites ont été détectés au microscope à contraste de phase dans l'étude préliminaire précédente ont servi de contrôles pour valider les nouvelles amorces de PCR créées en technique TaqMan, tant pour *E. gingivalis* que *T. tenax*. Après extraction de l'ADN, les amorces et les sondes dessinées pour identifier *E. gingivalis* ont été validées par comparaison avec les amorces de deux PCR traditionnelles différentes [Kikuta et Coll. (1996) et Bonner et Coll. (2012)], et avec une PCR en temps réelle utilisant la technique du SYBR Green [Trim et Coll. (2011)]. Au cours de l'analyse des résultats, il a été détecté deux sous-types d'*E. gingivalis*, Subtype 1 (ST1) et le variant ST2 kamaktlii qui a nécessité de recréer d'une autre sonde TaqMan spécifique de ce 2^{ème} sous-type et l'utilisation d'autres amorces après analyse bioinformatique. Ainsi, le choix des amorces et des sondes a été faite après alignement des séquences choisies avec celles de l'ADNr SSU de 30 espèces d'*Entamoeba* disponibles sur le site GenBank à l'aide du programme d'alignement des séquence multiple CLUSTAL Omega: 5 *E. gingivalis* ST1 ; 7 *E. gingivalis* ST2, 1 *E. moshkovskii*, 4 *E. histolytica*, 1 *E. dispar*, et 8 *E. polecki*. Seules les séquences les plus représentatives après contrôle des similarités ont été conservées. La spécificité des sondes ou des amorces a été affinée grâce à un 2^{ème} alignement réalisé avec 7 séquences sélectionnées de *E. gingivalis* ST1 D28490, *E. gingivalis* ST2 KX027296; *E. histolytica* AB426549, *E. moshkovskii* AF149906, *E. dispar* Z49256, *E. coli* AB444953, *E. polecki* AF149913.

Ainsi, deux amorces ont été dessinées pour amplifier un amplicon de 153 pb de l'ADNr SSU d'*E. gingivalis* et deux sondes TaqMan ont été choisies pour être respectivement spécifiques de ST1 et ST2. La spécificité bio-informatique des amorces et des sondes a été contrôlée avec une recherche systématique des séquences correspondantes à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local basique des nucléotides (BLAST : <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

En conclusion, ce travail a permis la mise au point au laboratoire SIMPA d'amorces TaqMan pour les amibes *E. gingivalis* ST1 et ST2 (variant Kamaktlii), et pour *T. tenax*.

Ce travail a donné lieu à une publication :

Zaffino M., Dubar M., Bisson C., Machouart M. Development of a new TaqMan PCR assay for the detection of both *Entamoeba gingivalis* genotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2019 Dec;95(4):114886.

L'écriture de la méthodologie PCR concernant *T. tenax* est en cours.

La seule présence d'un microorganisme en quantité plus importante dans une poche parodontale ne permet pas de conclure à un rôle pathogénique. La cicatrisation du site malade après traitement doit s'accompagner d'une diminution voire une disparition de ce microorganisme. Afin d'évaluer cet aspect, une étude de l'impact du surfaçage/débridement sur la présence des protozoaires dans les poches parodontales de patients atteints d'une parodontite : postulat de Koch revisité par Socransky N°2.

L'évaluation de l'impact du surfaçage/débridement sur la présence des protozoaires et des bactéries associées a été réalisée sur les échantillons de l'étude TREM-1 soluble pour laquelle une collection d'échantillon avait été demandée (collection d'échantillon autorisée par le Ministère de la Recherche, N° DC-2016-2623). Des prélèvements du microbiote sous-gingival avant et après surfaçage/débridement ont été réalisés au niveau de deux sites pathologiques (poche ≥ 5 mm) et un site sain de 30 patients avec une parodontite et au niveau d'un site sain de 30 patients contrôles. Après l'extraction de l'ADN, un triplex permettant la détection simultanée des trois protozoaires recherchés (l'amibe ST1, ST2 et *T. tenax*) a été mise au point en PCR quantitative par la technique TaqMan. Les analyses ont montré que ST1 était détecté dans 70% des sites pathologiques, le variant ST2 dans 18,3% et *T. tenax* dans 33,3%. Seuls 10% des sites sains des patients avec parodontite présentaient ST1, 3,3% ST2 et 6,6% *T. tenax*. Concernant les contrôles, seul ST1 a été identifié chez un patient. Après analyse bivariée, l'amibe ST1 était corrélée significativement avec l'indice gingival, le niveau d'attache clinique ($p \leq 0,03$) et la charge bactérienne totale ($p = 0,02$). Le variant ST2 n'est associé à aucun indice clinique ni aucune bactérie, seule une identification statistiquement plus fréquente dans les poches de 5-6mm que dans les poches ≥ 7 mm a été mise en évidence ($p = 0,03$). En revanche, ST1 et ST2 sont très rarement co-détectés dans un même site (1 site sur les 120 analysés), probablement du fait de compétition métabolique comme décrite pour deux espèces de parasite proches de la malaria dans une étude *in vivo* (Wale et Coll. 2017). *T. tenax* est le seul parasite présentant une association significative avec certains pathogènes clés de la parodontite tels que *P. gingivalis*, *T. denticola*, *E. nodatum* ($p \leq 0,02$). Ces co-détectations ne sont pas très surprenantes car tous ces microorganismes se multiplient dans un environnement pauvre en oxygène. L'analyse du microbiote avant et après traitement n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration de la profondeur de poche liée à l'absence/présence des parasites. En revanche, après le surfaçage/débridement, seule la détection de *T. tenax* a significativement diminuée dans les sites pathologiques ($p=0,004$).

En conclusion, cette étude a détecté majoritairement l'ensemble des protozoaires dans les sites avec poche parodontale des malades et épisodiquement dans les sites sains (93,3% versus 3,3%) des patients avec une parodontite. *T. tenax* a été co-détecté avec des parodontopathogènes majeurs. Cependant, la présence/absence ou la diminution des protozoaires n'a pas été corrélée avec une amélioration (diminution de profondeur de poche) des sites malades.

Ce travail a donné lieu à une publication :

Dubar M., Zaffino M., Remen T., Thilly N, Cunat L., Machouart M, Bisson C. Protozoans in subgingival biofilm: associated factors and impact of scaling and root planing treatment. *J Oral Microbiol.*2019, 25 ;12(1) :1693222.

Ces différents travaux ont permis d'apporter des éléments nouveaux tant :

-sur le plan immunitaire par la détection d'un nouveau récepteur TREM-1 dont la forme soluble est retrouvée dans le fluide crévulaire et de la modulation de sa concentration en fonction du contexte clinique, de certaines bactéries pathogènes et du traitement ; ainsi que l'action d'un agoniste de ce récepteur, la molécule LR12, sur la diminution de la production de certaines cytokines par des monocytes dans un modèle *in vitro*. Cette molécule pourrait être un potentiel adjuvant thérapeutique du traitement des parodontites.

-sur le plan microbiologique par l'identification de nouveaux microorganismes dans le biofilm sous-gingival des sites avec parodontite (i) du genre bactérien, *Desulfovibrio spp.*, dans le biofilm sous-gingival et de sa capacité à produire certains facteurs de virulence ; et (ii) trois protozoaires (deux amibes appartenant au genre *Entamoeba* (deux variants : *E. gingivalis* ST1 et ST2) et un flagellé : *Trichomonas tenax*) dont l'absence/présence et la diminution après traitement initial ne sont pas corrélées avec une diminution de la profondeur de poches parodontales.

L'ensemble de ces travaux ont mis en lumière de nouveaux acteurs potentiellement impliqués dans l'étiopathogénie des maladies parodontales. De nouveaux concepts restent à explorer notamment celui des coopérations bactériennes-protozoaires qui pourraient modifier notre approche thérapeutique uniquement focalisée à ce jour sur l'élimination des pathogènes bactériens.

3. Le projet de recherche et perspectives

Les connaissances actuelles de l'étiopathogénie des maladies parodontales ne permettent pas de comprendre l'évolution après traitement de la parodontite de certains de nos patients. Notre compréhension de l'interface microbiote-immunité reste incomplète, à tel point que certains auteurs posent la question : « Doit-on traiter les parodontites comme une infection ou comme une maladie inflammatoire ? ». La confirmation de la présence de protozoaires au sein du biofilm sous-gingival par PCR apporte un élément nouveau à explorer tant d'un point de vue immunitaire que microbiologique. Les deux protozoaires détectés dans le biofilm, l'amibe *E. gingivalis* et le flagellé *T. tenax*, sont très fréquemment identifiés dans les poches parodontales des patients (88,3% et 33,3% respectivement), et certains auteurs ont observé quelques facteurs de virulence et capacité à induire une réponse immunitaire. Ainsi ces cellules eucaryotes peuvent potentiellement directement ou indirectement participer non seulement aux dérégulations de la réponse immunitaire de l'hôte mais aussi jouer un rôle dans la dysbiose du microbiote observée chez nos malades par le biais de coopérations métaboliques et d'adhésion avec les bactéries présentes dans le biofilm.

Les précédentes études sur le microbiote réalisées dans le laboratoire SIMPA (i) ont montré la présence de protozoaires dans le biofilm sous-gingival des poches parodontales de patients atteints de parodontite à l'aide d'un microscope à contraste de phase; (ii) ont identifié une nouvelle espèce d'amibe, *E. gingivalis* variant kamaktlii (ST2) et ont confirmé la présence de ces deux amibes (ST1 et ST2), ainsi que le flagellé *T. tenax* dans les poches parodontales de patients par qPCR ; (iii) ont co-détecté la présence de *T. tenax* avec les bactéries du complexe rouge laissant subodorer une potentielle coopération métabolique ; et (iv) ont associé la présence d'*E. gingivalis* ST1 avec certains indices cliniques parodontaux. **L'ensemble des travaux précédents nous ont donné une expertise** (i) en **immunologie** (analyse de la réponse immuno-inflammatoire), (ii) en **microbiologie** (culture sur milieu gélosé/milieu liquide, technique de biologie moléculaire par PCR classique ou qPCR), et (iii) dans **l'étude de l'interface de ces deux domaines**, par une expertise des modèles expérimentaux (modèles cellulaires, lignée continue ou primaire) et leur analyse [Test ELISA, cytométrie de flux, microscopie (optique à contraste de phase, électronique à balayage et à transmission, confocale)].

L'ensemble de ces expertises et le plateau technique du laboratoire SIMPA nous permettra d'aborder les travaux de notre projet recherche selon les thématiques développées ci-dessous.

