



HAL
open science

Métabolome salivaire et parodontites : modifications de la signature métabolomique obtenue par résonance magnétique nucléaire consécutives à une thérapeutique parodontale

Zeyad Hassan

► **To cite this version:**

Zeyad Hassan. Métabolome salivaire et parodontites : modifications de la signature métabolomique obtenue par résonance magnétique nucléaire consécutives à une thérapeutique parodontale. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-01659236

HAL Id: dumas-01659236

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01659236>

Submitted on 8 Dec 2017

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

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

AVERTISSEMENT

Cette thèse d'exercice est le fruit d'un travail approuvé par le jury de soutenance et réalisé dans le but d'obtenir le diplôme d'État de docteur en chirurgie dentaire. Ce document est mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

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

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



UNIVERSITÉ
PARIS
DESCARTES

MEMBRE DE

U-PC
Université Sorbonne
Paris Cité

UNIVERSITÉ PARIS DESCARTES

FACULTÉ DE CHIRURGIE DENTAIRE

Année 2017

N° 038

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

Présentée et soutenue publiquement le : 10 juillet 2017

Par

Zeyad HASSAN

Métabolome salivaire et parodontites : modifications de la signature métabolomique obtenue par résonance magnétique nucléaire consécutives à une thérapeutique parodontale

Dirigée par M. le Docteur Dominique Guez

JURY

Mme le Professeur Marie-Laure Colombier

Président

M. le Professeur Philippe Savarin

Assesseur

M. le Docteur Dominique Guez

Assesseur

M. le Docteur Matthias Rzeznik

Assesseur

M. le Docteur Sébastien Jungo

Invité

Tableau des enseignants de la Faculté

DÉPARTEMENTS	DISCIPLINES	PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS	MAÎTRES DE CONFÉRENCES
1	ODONTOLOGIE PÉDIATRIQUE	Mme VITAL Mme DAVIT-BEAL	M. COURSON Mme DURSUN Mme VANDERZWALM Mme JEGAT
	ORTHOPÉDIE DENTO-FACIALE		Mme BENAHMED M. DUNGLAS Mme KAMOUN-GOLDRAT Mme LE NORCY
	SANTÉ COMMUNAUTAIRE ET POPULATIONS SINGULIÈRES	Mme FOLLIGUET M. PIERRISNARD	M. NEBOT
2	PARODONTOLOGIE	Mme COLOMBIER	M. BIOSSE DUPLAN Mme DRIDI Mme GOSSET M. GUEZ
	MÉDECINE ET CHIRURGIE BUCCALES	M. MAMAN	Mme EJEIL M. GAULTIER M. HADIDA M. NGUYEN Mme RADOI
3	ODONTOLOGIE CONSERVATRICE ENDODONTIE	Mme CHEMLA M. LASFARGUES	Mme BESNAULT M. BONTE Mme BOUKPESSI M. DECUP Mme GAUCHER
	PROTHÈSE	M. POSTAIRE	M. CHEYLAN M. DAAS M. DOT M. EID Mme FOUILLOUX-PATEY Mme GORIN M. RENAULT M. RIGNON-BRET M. TIRLET M. TRAMBA Mme WULFMANN
4	PRÉVENTION-ÉPIDÉMIOLOGIE ÉCONOMIE DE LA SANTÉ ET ODONTOLOGIE LÉGALE		Mme GERMA M. PIRNAY M. TAVERNIER
	SCIENCES BIOLOGIQUES	Mme CHAUSSAIN M. GOGLY Mme POLIARD M. ROCHEFORT Mme SEGUIER	M. ARRETO Mme BARDET Mme CHARDIN M. LE MAY M. FERRE (MCU associé) Mme CHERIFI (MCU associée)
	SCIENCES ANATOMIQUES PHYSIOLOGIQUES ET OCCLUSODONTIQUE		M. ATTAL Mme BENBELAID Mme BENOIT M. BOUTER M. CHARRIER M. CHERRUAU M. FLEITER Mme FRON M. SALMON Mme TILOTTA