Afin de mieux comprendre l'implication potentielle de ces protozoaires dans la parodontite, plusieurs axes de recherche ont été mis en place : étude de critères selon les postulats de Koch revisités par Socransky (1992) :

- **Postulat 1 « Association »** : les agents pathogènes étiologiques les plus probables sont retrouvés en plus grande quantité dans une majorité de sites atteints et absents ou présents en faible quantité dans les sites sains.
- **Postulat 2 « Elimination »** : l'éradication de l'agent étiologique suspecté s'accompagne d'une rémission des signes cliniques.
- **Postulat 3 « Réponse immunitaire de l'hôte »** : la réponse cellulaire ou humorale de l'hôte à l'agent étiologique suspecté doit être augmentée ou diminuée.
- **Postulat 4 « Facteur de virulence »** : l'agent étiologique suspecté doit posséder une capacité à détruire les tissus.
- **Postulat 5 « Pathogénicité dans un modèle animal »** : l'agent étiologique suspecté doit pouvoir recréer la lésion sur un modèle animal.

Afin de mieux comprendre l'implication potentielle de ces protozoaires dans la parodontite, plusieurs axes de recherche seront mis en place. Ainsi le projet est organisé selon deux axes principaux :

- **(i) Evaluation de la prévalence des protozoaires dans le biofilm sous-gingival** de patients atteints de parodontite, leur co-détection avec différentes bactéries dont les parodontopathogènes clés, et les paramètres cliniques du contexte parodontal dans lequel ces protozoaires sont identifiés. La fréquence de détection des bactéries mais aussi des différents protozoaires en fonction du niveau de stress et d'anxiété des patients malades sera recherchée afin d'évaluer une potentielle modulation de la composition du microbiote en fonction de facteurs psychosociaux. Le stress dont l'impact sur les indices parodontaux et la réponse immunitaire est étudié depuis quelques années, aurait potentiellement un effet modulateur de la composition du microbiote buccale, à l'instar de ce qui est observé pour le microbiote intestinal.
= Une Etude clinique multicentrique incluant une cohorte de 230 patients a déjà été montée avec l'aide de la DRI (Direction de la Recherche et Investigation Clinique) et de la PARC (Plate d'Aide à la Recherche Clinique) du CHU de Nancy, puis a été inscrite au clinicaltrials.com sous le numéro NCT03240666. De plus, une demande de collection sur les futurs échantillons collectés a été acceptée par le Ministère de la Recherche, N° DC 2016-2820.
- **(ii) Evaluation de facteurs de virulence directs ou indirects des protozoaires. Pour ce faire, plusieurs aspects seront étudiés :**
 - **(i) Evaluation des interactions avec les pathogènes majeurs :** étudier les capacités de *P. gingivalis* à s'internaliser dans *E. gingivalis* et/ou *T. tenax* et de survivre dans le cytoplasme de ce(s) parasite(s) dans un modèle *in vitro*.
 - **(ii) Evaluation des capacités d'adhésion et d'internalisation de certaines bactéries,** dont les pathogènes clés, sur/dans les protozoaires dans un modèle *in vitro*.
 - **(iii) Evaluation des capacités invasives de ces deux parasites :** par voie hématogène et par voie tissulaire (colonisation du tissu gingival) = Etude clinique (case reports).
 - **(iv) Evaluation des inhibitions ou coopérations de l'adhésion des protozoaires** sur des cellules épithéliales dans un modèle *in vitro*.
 - **(v) Etude de la capacité des parasites à stimuler la production de cytokines** par des cellules de l'immunité et/ou cellules résidentes du parodonte = Etude *in vitro*.

3.1. Evaluation de la prévalence des protozoaires dans le biofilm sous-gingival : projet à court terme

La cohorte de 230 patients atteints de parodontite est en cours d'inclusion au niveau de différents CHU odontologie :

- CHU de Nice, Pôle odontologie, Hôpital Saint Roch, Département de parodontologie
- CHU de Lille, Service d'Odontologie de Caumartin, Département de parodontologie
- CHU de Toulouse, Service d'Odontologie de Rangueil, Département de parodontologie
- CHU de Nancy, Service Heydenreich, Département de parodontologie
- Mais aussi dans deux cabinets de parodontistes exclusifs libéraux sur Nancy.

Ce recrutement multicentrique permettra d'évaluer la présence de protozoaires sur l'ensemble du territoire français. Il permettra de confirmer la réelle prévalence des protozoaires dans le biofilm sous-

gingival de patients atteints de parodontite chronique modérée à sévère (selon la classification d'Armitage, 1999, équivalent au stade 3 et 4, Grade B et C de l'actuelle classification de Chicago, 2017).

Cette étude clinique permettra aussi de confirmer les observations de l'étude préliminaire réalisée sur 30 patients présentant une parodontite équivalente soit :

- Préciser le contexte parodontal dans lequel les protozoaires sont identifiés : corrélation de ces micro-organismes en fonction des différents indices cliniques usuels tels que l'indice de plaque et l'indice gingival, la profondeur de poche et la perte d'attache clinique, ainsi que le BoP (saignement au sondage) et la mobilité dentaire.
- Évaluer toutes les co-localisations des protozoaires entre eux, des protozoaires avec différentes bactéries parodontales dont certains pathogènes clés.
- Rechercher une corrélation potentielle entre la présence de ces différents micro-organismes et le niveau de sévérité parodontale des sites dans lesquels ils ont été identifiés.
- Déterminer la fréquence de détection des bactéries mais aussi des différents protozoaires en fonction du niveau de stress et d'anxiété des patients malades afin d'évaluer une potentielle modulation de la composition du microbiote en fonction de facteurs psychosociaux.

Une étude préliminaire sur 30 patients a montré la variation de détection de certaines bactéries du microbiote buccal en fonction du degré de stress et d'anxiété du patient. Cette cohorte de 230 patients permettra d'obtenir des sous-groupes selon le niveau de stress et d'anxiété des patients inclus suffisamment importants pour effectuer des analyses statistiques plus solides, et confirmer les résultats observés dans l'étude 30 patients.

- Evaluer les relations du niveau de stress-anxiété et de la sévérité de l'atteinte parodontale. La cohorte importante de patients permettra de constituer un groupe de patients suffisamment important qui présentent non seulement des dégradations parodontales sévères mais aussi des niveaux de stress et/ou d'anxiété majeurs afin de pouvoir comparer les données de ces différents groupes et obtenir un résultat statistique puissant.
- Enfin, une recherche du réservoir potentiel inconnu à ce jour d'*E. gingivalis* et de *T. tenax* à l'aide d'un questionnaire évaluant l'eau de boisson utilisée par les patients prélevés (une étude a identifié des amibes dans l'eau de piscines mexicaines), la présence d'un animal de compagnie (une étude a montré la présence d'amibe et du flagellé dans la gueule de chiens), et enfin de connaître si le patient a voyagé dans des pays chauds, de niveau sanitaire inférieur à celui des pays industrialisés, où il aurait pu être contaminé notamment par l'ingestion d'eau locale.

Certains auteurs ont montré la présence de tous ces microorganismes dans la maladie parodontale mais jamais aucune étude n'a recherché d'éventuelles corrélations entre les différents composants du microbiote oral et les indices caractérisant l'atteinte parodontale. De plus, il est possible qu'ils développent des coopérations métaboliques leur permettant de survivre voire de favoriser les facteurs de virulence des uns et des autres et ainsi favoriser la destruction des tissus parodontaux.

3.2. Evaluation de facteurs de virulence directs ou indirects des protozoaires : projet à moyen terme

La co-détection mise en évidence dans l'étude préliminaire de 30 patients a ouvert de nouvelles voies de recherche telle que la potentielle coopération entre ces micro-organismes et les bactéries qui permettraient de mieux comprendre l'étiopathogénie des parodontites.

Internalisation de pathogènes clés dans les protozoaires (facteur de virulence indirect)

Cette hypothèse repose sur des données *in vitro* qui a montré la capacité de *P. gingivalis* et *P. intermedia* de s'internaliser dans une amibe autre que *Entamoeba gingivalis*, *Acanthamoeba castellanii*, dans laquelle ils survivent et de se multiplier (Wagner et Coll. 2006). La capacité d'internalisation et de multiplication de certains parodontopathogènes dans le cytoplasme de l'amibe serait particulièrement intéressante et lui conférerait une capacité indirecte de pathogénicité. En effet, ces protozoaires protégeraient les bactéries pathogènes non seulement de certaines cellules de l'immunité, empêchant notamment l'opsonisation des facteurs C3b du complément et des immunoglobulines G et donc limitant la phagocytose et la destruction par les polynucléaires neutrophiles de ces bactéries ; mais aussi de l'action des antibiotiques tels que la pénicilline. De plus, l'internalisation de *P. intermedia* et de *P. gingivalis* dans les protozoaires sous-tend que ces bactéries ont tout d'abord adhéré à la surface de ces parasites. Cette capacité d'accrocher les bactéries au niveau de leur membrane conférerait à l'amibe un rôle dans le développement du biofilm.

L'évaluation de cette capacité pourra se faire soit à l'aide d'un modèle *in vitro* de culture de l'amibe *E. gingivalis* ATCC® 30927™ soit à l'aide d'amibes isolées à partir de biofilm collecté chez des patients atteints de parodontite. Ces cellules seront entretenues dans un milieu de culture permettant leur survie selon le protocole de Bao et Coll. (2020). Des essais seront tout d'abord envisagés avec l'une des bactéries clés de la parodontite soit *P. gingivalis* qui sera incubé avec les protozoaires durant 45 à 135 minutes à différent MOI (Multiplicity of infection) de 1:10, 1:100 (protozoaires: bactéries) selon le protocole de Wagner et Coll. (2006). L'internalisation potentielle de la bactérie dans le cytoplasme pourra être mise en évidence soit par microscopie confocale (après marquage par un fluorophore de *P. gingivalis*) et/ou par microscopie électronique à transmission, mais aussi par un comptage des CFU (Colonie Formant Unité) de *P. gingivalis* après incubation des protozoaires avec de l'amoxicilline éliminant toutes les bactéries extra-cellulaires restées dans le milieu de culture et après lyse des protozoaires (lyse osmotique ou cycles congélation/étuve puis sonication 20 minutes).

Un protocole identique pourra être réalisé avec *T. tenax*. En effet, une co-détection significative du flagellé avec notamment *P. gingivalis* a été mise en évidence dans notre étude préliminaire de 30 patients (Dubar et Coll. 2019). Ce protozoaire pourrait de même provenir soit d'une souche ATCC® 30207™ soit isolé à partir d'un biofilm de patients. Les protozoaires seront cultivés dans le milieu d'entretien décrit par Ribeiro et Coll. (2015). Les durées de contamination et les MOI seront similaires à celles exposées dans le protocole concernant l'internalisation de lactobacilles par *T. vaginalis* (Rendon-Maldonado et Coll. 1998).

Evaluation de la capacité des protozoaires à migrer dans les tissus et par voie sanguine = capacité de colonisation (facteurs de virulence directs)

Tout microorganisme doit se fixer à des surfaces moléculaires ou cellulaires procaryotes ou eucaryotes afin de se multiplier et coloniser son hôte et développer son potentiel pathogène. La capacité d'un microorganisme à traverser le « mur » épithélial gingival, 1^{ère} barrière mécanique protectrice des tissus parodontaux profonds, est l'un des facteurs concourant à montrer sa pathogénicité.