Remerciements

À Mme le Professeur Marie-Laure Colombier

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'Université Paris Descartes

Habilitée à Diriger des Recherches

Professeur des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de thèse,

Pour votre enseignement de qualité au sein de la Faculté

Je vous suis infiniment reconnaissant de vous intéresser à ce travail

À M. le Professeur Philippe Savarin

Professeur des Universités, à l'Université Paris XIII

Directeur du laboratoire CSPBAT (Chimie Structures et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques) UMR7244

Pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire,
Pour votre accueil à chaque passage à Bobigny,
Veuillez trouver ici mon profond respect et ma sincère gratitude

À M. le Docteur Dominique Guez

Docteur en Chirurgie dentaire

Docteur de l'Université Paris Descartes

Maître de Conférences des Universités, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Praticien Hospitalier, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris

Pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse,
Pour votre enseignement de qualité durant mes années de clinique à
l'hôpital Bretonneau, Pour votre rigueur et perfectionnisme qui vont
toujours m'accompagner
Veuillez trouver ici l'expression de mon admiration la plus sincère et
de mes remerciements les plus chaleureux

À M. le Docteur Matthias Rzeznik

Docteur en Chirurgie dentaire

Assistant Hospitalo-Universitaire, Faculté de Chirurgie dentaire Paris Descartes

Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury de thèse,
Pour vos conseils pertinents et avisés depuis mon premier mois en D2,
Pour votre dévouement et ton implication qui m'ont fait apprendre
beaucoup,

Je vous remercie infiniment pour tout ce que vous avez fait pour moi

À M. le Docteur Sébastien Jungo

Docteur en Chirurgie dentaire

Pour m'avoir encouragé à suivre le chemin que vous avez commencé,
Pour m'avoir accompagné en clinique en prenant le temps de tout
expliquer,

Veillez trouver ici ma considération et mes remerciements les plus
profonds

A mon **grand-père** qui m'a toujours appelé « Docteur » avant qu'il que ce soit

A ma **mère et mon père** qui m'ont donné tous les moyens pour réussir : un soutien sans faille, des conseils pertinents et une confiance sans limite.

A **Mohamed Triba** que j'aurais voulu avoir dans ce jury. Toujours disponible pour moi ; sans lui, j'aurais pu rien faire dans cette thèse. Merci de m'avoir donné goût à la recherche.

Les **autres** se reconnaîtront parce que les vrais savent. Merci pour tout.

Table des matières

INTRODUCTION	3
1. DIAGNOSTIC DES MALADIES PARODONTALES	4
1.1 DIFFICULTES DANS L'APPROCHE DIAGNOSTIQUE ACTUELLE	4
1.2 LE FLUIDE ORAL EN TANT QUE MILIEU CANDIDAT A L'IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS	7
1.3 LES SCIENCES « OMIQUES »	11
1.3.1 APPROCHES GENOMIQUE ET TRANSCRIPTOMIQUE.....	12
1.3.2 APPROCHE PROTEOMIQUE	13
1.3.3. LA METABOLOMIQUE ET LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	14
2. ETUDE CLINIQUE	22
2.1. MATERIELS ET METHODES	20
2.1.1 CONSIDERATION ETHIQUE.....	20
2.1.2. POPULATION ETUDIEE ET DEROULEMENT DE L'ETUDE	20
2.1.3 CRITERES D'INCLUSION	23
2.1.4 DIAGNOSTIC DES PARODONTITES	23
2.1.5 ÉVALUATION DES DONNEES CLINIQUES.....	25
2.1.6 PRELEVEMENT DU FLUIDE ORAL	26
2.1.7 SPECTROSCOPIE ¹ H RMN.....	26
2.1.8 ANALYSE STATISTIQUE.....	27
2.2. RESULTATS	28
2.3. DISCUSSION	36
CONCLUSION	40
BIBLIOGRAPHIE	41
TABLE DES FIGURES	44
TABLE DES TABLEAUX	45

Introduction

Les parodontites sont des maladies infectieuses à composante inflammatoire qui affectent les tissus de soutien des dents de manière irréversible. L'absence de traitement conduit plus ou moins rapidement à la perte des dents. Si la plaque dentaire est le facteur étiologique principal de ces affections, il est manifeste que des « terrains » propices à l'initiation et à l'évolutivité de ces maladies existent. Des facteurs locaux, systémiques, génétiques, environnementaux ou encore comportementaux, associés ou individuellement, ont la capacité de perturber l'équilibre entre les forces en présence au niveau de l'interface dents/parodonte.