Afin d'évaluer la capacité d'*Entamoeba gingivalis* et de *Trichomonas tenax* à coloniser la gencive des patients atteints de parodontite, une exérèse de gencive bordant des sites avec une poche parodontales de dents non conservables sera réalisée et analysée par deux techniques :

- Une partie des exérèses gingivales évaluera la présence des protozoaires par PCR. Après incubation dans un milieu contenant du métronidazole pendant 1heure afin d'éliminer les bactéries adhérentes à l'épithélium de poche, l'ADN tissulaire extrait sera analysé pour rechercher les 3 protozoaires (Amibe *ST1*, *ST2* et *T. tenax*).

- L'autre partie des exérèses recherchera ces protozoaires sur des coupes histologiques, après coloration par l'acide périodique, réaction de Schiff (coloration PAS).
Au niveau des coupes présentant les protozoaires, l'ADN sera récupéré et analysé pour confirmer l'identité du microorganisme observé.

Au niveau de chaque site dont l'épithélium de poche est excisé, le biofilm sous-gingival sera prélevé avant tout acte chirurgical et analysé pour rechercher les trois protozoaires.

== Cette analyse se fera en collaboration avec le département d'anatomo-pathologie du CHU de Nancy, sous la direction du Pr. Guillaume GAUCHOTTE.

Un autre facteur de colonisation sera évalué, soit la capacité des protozoaires à migrer par voie hématogène. Certains articles ont identifié ces protozoaires dans des localisations extra-buccales au cours principalement d'infection respiratoire pour *E. gingivalis* et *T. tenax*, ou d'infection génitale pour *T. tenax*. La majorité des auteurs concluent à la contamination soit par inhalation de l'appareil respiratoire depuis la cavité buccale, soit par une transmission manu portée ou par voie orale pour les localisations au niveau du tractus génital de ces microorganismes, mais sans aucun contrôle de leur présence buccale chez les patients prélevés. La plupart des études identifiant ces protozoaires dans des localisations extra-buccales sont des cases reports, sauf une étude évaluant les crachats de patients et une autre analysant des écouvillons vaginaux, toutes deux identifiant *T. tenax* par PCR. Les cases reports évaluant notamment *T. tenax* rapportent des cas cliniques extrêmes de patients qui finissent par décéder pour la majorité d'entre eux.

Le but du projet est de rechercher la présence de ces protozoaires à l'aide d'une série de case report :

- Chez des patients atteints de parodontite, dans le biofilm sous-gingival des sites avec une poche parodontale et dans un prélèvement sanguin.
- Chez des patients présentant une infection pulmonaire (notamment pneumonie à *Pneumocystis*, emphysème pulmonaire, syndrome de détresse respiratoire aiguë...) ou cancer pulmonaire, dans les crachats pulmonaires, dans la cavité buccale et dans un prélèvement sanguin.
- Chez des patientes présentant une infection vaginale, dans les prélèvements vaginaux, des échantillons buccaux et dans un prélèvement sanguin.

== Cette partie du projet nécessitera la mise en place de collaborations avec les services de gynécologie de Nancy, dirigé par le Pr. WERYHA Georges, et de pneumologie, dirigé par le Pr. CHENUÉL.

Evaluation de l'adhésion des protozoaires à différentes cellules du parodonte et impact de certaines bactéries sur ce mécanisme (facteur de virulence direct)

La détection potentielle de ces protozoaires dans le tissu gingival excisé nécessite au préalable l'adhérence de ces derniers aux cellules épithéliales. Le mode d'adhésion d'*E. gingivalis* et *T. tenax* sera étudié dans un modèle utilisant notamment d'une lignée des cellules épithéliales (cellules KB), et/ou avec les cellules MRC5 (lignée primaire de cellules fibroblastiques pulmonaires).

Aucune étude à ce jour n'a évalué le mécanisme d'adhésion tant d'*E. gingivalis* que de *T. tenax* sur des cellules du parodonte. Les relations phylogénétiques parmi les séquences de gène ARNr SSU des espèces *Entamoeba* suggèrent que *E. dispar*, *E. nuttalli* et *E. moshkovskii* sont étroitement liés à *E. histolytica*, ce qui n'est pas le cas d'autres amibes telles que *E. invadens*, *E. coli* et *E. gingivalis* (Das et Ganguly, 2014). Malgré les écarts de génome entre les amibes du genre *Entamoeba*, le système d'adhésion décrit pour *E.*

histolytica, amibe intestinale responsable de dysenteries et diarrhées, servira de base de travail. Diverses molécules utilisées dans le modèle *E. histolytica* seront testées pour cibler des sites d'adhésion potentiels d'*E. gingivalis*. Ainsi des molécules telles que le galactose et N-acétylgalactosamine seront utilisées afin de saturer notamment les adhésines de type lectines et ainsi d'inhiber l'adhérence des trophozoïtes aux glycoprotéines des cellules épithéliales, comme décrit par Radvin et Guerrant pour *E. histolytica* (Radvin et Guerrant, 1981). L'évaluation de l'adhésion des amibes sera réalisée par comptage en microscopie optique et microscopie électronique à balayage.

Au contraire des genres *E. histolytica* et *E. gingivalis*, *T. tenax* et *T. vaginalis* présente une identité génétique similaire, *T. vaginalis* ayant des niveaux plus élevés de l'expression des gènes par comparaison à *T. tenax* (Kucknoor et Coll. 2009). Les auteurs de cet article suggèrent même dans leur conclusion que *T. tenax* pourrait être un variant de *T. vaginalis*. Concernant *T. tenax*, une étude a montré la capacité d'adhésion sur un tapis de cellules épithéliales de lignée continue (HeLa et MDCK) et de cytotoxicité de ces flagellés (Ribeiro et Coll. 2015). Des études ont montré l'adhésion de *T. vaginalis* aux cellules épithéliales cervicales par la liaison du lipophosphoglycane (LPG) du flagellé avec la galectine-1 exprimée par les cellules (Okumura et Coll. 2008). Un protocole similaire pourra être mis en place pour évaluer l'adhésion de *T. tenax* à des cellules épithéliales.

Certaines études décrivent le rôle joué par certains lactobacilles dans la colonisation d'*E. histolytica* et *T. vaginalis* sur les cellules épithéliales intestinales et cervicovaginales respectivement. En effet, les lactobacilles contribuent à la diminution de l'adhésion de ces protozoaires, protégeant ainsi de toute colonisation et cytotoxicité le tractus intestinal et génital (Variyam et Coll. 1996, Phukan et Coll. 2018).

Il est possible que de telles compétitions d'adhérence existent dans la cavité buccale entre *E. gingivalis* et *T. tenax* avec des bactéries commensales telles que certains lactobacilles ou autres colonisateurs primaires, contribuant ainsi à limiter leur adhésion sur les cellules épithéliales buccales. Des compétitions similaires sont déjà décrites entre certaines espèces bactériennes : certains sites d'adhésion peuvent être utilisés par des espèces bactériennes très différentes. Ainsi *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis* et *S. salivarius* inhibent l'adhésion d'*A. actinomycetemcomitans* sur les cellules épithéliales (Teughels et Coll. 2007). Des protocoles similaires pourront être mis en place pour *E. gingivalis* et *T. tenax* : en utilisant des cellules épithéliales buccales (Cellules KB), de lactobacillus casei préalablement marquée par un fluorophore (Cell tracker blue, Invitrogen). Le tapis cellulaire épithélial sera incubé tout d'abord avec les bactéries marquées puis avec l'un ou l'autre des protozoaires eux-mêmes marqués (cell tracker red, Invitrogen). Le nombre des protozoaires adhérents sera évalué soit par microscopie confocale soit par cytométrie de flux, (Phukan et Coll. 2018).

3.3. Evaluation de la capacité de parasites à interagir avec certaines cellules de l'immunité innée (facteur de virulence direct) : projet à long terme.

La réaction inflammatoire est la première étape de la maladie parodontale qui implique la participation de cellules de l'immunité telles que les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PNN) ainsi que la production de nombreuses molécules participant à cette réponse dont les principales sont les cytokines, les prostaglandines, les facteurs du complément. Toutes ces réactions permettront d'activer l'immunité innée afin de protéger les tissus du parodonte de toute invasion par des microorganismes. Les observations au microscope à contraste de phase de biofilms supra et/ou sous-gingivaux montrent souvent la présence de nombreux polynucléaires neutrophiles et basophiles actifs à proximité des

protozoaires. Malheureusement, ces protozoaires sont entourés par de nombreuses bactéries ce qui ne permet pas de conclure à une activation exclusive de ces cellules immunitaires par *E. gingivalis* et/ou *T. tenax*. Dans un modèle cellulaire *in vitro*, une étude récente a montré la capacité d'*E. gingivalis* à stimuler la production d'IL-1 β , mais aussi de la chémokine IL-8 par des cellules épithéliales et des fibroblastes en culture primaire (analyse des ARNm). De même, ces auteurs montrent qu'*E. gingivalis* induit une augmentation de la production de la métalloprotéinase 3 et 13 (Bao et Coll. 2020). D'autres auteurs ont exploré les interactions d'*E. histolytica* avec les PNN, principales cellules de l'immunité innée, et ont montré la capacité de l'amibe à : (i) induire la production d'enzyme protéolytiques (myéloperoxydase), (ii) générer des dérivés réactifs de l'oxygène et (iii) d'induire la production de NETs (Neutrophils Extracellular Trap) (Ventura-Juarez et Coll. 2016). Toutes ces réactions ont pour but de neutraliser et/ou détruire le parasite par des mécanismes oxydatifs et/ou non-oxydatifs.

A l'instar des articles étudiant *E. histolytica*, les capacités d'*E. gingivalis* à stimuler les PNN seront évaluées à l'aide d'un modèle *in vitro*. Ces cellules immunitaires seront extraites du sang total de donneur par sélection négative selon le protocole de Dubar et Coll. en 2018. Différents temps de contamination et MOI (ratio PNN : *E. gingivalis*) seront testés et la production cytokinique potentielle sera évaluée par ELISA, et par RT-qPCR. De même, la production hypothétique de NETs des PNN après incubation avec l'amibe sera évaluée par microscopie électronique à balayage et par immunofluorescence, d'après le protocole de Ventura-Juarez (Ventura-Juarez et Coll. 2016).

Enfin, il sera intéressant d'évaluer la production TREM-1 soluble des PNN exposés à l'amibe et de la comparer à celle obtenue avec *P. gingivalis*. La stimulation de la production de TREM-1 par le LPS de *P. gingivalis* passe par l'activation des seuls récepteurs TLR-1, -2, -4 et -5 sur les 9 TLR testés (Dubar et Coll. 2018). Selon Maldonado-Bernal, la réponse immunitaire innée au lipopeptidophosphoglycan d'*E. histolytica* semble passer par la stimulation de TLR-2 et -4 (Maldonado-Bernal et Coll. 2005). La surproduction des cytokines IL-1 β et IL-8 induite par *E. gingivalis* décrite par l'équipe de Bao laisse subodorer que cette amibe est potentiellement capable d'induire une synthèse de TREM-1 soluble par l'activation de récepteurs inconnus à ce jour, possiblement les mêmes TLRs que ceux observés pour *E. histolytica*. Il sera exploré les voies de signalisation de TREM-1 éventuellement stimulées par *E. gingivalis* au niveau de PNN et monocytes, ainsi que les PRR (Pattern Recognition Receptors) de l'amibe impliqués dans ces interactions.

== Cette partie du projet sera réalisée en collaboration avec la société de biotechnologie INOTREM spécialisée dans l'immunothérapie des syndromes inflammatoires aigus et chroniques. Cette compagnie développe un nouveau concept d'immunomodulation ciblant la voie TREM-1 afin de contrôler les réponses inflammatoires excessives, sous la direction du Dr. Marc DERIVE et Pr. Sébastien GIBOT, chercheur dans le laboratoire INSERM, UMR-S116.

Les maladies parodontales sont des pathologies inflammatoires d'origine infectieuse dans lesquelles les dégradations tissulaires sont la conséquence tant de l'action des microorganismes eux-mêmes que de la dérégulation immunitaire qu'ils induisent. La compréhension du rôle des protozoaires dans les réactions inflammatoires et l'activation des cellules de l'immunité mais aussi leur rôle indirect par protection des parodontopathogènes présumés permettrait la mise en place de traitements plus pertinents pour soigner les patients atteints de parodontite. L'avancée des connaissances en microbiologie rendue possible par les progrès techniques de biologie moléculaire et des analyses bioinformatiques, nous permettent d'envisager de nouvelles interactions microbiologiques jouant un rôle dans l'étiopathogénie de nombreuses maladies dont les maladies parodontales. Ainsi à l'instar de ce qui est subodoré par la littérature actuelle, il ne faut plus raisonner par microorganisme, impliquant soit les bactéries, les virus, les parasites et les champignons/levures séparément mais plutôt par la symbiose de ces différents

microorganismes. En effet, certains auteurs ont montré que *T. vaginalis* avec son symbiote *Mycoplasma hominis* agissent en synergie et (i) sur-régulent la réponse pro-inflammatoire de monocytes humains dans un modèle *in vitro* et (ii) limite voire inhibe la production d'oxyde nitrique (NO) affectant ainsi les capacités de destruction NO-dépendante des phagocytes dans un modèle *in vitro* (Fiori et Coll. 2013).

Les différents volets du projet seront réalisés avec l'aide d'étudiants recrutés dans le cadre d'une thèse et de stage M2 et avec le soutien financier du laboratoire, de la CUGN, l'Association CONCEPT PARODONTAL et de la société INOTREM, dans le laboratoire SIMPA et les laboratoires des différents collaborateurs.

3.4. Projets hors thématique

3.4.1. Collaboration

- Investigatrice associée dans l'étude concernant l'évaluation du microbiote oral chez les patients atteints de pemphigoïde cicatricielle. Cette étude est en cours de mise en place dans le CHU de Nice par le Dr. Sophie-Myriam DRIDI, investigatrice principale (financement et promoteur CHU de Nice).

Le pemphigoïde cicatricielle est une dermatose auto-immune chronique rare qui touche le plus souvent plusieurs muqueuses. Il est caractérisé par l'apparition de bulles intra ou sous épithéliales provoquées par l'action d'auto-Ac dirigés contre des constituants des systèmes de jonction interkératinocytaires ou dermo-épidermiques. En phase aiguë, le tableau clinique de cette pathologie est celui d'une gingivite érosive post-bulleuse, algique et hémorragique qui empêche toute prise d'alimentation normale et tout brossage efficace par le patient limitant ainsi la cicatrisation des sites atteints. A ce jour, le traitement de ces lésions est un traitement symptomatique qui se restreint à l'application topique d'anesthésiques locaux ou de corticoïdes couplés avec des antiseptiques/antifongiques. Le microbiote buccal de ces lésions reste inconnu et les antiseptiques utilisés se basent sur une extrapolation des bactéries identifiées dans les maladies parodontales. Une meilleure connaissance des composants du microbiote permettra de cibler plus efficacement les microorganismes de ces lésions par l'action d'un antiseptique adapté.

En tant qu'investigatrice associée : participation au montage du dossier (expertise microbiote et cadrage de l'étude clinique), et identification des protozoaires des futurs échantillons de biofilm au sein de l'EA SIMPA. Des analyses préliminaires de biofilms supra-gingivaux prélevés au niveau de sites atteints de pemphigoïde cicatricielle ont montré la présence de protozoaires. Une partie de l'ADN extrait issus des prélèvements du microbiote des sites gingivaux atteints par cette pathologie sera utilisé pour une identification de protozoaires dans le laboratoire SIMPA.

3.4.2. Autres

- Investigatrice principale d'une étude multicentrique sur les récessions parodontales (CHU de Nancy, promoteur). L'étude « La sévérité des récessions parodontales par patients et facteurs de risque associés en France » concerne les CSERD de Nancy, Nice, Paris, Toulouse et Montpellier.

Etude en cours de réalisation, et en cours d'inscription au clinicaltrials.com.

3.5. Financements

- 2014. Financements de 10 000 euros, Communauté Urbaine du Grand Nancy. Projet préliminaire : « Etude de la présence de protozoaires dans le biofilm sous-gingival de patients atteints de parodontite » sur 50 patients atteints de parodontite, détection par microscope à contraste de phase
- 2014. Financement Société Colgate, 5 000 euros
- 2016. Financements de 30 000 euros, Communauté Urbaine du Grand Nancy. Projet « Etude de la prévalence d'*Entamoeba gingivalis* et de la flore bactérienne associées de patients atteints de parodontite sur 230 patients ». Evaluation des protozoaires par qPCR.

4. Mobilité

Après examen des pièces justificatives, le Professeur Patrick GIRARD, UFR Paris Descartes, Président de la 57^{ème} section du CNU, a validé ma mobilité le 15 avril 2012 (document ci-joint).

Cette activité de recherche a permis d'enrichir mes connaissances :

- En biochimie du médicament, et d'ouvrir mon champ d'expertise dans l'analyse physico-chimique des molécules, dans le présent travail molécules antimicrobiennes, en RMN, IR- TF, spectrométrie de masse et CLHP.
- En analyse du spectre d'action de molécules antibiotiques par la réalisation de concentration minimale inhibitrice en milieu liquide et solide.
- En culture cellulaire et en microscopie (microscope électronique à transmission et confocal).
- En bactériologie : culture, réalisation de Gram et Mc Farland, étude de facteurs de virulence.
- En immunologie : évaluation de sécrétions cytokiniques par test ELISA.

Cette mobilité a été validée :

- Dans le cadre d'une activité de recherche effectuée au sein de l'équipe GEVSM (Groupe des Vecteur Supramoléculaires du Médicaments) dirigée par le Pr. J-B. REGNOUF-DE-VAINS, affiliée au SRSMC (Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes), UMR 7565, CNRS, Nancy Université, UFR des Sciences et Technologies, dirigée par le Pr. Y. FORT, à raison de 3 jours par semaine pendant 4 années successives de 2004 à 2008.
- Cette recherche a été encadrée par le Pr. LOZNIIEWSKI Alain et le Dr. KEDZIEREWICZ Francine.
- Position statutaire du candidat : docteur en chirurgie-dentaire.

De plus, durant 10 mois (Septembre 2017-juin 2018, pendant 2 semaines pleines par mois.), j'ai réalisé une mobilité clinique dans le service d'odontologie ouvert dans le CHU de Poitiers, où j'ai effectué :

- Une activité de soin d'une vacation par semaine en parodontologie,
- Un encadrement des étudiants issus des UFR de Nantes et de Bordeaux qui étaient chargés de prendre en charge :
 - Des patients internes à l'hôpital pour principalement faire une recherche de foyers infectieux (avant tout acte chirurgical des médecins, traitements cancéreux, ...),
 - Des patients externes ayant un contexte médical lourd (patients dialysés sous héparine, anomalie du facteur C1, ...) pour des soins, ou sans contexte médical particulier pour des soins d'omnipratique (la région de Poitiers souffrant d'une pénurie importante de chirurgiens-dentistes).

Cette mobilité m'a permis:

- D'acquérir une expérience clinique dans la prise en charge de patients avec un contexte médical lourd, nécessitant de considérer le bénéfice-risque de l'état bucco-dentaire en fonction des actes chirurgicaux programmés et des médications en cours,
- Mais aussi de prendre en charge des patients présentant une maladie parodontale qui consultent très rarement dans un département de parodontologie « classique » qui reçoit principalement des patients pouvant être pris en charge en ville. Ainsi j'ai pu notamment m'occuper de patients sous immunosuppresseurs suite à une greffe d'organe présentant une hypertrophie gingivale consécutive au traitement.

5. Travaux

5.1. Thèses et mémoires

- **1993 - Thèse d'Etat de Docteur en Chirurgie Dentaire**
« Principes et préceptes de la réalisation de prothèses esthétiques provisoires »
Directeur de thèse : Dr. Luc BABEL
Soutenue en 1993
- **2003 : Mémoire de M2 de l'Université Lorraine (anciennement DEA)**
M2 de Microbiologie, enzymologie & nutrition, direction Pr. Guy BRANLANT
Laboratoire immunologie, sous la direction Pr. FAURE Gilbert.
« Recherche d'impacts immunologiques des bactéries sulfato-réductrices sur le lysozyme et les immunoglobulines G ».
Président de jury : Pr. Guy BRANLANT
Membres du jury : Pr. Bernard DECARIS
Pr. Jean-Luc GAILLARD
Pr. Luc MEJEAN
Pr. Jean-Pierre NICOLAS
Pr. Henri PETITDEMANGE (rapporteur)
Pr. Bernard VITOUX
Dr. Christiane BRANLANT
Dr. Nelly KIEFFER
Mémoire soutenu le 12.07.2003
- **2009 - Thèse de Doctorat d'Université Lorraine (anciennement Thèse de Sciences Odontologiques, Université Henri Poincaré, Nancy 1)**
Thèse de Doctorat sous la co-direction du Pr. Alain LOZNIEWSKI et Dr. Francine KEDZIEREWICZ
GEVSM (Groupe des Vecteur Supramoléculaires du Médicaments)
Faculté de Pharmacie
Rue Albert Lebrun
54000 Nancy
Directeur du laboratoire : Pr. J-B. REGNOUF-DE-VAINS,
Structure affiliée au SRSMC (Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes), UMR 7565, CNRS, Nancy Université, UFR des Sciences et Technologies, sous la direction du Pr. Y. FORT,

« Desulfovibrio spp. dans la maladie parodontales : interactions avec les cellules épithéliales KB et activité de l'amoxicilline libre ou complexée sur ces formes extra et intracellulaires ».