Aujourd'hui, le diagnostic d'une parodontite, aussi précoce soit-il, repose toujours sur la mise en évidence de signes cliniques caractérisant des destructions tissulaires. Or les processus aboutissant à la destruction des tissus parodontaux sont efficaces bien avant qu'elle ne soit observable cliniquement. C'est pourquoi depuis plusieurs années l'accent a été mis sur l'identification de marqueurs biologiques permettant d'intercepter la maladie dans ses premiers stades. Les marqueurs candidats peuvent être en relation avec le métabolisme bactérien, la réponse de l'hôte ou encore les mécanismes de destruction des tissus conjonctifs et osseux. L'exploration de ces marqueurs peut se faire au niveau des tissus ou de fluides biologiques comme le fluide gingival, oral, voire au niveau sanguin.

Cette étude clinique longitudinale, qui porte sur une dizaine de patients, s'inscrit dans une phase exploratoire de recherche de biomarqueurs candidats dans le fluide oral. Une technologie originale de métabolomique, faisant appel à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) a été utilisée pour identifier d'éventuelles modifications de la signature métabolique associées au traitement de patients atteints de parodontites.

1. : Diagnostic des maladies parodontales

1.1 Difficultés dans l'approche diagnostique actuelle

Aujourd'hui, le diagnostic des maladies parodontales repose toujours sur la mise en évidence d'indicateurs cliniques comme la présence d'une inflammation ou la quantification de la profondeur de poche, de la perte d'attache ou encore de l'alvéolyse. La recherche de ces indicateurs repose sur un examen clinique souvent désagréable pour le patient et très opératoire dépendant surtout dans les premiers stades de la maladie. Aucun marqueur biologique moléculaire spécifique et aisément utilisable tant au niveau méthodologique que de son coût, n'a été clairement mis en évidence. Il est vrai que l'hétérogénéité des affections parodontales voire certaines spécificités de l'écosystème particulier que représente l'interface parodontale peuvent compliquer cette recherche. On ne peut que regretter cet insuccès car l'identification de biomarqueurs permettrait de dépister précocement les parodontites, d'améliorer la caractérisation de la maladie, d'apprécier la réponse au traitement médical mis en œuvre et d'intercepter les récurrences. Cette recherche de biomarqueurs s'apparente plus à la recherche d'une signature de la maladie au niveau moléculaire ou biochimique qu'à l'étude de son étiologie. Cependant, compte tenu de la nature des parodontites, ces marqueurs pourraient selon toute logique être apparentés à trois grands axes :

- métabolisme bactérien, la maladie étant associée à une dysbiose
- réponse de l'hôte, cette dysbiose étant associée à une rupture de la tolérance au microbiote commensal
- mécanismes de destruction du tissu conjonctif ou du tissu osseux.

La découverte de biomarqueurs est, par ailleurs, souvent liée au développement de nouvelles technologies. Ainsi, de façon concomitante à l'évolution des connaissances concernant la pathogénèse des parodontites, de nouveaux marqueurs biologiques candidats se sont vus proposés.

Si, par ailleurs ces marqueurs présentaient une certaine spécificité, il deviendrait peut-être également possible de surmonter les difficultés actuelles quant à la caractérisation d'une parodontite. Tout clinicien a été confronté au moins une fois dans sa vie professionnelle au choix cornélien entre une

entité chronique ou agressive, les critères actuels tels qu'ils ont été définis par Armitage¹ n'étant pas d'une fiabilité absolue. De même, après traitement, la confrontation de ces marqueurs aux paramètres cliniques offrirait l'opportunité de contrôler l'efficacité d'un traitement voire d'anticiper des récives. S'il est permis de rêver sans faire de ce travail de recherche un roman d'anticipation, à l'heure où l'on promeut à tous crins la santé connectée : bientôt le patient faisant son autodiagnostic de récive grâce à des « mouchards biologiques » et se précipitant chez son praticien exerçant « principalement » de la parodontie qui aura été préalablement averti en temps réel par internet de la récive ?

Loin de cet univers orwelien et plus raisonnablement, ces biomarqueurs permettraient peut-être également, dans le cas d'affections siégeant dans d'autres compartiments du corps, d'identifier l'implication éventuelle et la part inhérente aux affections parodontales.