Thèse soutenue le 05.11.2009.

5.2. Publications

5.2.1. Internationales

Année 2020

- DUBAR M., CLERC-URMES I., BAUMANN C., ALAUZET C., **BISSON C.** Relations of psychosocial factors and cortisol with periodontal and bacterial parameters in patients with periodontitis before and after non-surgical treatment". J. Env. Res. & Public Health. 2020 (IF 2.849).
- BAUDET A., VEYNACHTER T., ROUSSEAU H., ANAGNOSTOU F., JEANNE S., ORTI V., THILLY N., CLEMENT C., **BISSON C.** Perception of Gingival Bleeding by People and Healthcare Professionals: A Multicentre Study in an Adult French Population. Inter. J. Env. Res. & Public Health. 2020. 18; 17(16):5982 (IF 2.849)
- DUBAR M., JP. FRIPPIAT, REMEN T., BOUFENZER A., C. ALAUZET, BAUMANN C., GIBOT S., **BISSON C.** Comparison of TREM-1 levels and associated periodontal, bacterial and psychosocial factors before and after periodontal treatment. J. Clin. Periodontol. 2020, 30. (IF : 5.241).
- PANTCHENKO C., **BISSON C.**, GAGNOT G., ORO S., GAULTIER F., DRIDI SM. « Maladies bulleuses auto-immunes à expression gingivale : quel est le rôle du microbiote parodontal ? ». Annales de dermatologie et vénéréologie (IF 0.7).
- T. VEYNACHTER, V. ORTI, E. MOULIS, H. ROUSSEAU, N. THILLY, F. ANAGNOUSTO, S. JEANNE, **C. BISSON.** «Prevalence and associated factors of self-reported gingival bleeding: a multicentre study in France". IJERPH (IF : 2.849).

Année 2019

- DUBAR M., ZAFFINO M., MACHOUART M., **BISSON C.** Protozoans in subgingival biofilm: associated factors and impact of scaling root planing treatment. J. Oral Microbiology. IF: 3.939.
- **C. BISSON**, SM. DRIDI, M. MACHOUART. *Trichomonas tenax*. in human periodontitis: A review of literature. PloSONE. 2019 Dec 17;14(12):e0226266. IF : 2.776
- ZAFFINO M., DUBAR M., **C. BISSON***, M. MACHOUART*. Development of a new TaqMan PCR assay for the detection of both Entamoeba gingivalis genotypes". Diag. Microbiol & infect Dis. *Co-dernier auteur. IF: 2.314.

Année 2018

- **C. BISSON**, P.H. LEC, M. BLIQUE, M. MACHOUART. Presence of trichomonads in subgingival biofilm of patients with periodontitis: preliminary results. Parasitology research. 2018 Dec;117(12):3767-3774. doi: 10.1007/s00436-018-6077-2. IF : 2.067
- DUBAR M, CARRASCO K, GIBOT S, **BISSON C.** Effects of Porphyromonas gingivalis LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes. J Clin Periodontol. 2018 May 19. doi: 10.1111/jcpe.12925. IF: 4.164.

Année 2017

- SOBOCINSKI V, DRIDI SM, **BISSON C**, JEANNE S, GAULTIER F, PROST-SQUARCIONI C, BERNARD P, PASCAL F, LEFEVRE B, WEBER P, ABASQ C, AGBO-GODEAU S, JOLY P, INGEN-HOUSZ-ORO S, DUVERT-LEHEMBRE S. Oral care recommendations for patients with oral autoimmune bullous diseases. Ann Dermatol Venerol. 2017 Mar;144(3):182-190. IF : 1.051

Année 2012

- **BISSON C.**, MASSIN F., LEFÈVRE J.A., THILLY N., MILLER N., GIBOT S. "Increased levels of soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM)-1 in Gingivo Crevicular Fluid from patients with severe periodontitis". J. Clin. Periodontol. Impact factor 3,688.

Année 2010

- **BISSON-BOUTELLIEZ C.**, MASSIN F., DUMAS D., LOZNIIEWSKI A. "Desulfovibrio spp. survive within epithelial KB cells and modulate inflammatory responses." Molecular Oral Microbiology, anciennement Oral Microbiol Immunol. 2010, Jun ; 25 (3) : 226-35. Impact factor: 2, 015.
- **BISSON-BOUTELLIEZ C.**, FONTANAY S., FINANCE F., KEDZIEREWICZ F. «Preparation and physicochemical characterization of amoxicillin-β-cyclodextrin complexes». AAPS Pharma SciTech. 2010 Jun; 11 (2): 574-81. Impact factor: 1, 445.

Année 2003

- MILLER N., PENAUD J., AMBROSINI P., **BOUTELLIEZ C.**, BRIANCON S. Analysis of etiologic factors and periodontal conditions involved with 309 abfractions. J Clin Periodontol. 2003, 30: 828-32. Impact factor: 1,582.

Année 2002

- LOUBINOX J., **BISSON- BOUTELLIEZ C.**, MILLER N., LEFAOU AE. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. Oral Microbiol Immunol. 2002, 17 : 321 -323. Impact factor: 1,242.

Année 2001

- **BISSON- BOUTELLIEZ C.**, MILLER N., DEMARCH D. & BENE MC. CD9 and HLA- DR expression on epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils in periodontopathies. J Clin Periodontol. 2001,28: 650-56. Impact factor: 1,736.

Abstracts publiés dans des revues internationales :

- **BISSON C.**, LEC PH., BLIQUE M., THILLY N., MACHOUART M. "Prevalence of trichomonads in patients with periodontitis" Europerio, Amsterdam. Juin 2018. J. Clin. Periodontol.
- **DUBAR M.**, KARRASCO K., GIBOT S., **BISSON C.** "Effects of *Porphyromonas gingivalis* LPS and LR12 peptide on TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells)-1 expression by monocytes" Europerio, Amsterdam. Juin 2018. J. Clin. *Periodontol.*
- **BISSON C.**, LEC PH., GABONGO B., MACHOUART M. Prevalence of protozoans in patients with periodontitis. Europerio London, Juin 2015. J. Clin. Periodontol.
- **BISSON C** & DRIDI SM. Implication of protozoans in the etiopathogenicity of periodontitis: Myth or reality? Europerio London, Juin 2015. J. Clin. Periodontol.
- **BISSON- BOUTELLIEZ C.**, MASSIN F., DUMAS D., LOZNIIEWSKI A. « Interactions between *Desulfovibrio* sp. and buccal epithelial cells ». J. Clin. Periodontol. 2009. Abstract.
- **BOUTELLIEZ C.**, LOUBINOX J., MILLER N., REICHERT M. Sulphate reducing bacteria in periodontal patients. J Clin Periodontol. 2003. 30 (suppl 4): 21. Abstract.
- **BISSON C.**, REICHERT M., KOHLER C., BENE MC., MILLER N., WEISENBACH M. Counting and characterisation of crevicular cells. J. Clin. Periodontol. 18.06.97. Abstract.

5.2.2.Nationales

Année 2017 :

- « Les protozoaires : agents pathogènes impliqués dans les parodontites ? ». BISSON C. Journal « Clinic ». Janvier 2017.

Année 2016 :

- Halitose : quelles solutions ? BISSON C. Dentoscope. Juillet 2016.
- L'halitose et le conseil à l'officine. BISSON C., BUXERAUD J. Revue actualités pharmaceutiques.

Année 2014 :

- AUBER E., PASSERAT de SILANS P., DRIDI SM, **BISSON C.** Implication des protozoaires dans l'étiopathogénie des parodontites : mythe ou réalité ? Information dentaire. N°41/42, vol. 96, novembre 2014.

Année 2013

- **BISSON C.** « Etiopathogénie et classification de l'halitose ». Alpha Oméga News. France. 157 : 5-7.

Année 2012

- **BISSON C.**, EJEIL AL., DRIDI SM. « L'halitose : prise en charge en omnipratique ». Revue Odontostomatologie, septembre 2012, 41 : 191-197.

Année 2009

- GALLINA S., REYES E., **BISSON-BOUTELLIEZ C.**, MARTRETTE JM., MILLER N., AMBROSINI P. « Ostéointégration et maladies générales. Recommandations cliniques.

Année 2002

- MILLER N., **BOUTELLIEZ C.**, PENAUD J., AMBROSINI P. Mécanismes immunopathologiques dans la maladie parodontale. Encyclopédie Médico-Chirurgicale. 23 : 435- B- 10, 2002, 9p.

Année 2000

- AMBROSINI P., MILLER N., **BISSON-BOUTELLIEZ C.**, PENAUD J. Influence du stress sur le développement des parodontites. Revue d'Odontostomatologie, 2000, 29 : 145-149.

Récapitulatif des publications internationales

Statut	Année	Journal	Impact Factor	Indexation	Rang
Acceptés	2020	Int. J. Environ. Res. Public Health	2.849	Pubmed	Dernier
		Int. J. Environ. Res. Public Health	2.849	PubMed	Dernier
		J Clin Periodontol.	5,241	PubMed	Dernier
		Ann Dermatol Vénérol.	0.7	Pubmed	2
		Int. J. Environ. Res. Public Health	2.849	PubMed	Dernier
	2019	Diag.Microbiol. & Infect.Dis.	2.314	Pubmed	Co-dernier
		PLoS ONE	2.776	Pubmed	1
		J Oral Microbiol	3.939	Pubmed	Dernier
	2018	Parasitol Res	2,558	PubMed	1
		J Clin Periodontol.	4,164	PubMed	Dernier
	2016	Ann Dermatol Venerol	1,51	PubMed	3
	2012	J Clin Periodontol.	3,688	PubMed	1
	2010	Oral Microbiol Immunol	2,015	PubMed	1
		AAPS Pharma SciTech	1,44	PubMed	1
	2003	J Clin Periodontol	1,582	PubMed	Avant-dernier
	2002	Oral Microbiol Immunol	1,242	PubMed	2
	2000	J Clin Periodontol.	1,736	PubMed	1

5.2.3.Ouvrages

Participation à des chapitres d'ouvrages.

Année	Auteurs et titres du chapitre
2017	* BISSON C. , BAYET F., DRIDI SM. « Epidémiologie et étiologie des LIO et des LIR » * BISSON C. , PANTCHENKO C., DRDI SM. « Les facteurs de la cicatrisation postopératoires ». Dans « Lésions intra-osseuses et inter-radiculaires. Ed Espace ID. Collection « Médecine Buccale ».
2010	*AMBROSINI P., PENAUD J., BISSON-BOUTELLIEZ C. , GALLINA S., MILLER N. « Intérêt de la tomographie à faisceau conique en implantologie orale. In « L'imagerie par faisceau conique en odontologie ». Edition Samraud,

Participation à des comités scientifiques et rédaction d'ouvrage :

« Lésions intra-osseuses et inter-radiculaires. Ed Espace ID. Collection « Médecine Buccale ». DRIDI SM. 2017.

5.3. Communications

5.3.1. Internationales

Année	Auteurs et titres des communications orales (CO)	Sociétés scientifiques
2018	DUBAR M., CARRASCO K., GIBOT S., BISSON C. "Effects of Porphyromonas gingivalis LPS and LR12 peptide on TREM-1 expression by monocytes." Poster Discussion; Europerio 9.	Europerio/EFP Amsterdam
2012	BISSON C. , MASSIN F., LEFEVRE PA., THILLY N., MILLER N., GIBOT S. "Identification of soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (sTREM) -1 in gingival crevicular fluid: Increased levels in crevicular fluid from patients with severe periodontitis."	Europerio/EFP Vienne.
2009	BISSON-BOUTELLIEZ C. , MASSIN F., DUMAS D., MILLER N., LOZNIIEWSKI A. "Interactions between Desulfovibrio sp and buccal epithelial cells".	Europerio, Stockholm

Année	Auteurs et titres des communications affichées (CA)	Sociétés scientifiques
2015	BISSON C. , LEC PH., GABONGO B., MACHOUART M. Prevalence of protozoans in patients with periodontitis.	Europerio/EFP London
	BISSON C & DRIDI SM. Implication of protozoans in the etiopathogenicity of periodontitis: Myth or reality?	
2005	BISSON-BOUTELLIEZ C , KEDZIEREWICZ F., MARSURA A., MUTZENHARDT P., FINANCE C., LOZNIIEWSKI A. Physicochemical study of amoxicillin- β -cyclodextrin complexes.	Eurochem. Faculté Sciences, Vandoeuvre les Nancy
2003	BOUTELLIEZ C. , LOUBINOUX J., MILLER N. « Sulfate reducing bacteria in periodontal patients ».	Europerio/EFP Berlin
2001	BISSON- BOUTELLIEZ C. , MILLER N., DEMARCH D., BENE MC. Expression du CD9 et HLA- DR sur les cellules épithéliales et les polymorphonucléaires neutrophiles crévicaux dans les parodontites.	SFPIO Marrakech,
1997	BISSON C. , REICHERT M., KOHLER C., BENE M. C., MILLER N., WEISSENBACH M. « Counting and characterisation of crevicular cells».	Europerio/EFP Florence,

5.3.2.Nationales

Année	Auteurs et titres des communications orales (CO)	Sociétés scientifiques
2019	DUBAR M., ZAFFINO M., MACHOUART M., BISSON C. Protozoaires dans le biofilm sous-gingival : facteurs associés et impact du traitement initial. Prix du public (Prix Meridol).	CNEP Lille
2017	DUBAR M., GIBOT S., CARRASCO K., BISSON C. Etude clinique et in vitro de TREM (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells) -1 dans la parodontite. 1^{er} prix de communication recherche.	SFPIO Toulouse.
2016	LEC PH., ARGIBAIA C., KABONGO B., BISSON C. « Prévalence des protozoaires dans les parodontites. »	SFPIO Lyon.
	DRIDI SM., BISSON C. « Implication des protozoaires dans la maladie parodontale. »	SFPIO Lyon.
	PAOLI N, JOSEPH D., BISSON C. PENAUD J. « Traitement des Récessions parodontales avec mucograft. »	SFPIO Lyon.
2014	BISSON C. Bactéries Sulfato Réductrices dans les périimplantites	SFPIO La Baule
2013	BISSON C. Augmentation des niveaux de Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells (TREM)-1 soluble dans le fluide créviculaire de patients avec une parodontite sévère. »	SFPIO Deauville.
2011	S. GALLINA, MAYER F., AMBROSINI P., BISSON C. « Intérêt de l'ATPmétrie dans l'évaluation de la plaque dentaire. »	SFPIO, Aix en Provence
2010	PAOLI N., PENAUD J., JOSEPH D., L'HERITIER D., LORRAIN D., THOUVENOT P., MILLER N., BISSON-BOUTELLIEZ C. , AMBROSINI P. « Simplification de la phase chirurgicale et optimisation des résultats esthétiques. »	SFPIO, Strasbourg.
	JOSEPH D., PENAUD J., L'HERITIER J., PAOLI N., BISSON-BOUTELLIEZ C. , AMBROSINI P. « Evolution de la stabilité implantaire par une méthode objective. »	
	BISSON-BOUTELLIEZ C. , MASSIN F., DUMAS D., MILLER N., LOZNIIEWSKI A. « Interactions entre <i>Desulfovibrio spp.</i> et les cellules épithéliales. » 1^{er} prix communication recherche, Prix Sunstar.	
2008	BISSON-BOUTELLIEZ C. , MASSIN F., DUMAS D., LOZNIIEWSKI A. Mise en évidence de l'internalisation de <i>Desulfovibrio</i> dans les cellules épithéliales.	Ass. Française de cytométrie, Nancy
2007	BISSON-BOUTELLIEZ C. , LOZNIIEWSKI A., MARSURA A., MORY F., KEDZIEREWICZ F. Activité antibactérienne du complexe amoxicilline-β-CD sur diverses bactéries parodontales. 3^{ème} prix des communications recherche. Prix Sunstar.	SFPIO, La Baule

2005	BISSON-BOUTELLIEZ C , KEDZIEREWICZ F., MARSURA A., FINANCE C., LOZNIEMSKI A. Etude physicochimique de la complexation de l'amoxicilline par la β -cyclodextrine.	Journées nationales des cyclodextrines, Faculté de Pharmacie, Nancy
2004	BISSON-BOUTELLIEZ C , KENNEL- DE MARCH A., MILLER N., MONTAGNE P., BENE M.C. Evaluation du lysozyme crévicaire chez des patients avec une parodontite chronique et chez des contrôles sains ».	SFPIO, Aix en Provence
2002	BISSON-BOUTELLIEZ C. , LOUBINOX J., MILLER N., REICHERT M. Les bactéries sulfato réductrices dans la maladie parodontale. 2^{ème} Prix de communication recherche.	SFPIO, Lyon
1998	BISSON-BOUTELLIEZ C. , REICHERT M., KOHLER C., BENE MC., MILLER N., WEISSENBACH M. Comptage des cellules crévicales en sites sains et pathologiques.	SFPIO, Marseille

SFPIO : Société Française de Parodontologie & Implantologie Orale

Année	Auteurs et titres des communications sur invitation (CI)	Sociétés scientifiques
2020	BISSON C. « Les parasites et les bactéries : implication dans la parodontite. » (Conférence d'une journée)	SFPIO Sud-Ouest
2019	BISSON C. « Le biofilm, pas qu'une accumulation de micro-organismes : quels impacts sur notre pratique quotidienne ? » (Conférence d'une demi-journée)	ONFOC Vienne Poitiers
2018	BISSON C. « Dysbiose parodontale : du microbiote ... à l'impact clinique. » (Conférence d'une demi-journée)	SOBHL Saint Avold
2017	BISSON C. « Maladie parodontale : dysbiose du microbiote oral au cœur du problème. Session : traitement parodontal on chirurgical : intérêt des thérapeutiques alternatives innovantes. »	ADF Paris.
2015	BISSON C. Conférence dans le cadre d'un TP. Chirurgie préprothétique: l'élongation coronaire.	ADF, Paris TP B29.
2013	BISSON C. « Les bactéries mieux les connaître pour mieux les combattre. » (Conférence d'une soirée)	SFPIO Alsace
2011	BISSON C. « D'où vient la mauvaise haleine ? »	ADF, Paris
2010	BISSON-BOUTELLIEZ C. « Qu'est-ce qu'une poche ? Antibiotique et tests bactériens : quand, comment, pour qui ? »	SOBHL
2008	BISSON-BOUTELLIEZ C. « La plaque : c'est quoi ? »	SFPIO Lorraine
	BISSON- BOUTELLIEZ C. « Les traitements médicamenteux. »	SFPIO Lorraine
2003	BISSON-BOUTELLIEZ C. LOUBINOX J. « Identification de nouvelles bactéries pathogènes lors des parodontites et risque infectieux	SFPIO, Saint Malo

	« systémique. » Conférence rapportée dans l'Objectif Paro d'avril 2003.	
2003	BISSON-BOUTELLIEZ C. « Rechercher les facteurs d'infection » - Cycle de formation en parodontologie. 1 ^{er} degré: faire un examen parodontal.	SFPIO Lorraine

SFPIO : Société Française de Parodontologie & Implantologie Orale

ADF : Association Dentaire Française.

SOBHL : Société Odontologie Bassin Houlier Lorraine.

ONFOC : Organisme National de Formation Odontologique Continue

Rang	Communications Nationales			Communications Internationales		
	C.O.	C.A.	C.I.	C.O.	C.A.	C.I.
1^{er}	9	0	11	3	6	0
Dernier	4	0		1	0	
Autre	3	0		0	0	
Total	16	0	11	4	6	0

5.4. Organisation de congrès ou colloques

- 2016 : Responsable de la session odontologie, Congrès de thérapie alternative.
- 2008 : Les 9^{èmes} Journées de CYTOMETRIE, AFC (Association Française Cytométrie), Nancy. Organisatrice du congrès, co-responsable de la session microbiologie, octobre 2008. Organisation de la séance, contact et sélection des conférenciers et co-présidence de la séance en congrès.

6. Activité d'encadrement

6.1. Diplôme de Doctorat d'Université

- **10/2017-10/2019** : Marie DUBAR, Interne DES Médecine Bucco-Dentaire (co-direction, BISSON C., direction : Professeur GIBOT Sébastien, INSERM, UMR-S116).

Laboratoire SIMPA, EA 7300.

« TREM-1 et parodontite : évaluation clinique de l'effet du traitement initial parodontal sur les concentrations de TREM-1 soluble et étude in vitro de l'impact de P. gingivalis sur l'expression de TREM-1 par des monocytes humains primaires ».

Thèse soutenue le 19.12.2019.

6.2. Diplôme de Master 2

- **2016** : Marie DUBAR. Interne DES Médecine Bucco-Dentaire. Année recherche Laboratoire SIMPA. EA 7300.

« Etude des molécules TREM-1 et TREM-2 dans le fluide crévulaire de patients atteints de parodontite avant et après traitement étiologique ».

Et étude *in vitro* de la production cytokinique de monocytes issus de donneurs sang après stimulation avec LPS de *P. gingivalis*.

Master soutenu le : 21.11.2016

- **2020** : Thomas VEYNACHTER. Assistant Hospitalo-Universitaire. Laboratoire SIMPA. EA 7300.
"Identification du microbiote sous-gingival parodontal et des facteurs cliniques et psychosociaux associés dans une cohorte de 230 patients. »

6.3. Stage d'Initiation à la Recherche et autres

Stage d'Initiation à la Recherche

- **2017** : Thomas VEYNACHTER. « Etude du saignement des gencives dans la population adulte de Lorraine ».
Valorisation : 2 articles.
 - BAUDET A., VEYNACHTER T., ROUSSEAU H., ANAGNOSTOU F., JEANNE S., ORTI V., THILLY N., CLEMENT C., **BISSON C.** Perception of Gingival Bleeding by People and Healthcare Professionals: A Multicentre Study in an Adult French Population. *Inter. J. Env. Res. & Public Health.* 2020. 18; 17(16):5982 (IF 2.849)
 - T. VEYNACHTER, V. ORTI, E. MOULIS, H. ROUSSEAU, N. THILLY, F. ANAGNOUSTO, S. JEANNE, **C. BISSON.** «Prevalence and associated factors of self-reported gingival bleeding: a multicentre study in France". 2020. 18; 17(16):???? (IF 2.849)
- **2016** : Pierre-Henry LEC. « Etude préliminaire de la prévalence de parasite dans les poches parodontales au CHU de Nancy ».

Valorisation :

*** Publication des résultats dans le journal *Parasitology Research*, Dec;117(12):3767-3774. doi: 10.1007/s00436-018-6077-2.**

*** Communication orale – Session recherche – SFPIO Lyon, 2016.**

- **2012** : David JOSEPH. « Etude de l'impact de différents états de surface de titane sur la formation du biofilm mono et polybactérien ».
- **2011** : Stéphanie GEORGEL. « Etude de l'ATPmètrie dans l'évaluation de l'activité de deux antiseptiques sur la flore cutanée péri-buccale ».
SIR non soutenu.

Autres : encadrement de travaux de recherche dans le cadre du DUPIC (Diplôme d'Université de Parodontologie et d'Implantologie Clinique).

- **2014** : Patrick LACH. « Impact de différents antiseptiques sur un biofilm monobactérien ».
- **2011** : Florence MAYER. « Etude de l'ATPmètrie dans l'évaluation de l'activité de deux antiseptiques sur la flore cutanée péri-buccale ».

Valorisation : Communication orale, SFPIO, Aix en Provence, 2011.

6.4. Stage de laboratoire

- **2019** : Martin GOBRY. « Recherche de Protozoaires dans les tissus gingivaux infectés ».

Stage de 2 mois – Laboratoire de l'EA SIMPA 7300, validation de licence « Sciences de la vie », stage de 3^{ème} année. Université de Lorraine.

6.5. Diplôme d'état de Docteur en Chirurgie-Dentaire

14 directions de thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en Chirurgien-dentiste, dont 3 sont à l'origine d'une publication (1 publication acceptée, 2 en cours d'écriture).

7. Références bibliographiques

- Akcali A, Huck O, Tenenbaum H, Davideau JL, Buduneli N. Periodontal diseases and stress: a brief review. *J Oral Rehabil.* 2013;40(1):60-8.
- Alauzet, C., Cunat, L., Wack, M., Lozniewski, A., Busby, H., Agrinier, N., Cailliez-Grimal, C., Fripiat, J. P. (2019). Hypergravity disrupts murine intestinal microbiota. *Scientific Reports*, 28, 9(1):9410.
- Bao X, Wiehe R, Dommisch H, Schaefer AS. Entamoeba gingivalis Causes Oral Inflammation and Tissue Destruction. *J Dent Res.* 2020 May;99(5):561-567.
- Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Northwest Dent.* 2000;79(6):31-35.
- Athanassiou G, Michaleas S, Lada-Chitiroglou E, Tsitsa T, Antoniadou-Vyza E. Antimicrobial Activity of Beta-Lactam Antibiotics Against Clinical Pathogens After Molecular Inclusion in Several Cyclodextrins. A Novel Approach to Bacterial Resistance. *J Pharm Pharmacol.* 2003 Mar;55(3):291-300.
- Bao X, Wiehe R, Dommisch H, Schaefer AS. Entamoeba gingivalis Causes Oral Inflammation and Tissue Destruction. *J Dent Res.* 2020 May;99(5):561-567.
- Bartold PM, Dyke TE. An Appraisal of the Role of Specific Bacteria in the Initial Pathogenesis of Periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2019 Jan;46(1):6-11.
- 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 Apr;6(5):440-7.
- Bisson-Boutelliez C, Miller N, Demarch D, Bene MC. CD9 and HLA-DR expression by crevicular epithelial cells and polymorphonuclear neutrophils in periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2001;28(7):650-6.
- Bodet C, Grenier D. 2010. Synergistic effects of lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria on pro-inflammatory cytokine production in an ex vivo whole blood model. *Mol Oral Microbiol.* 25(2):102-11.
- Bonner M, Amard V, Bar-Pinatel C, Charpentier F, Chatard J-M, Desmuyck Y, et al. Detection of the amoeba Entamoeba gingivalis in periodontal pockets. *Parasite.* 2014; 21:30
- Bostanci N, Oztürk VÖ, Emingil G, Belibasakis GN. Elevated oral and systemic levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) in periodontitis. *J Dent Res.* 2013 Feb;92(2):161-5.
- Bostanci N, Thurnheer T, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Zinkernagel AS, Belibasakis GN. P. gingivalis regulates TREM-1 in human polymorphonuclear neutrophils via its gingipains. *PLoS One.* 2013 Oct 4;8(10):e75784.
- Bostanci N, Belibasakis GN. Doxycycline inhibits TREM-1 induction by P. gingivalis gingivalis. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Oct;66(1):37-44.

Bouchon A, Dietrich J, Colonna M. Cutting edge: inflammatory responses can be triggered by TREM-1, a novel receptor expressed on neutrophils and monocytes. *J Immunol*. 2000 May 15;164(10):4991-5.

Brisette CA, Fives-Taylor PM. Actinobacillus Actinomycetemcomitans May Utilize Either Actin-Dependent or Actin-Independent Mechanisms of Invasion. *Oral Microbiol Immunol*. 1999 Jun;14(3):137-42.

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.

Charlier P, Coyette J, Dehareng D, Dive G, Duez C, Dusart J, Fonzé E, Fraipont C et al. Résistance bactérienne aux β -lactamines. *Mzédecine/Sciences*. 1998, 14 :544-55.

Cohen, S., Kamarck, T., Mermelstein, R. (1983). A global measure of perceived stress. *Journal of Health and Social Behavior*, 24(4), 385-396.

Cortelli JR, Aquino DR, Cavalca Cortelli S, Borges Fernandes C, de Carvalho-Filho J, Nobre Franco GC, Costa FO, Kawai T. Etiological Analysis of Initial Colonization of Periodontal Pathogens in Oral Cavity. *J Clin Microbiol*. 2008 Apr;46(4):1322-9.

Das K, Ganguly S. Evolutionary genomics and population structure of Entamoeba histolytica. *Comput Struct Biotechnol J*. 2014 Oct 31;12(20-21):26-33. doi: 10.1016/j.csbj.2014.10.001. eCollection 2014 Nov.

Deshpande RG, Khan MB, Genco CA. Invasion of Aortic and Heart Endothelial Cells by Porphyromonas Gingivalis. *Infect Immun*. 1998 Nov;66(11):5337-43.

Dubar M., Carrasco K., Gibot S., Bisson C. Effects of Porphyromonas Gingivalis LPS and LR12 Peptide on TREM-1 Expression by Monocytes. *J Clin Periodontol*. 2018 Jul;45(7):799-805.

Dubar M, Zaffino ML, Remen T, Thilly N, Cunat L, Machouart MC, Bisson C. Protozoans in subgingival biofilm: clinical and bacterial associated factors and impact of scaling and root planing treatment. *J Oral Microbiol*. 2019 Nov 25;12(1):1693222.

Dzierzewicz Z, Szczerba J, Lodowska J, Wolny D, Gruchlik A, Orchel A, Weglarz L. The role of Desulfovibrio desulfuricans lipopolysaccharides in modulation of periodontal inflammation through stimulation of human gingival fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 2010 Jul;55(7):515-22

Fiori PL, Diaz N, Cocco AR, Rappelli P, Dessì D. Association of Trichomonas Vaginalis With Its Symbiont Mycoplasma Hominis Synergistically Upregulates the in Vitro Proinflammatory Response of Human Monocytes. *Sex Transm Infect*. 2013 Sep;89(6):449-54.

Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Béné MC, Bollaert PE, Lozniewski A, Mory F, Levy B, Faure GC. A soluble form of the triggering receptor expressed on myeloid cells-1 modulates the inflammatory response in murine sepsis. *J Exp Med*. 2004 Dec 6;200(11):1419-26. Epub 2004 Nov 22.

Gibot S. TREM, new receptors mediating innate immunity. *Med Sci (Paris)*. 2004;20(5):503-5.

Hajishengallis, G., Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409-419.

Heggendorn FL, Gonçalves L, Dias EP, Heggendorn C. , Lutterbach MTS. Detection of Sulphate-Reducing Bacteria and Others Cultivable Facultative Bacteria in Dental Tissues. *Acta Stomatol Croat*. 2014 Jun;48(2):116-22.

Jangra A, Lukhi MM, Sulakhiya K, Baruah CC, Lahkar M. 2014. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *Eur J Pharmacol*. 5;740:337-45.

Karl JP, Hatch AM, Arcidiacono SM, Pearce SC, Pantoja-Feliciano IG, Doherty LA, Soares JW. Effects of Psychological, Environmental and Physical Stressors on the Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2018 Sep 11;9:2013.

Kikuta N, Yamamoto A, Goto N. Detection and Identification of *Entamoeba Gingivalis* by Specific Amplification of rRNA Gene. *Can J Microbiol.* 1996 Dec;42(12):1248-51.

Klesney-Tait J, Keck K, Li X, Gilfillan S, Otero K, Baruah S, Meyerholz DK, Varga SM, Knudson CJ, Moninger TO, Moreland J, Zabner J, Colonna M. Transepithelial migration of neutrophils into the lung requires TREM-1. *J Clin Invest.* 2013;123:138–149.

Kucknoor AS, Mundodi V, Alderete J. Genetic identity and differential gene expression between *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas tenax*. *BMC Microbiol.* 2009 Mar 18;9:58.

Landersdorfer CB, Kinzig M, Bulitta JB, Hennig FF, Holzgrabe U, Sörgel F, Gusinde J. Bone penetration of amoxicillin and clavulanic acid evaluated by population pharmacokinetics and Monte Carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2569-78.

Langendijk PS, Hagemann J, Van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in periodontal pockets and in healthy oral sites. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 596–599.

Langendijk PS, Hanssen JTJ, Van der Hoeven JS. Sulfate-reducing bacteria in association with human periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000; 27: 943–950.

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 May;51(Pt 3):1035-44.

Linke HA, Gannon IT, Obin JN. Clinical Survey of *Entamoeba gingivalis* by multiple sampling in patients with advanced periodontal disease. *Inter J Parasitol.* 1989; 19:803-808

Loubinoux J, Bronowicki JP, Pereira IAC, Mougénel JL, Le Faou AE. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 40: 107-12.

Loubinoux J, Mory F, Pereira IAC, Le Faou AE. Bacteremia caused by a strain of *Desulfovibrio* related to the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 931–934.

Loubinoux J, Bisson-Boutelliez C, Miller N, Le Faou AE. Isolation of the provisionally named *Desulfovibrio fairfieldensis* from human periodontal pockets. *Oral Microbiology Immunology* 2002; 17: 321–323.

Langendijk PS, Kulik EM, Sandmeier H, Meyer J, Van der Hoeven JS. Isolation of *Desulfomicrobium orale* sp. nov. & *Desulfovibrio* strain NY682, oral sulfate-reducing bacteria involved in human periodontal disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 1035–1044.

Maffeo D, Leondiadis L, Mavridis IM, Yannakopoulou K. 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.* 2006 Apr 7;4(7):1297-304.

Maldonado-Bernal C., C J Kirschning, Y Rosenstein, L M Rocha, N Rios-Sarabia, M Espinosa-Cantellano, I Becker, I Estrada, R M Salazar-González, C López-Macías, H Wagner, J Sánchez, A Isibasi. The Innate Immune Response to *Entamoeba histolytica* Lipopeptidophosphoglycan Is Mediated by Toll-Like Receptors 2 and 4. *Parasite Immunol.* 2005 Apr;27(4):127-37.

- Margarita V., Rappelli P., Dessì D., Pintus G., Hirt RP, Fiori PL Symbiotic Association With Mycoplasma Hominis Can Influence Growth Rate, ATP Production, Cytolysis and Inflammatory Response of Trichomonas Vaginalis. *Front Microbiol.* 2016 Jun 20;7:953.
- Martin CR, Osadchiy V, Kalani A, Mayer EA. The Brain-Gut-Microbiome Axis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018 Apr 12;6(2):133-148.
- McMahon L, Schwartz K, Yilmaz O, Brown E, Ryan LK, Diamond G. Vitamin D-mediated induction of innate immunity in gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 2011;79(6):2250-6
- Mello, B. S., Monte, A. S., McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Custódio, C. S., Cordeiro, R. C., et al. 2013. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *J Psychiatr Res.* 47(10), 1521–1529.
- Monbelli A. 2003. The use of antibiotics in periodontal therapy, p. 494-511. In J. Lindhe, Karring T., Lang KP (ed), *Clinical Periodontology and iùpant dentistry*, 4th ed., Blackwell, Munsgaard.
- Okumura CYM, Baum LG, Johnson PJ. Galectin-1 on Cervical Epithelial Cells Is a Receptor for the Sexually Transmitted Human Parasite Trichomonas Vaginalis. *Cell Microbiol.* 2008 Oct;10(10):2078-90.
- Pajatsch M1, Andersen C, Mathes A, Böck A, Benz R, Engelhardt H. Properties of a cyclodextrin-specific, unusual porin from Klebsiella oxytoca. *J Biol Chem.* 1999 Aug 27;274(35):25159-66.
- Pajatsch M, Gerhart M, Peist R, Horlacher R, Boos W, Böck A. The periplasmic cyclodextrin binding protein CymE from Klebsiella oxytoca and its role in maltodextrin and cyclodextrin transport. *J Bacteriol.* 1998 May;180(10):2630-5.
- Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S162-S170.
- Pigott, R. & Power, C. (1993) *Adhesion molecule facts book*, p. 190. London: Academic Press.
- Postgate JR. *The sulphate-reducing bacteria*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, 1984.
- Phukan N, Brooks AES, Simoes-Barbosa A. A Cell Surface Aggregation-Promoting Factor from Lactobacillus gasseri Contributes to Inhibition of Trichomonas vaginalis Adhesion to Human Vaginal Ectocervical Cells. *Infect Immun.* 2018 Jul 23;86(8). pii: e00907-17. doi: 10.1128/IAI.00907-17.
- Ravdin JI, Guerrant RL. Role of adherence in cytopathogenic mechanisms of Entamoeba histolytica. Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. *J Clin Invest.* 1981 Nov;68(5):1305-13.
- Rendón-Maldonado JG, Espinosa-Cantellano M, González-Robles A, Martínez-Palomo A. Trichomonas vaginalis: in vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol.* 1998 Jun;89(2):241-50.
- Ribeiro LC, Santos C, Benchimol M. Is Trichomonas tenax a Parasite or a Commensal? *Protist.* 2015 May;166(2):196-210.
- Roberts A, Matthews JB, Socransky SS, Freestone PPE, Williams PH, Chapple ILC. Stress and the periodontal diseases: effects of catecholamines on the growth of periodontal bacteria in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2002;17(5):296-303.

- Scaglione F, Demartini G, Dugnani S, Frascini F. A New Model Examining Intracellular and Extracellular Activity of Amoxicillin, Azithromycin, and Clarithromycin in Infected Cells. *Chemotherapy*. Nov-Dec 1993;39(6):416-23.
- Serra D, Almeida LM, Dinis TCP. The Impact of Chronic Intestinal Inflammation on Brain Disorders: the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Mol Neurobiol*. 2019 Oct;56(10):6941-6951.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998 Feb;25(2):134-44.
- Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol*. 1992; 63: 322-331.
- Spielberger, C. D., Gorsuch, R. I., Lushene, R. E. (1970). *STAI Manual for the State-Trait Anxiety Inventory*. Consulting Psychologist Press. Palo Alto, CA.
- Spielberger, C. D. (1983). *State-Trait Anxiety Inventory for Adults. Sampler Set. Manual Set. Scoring Key*. Consulting Psychologists Press. Palo Alto, CA.
- Teughels W, Kinder Haake S, Sliepen I, Pauwels M, Van Eldere J, Cassiman JJ, Quirynen M. Bacteria interfere with *A. actinomycetemcomitans* colonization. *J Dent Res*. 2007 Jul;86(7):611-7.
- Tessarz AS, Cerwenka A. The TREM-1/DAP12 pathway. *Immunol Lett* 2008;116:111-6.
- Tian P, O'Riordan KJ, Lee YK, Wang G, Zhao J, Zhang H, Cryan JF, Chen W. Towards a psychobiotic therapy for depression: *Bifidobacterium breve* CCFM1025 reverses chronic stress-induced depressive symptoms and gut microbial abnormalities in mice. *Neurobiol Stress*. 2020 Mar 20;12:100216.
- Trim RD, Skinner MA, Farone MB, Dubois JD, Newsome AL. Use of PCR to detect *Entamoeba gingivalis* in diseased gingival pockets and demonstrate its absence in healthy gingival sites. *Parasitol Res*. 2011; 109:857-864.
- Variyam EP. Luminal bacteria and proteases together decrease adherence of *Entamoeba histolytica* trophozoites to Chinese hamster ovary epithelial cells: a novel host defence against an enteric pathogen. *Gut*. 1996 Oct;39(4):521-7.
- Ventura-Juarez J, Campos-Esparza M, Pacheco-Yeppez J, López-Blanco JA, Adabache-Ortíz A, Silva-Briano M, Campos-Rodríguez R. *Entamoeba histolytica* induces human neutrophils to form NETs. *Parasite Immunol*. 2016 Aug;38(8):503-9.
- Wagner Y, Noack B, Hoffmann T, Jacobs E, Christian Lück P. Periodontopathogenic bacteria multiply in the environmental amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Int J Hyg Environ Health*. 2006; 209(6):535-539.
- Wale N, Sim DG, Read AF. A nutrient mediates intraspecific competition between rodent malaria parasites in vivo. *Proc Biol Sci*. 2017; 284(1859).
- Zhu, L., Wei, T., Gao, J., Chang, X., He, H., Miao, M., et al. 2015. Salidroside attenuates lipopolysaccharide (LPS) induced serum cytokines and depressive-like behavior in mice. *Neurosci Lett*. 606, 1–6.

Abstract (français) – maximum 15 lignes

Les maladies parodontales sont des pathologies multifactorielles d'origine infectieuse dont le déclenchement et la progression ne sont pas pleinement élucidés à ce jour. Les travaux de recherche réalisés ont permis de montrer l'activation de certaines molécules de l'immunité innée, notamment le récepteur TREM-1 (Triggering Expressed on Myeloid Cells) qui participe à la surproduction de cytokines responsables en partie des dégradations tissulaires observées dans la parodontite. De plus, une nouvelle bactérie, *Desulfovibrio fairfieldensis*, a été identifiée dans le biofilm sous-gingival de patients atteints de parodontite qui participe à l'emballement global de l'immunité. Dans un modèle cellulaire, *Desulfovibrio* spp. a montré des capacités à stimuler l'immunité innée (production de cytokines) et à coloniser les cellules épithéliales. Récemment, d'autres microorganismes ont été détectés dans les foyers infectieux parodontaux : *Entamoeba gingivalis* et *Trichomonas tenax*. Une technique Taqman a été mise au point permettant d'identifier ces deux protozoaires dans les poches parodontales et de caractériser le contexte infectieux dans lequel ils étaient détectés. Mais le rôle de ces deux microorganismes dans la maladie parodontale reste peu connu. Dans une étude préliminaire, des variations de la composition du microbiote parodontal ont pu être détectées en fonction du niveau de stress et d'anxiété des patients inclus. Ainsi, les capacités des protozoaires à interagir avec les cellules de l'immunité et les cellules procaryotes présentes dans le biofilm sous-gingival seront évaluées, afin de préciser leur implication dans les maladies parodontales. De plus, les potentielles relations entre le microbiote et des facteurs psychosociaux seront confirmées et affinées dans une cohorte plus importante de patients.

Abstract (anglais) – maximum 15 lignes (pas obligatoire)

Periodontal diseases are multifactorial infectious disease whose the onset and the development remain unclear. That research carried on showed the activation of certain molecules of the innate immunity, in particular the receptor of TREM-1 (Triggering Expressed on Myeloid Cells) that participate to the up-regulation of cytokines which are partly responsible for the tissular degradations observed in periodontitis. Moreover, a new bacterium, *Desulfovibrio fairfieldensis*, has been identified in sub-gingival biofilm from patients with periodontitis and seems to participate to the global up-regulation of the immunity. In a cellular model, *Desulfovibrio* spp. shown the capacity to stimulate innate immunity (cytokines production) and to colonize the epithelial cells. Recently, others microorganisms have been detected in periodontal infectious sites: *Entamoeba gingivalis* and *Trichomonas tenax*. A Taqman technic has been developed to identify both protozoans in periodontal pockets and characterize the infectious context in which they were detected. The role of both microorganisms in periodontal diseases remains unclear. In a preliminary study, variations in the microbial composition have been observed according to the stress and anxiety level of the patients. Therefore, the capacity of these protozoans to interact with immune cells and procaryote cells present in the sub-gingival biofilm will be evaluated, in order to clarify their role in the periodontal diseases. Moreover, the potential relationships between microbiota and psychosocial factors will be confirm and specify in a larger cohort of patients.