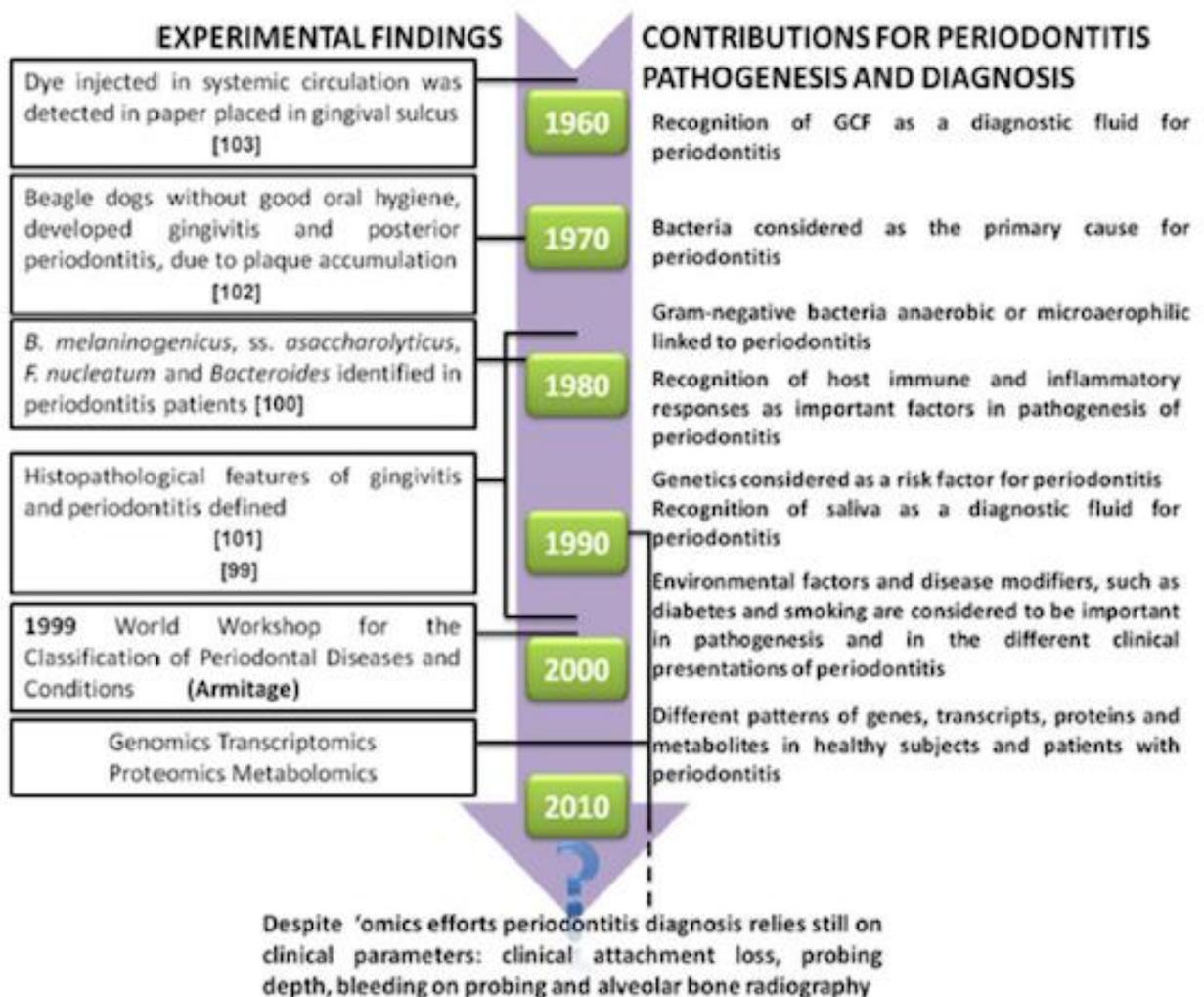
Il est raisonnable de penser que l'identification de tels marqueurs constituera un complément précieux au diagnostic sans remplacer totalement l'épreuve du sondage parodontal chère à des générations de parodontistes. Il sera toujours nécessaire d'évaluer les paramètres cliniques pour des raisons diagnostiques notamment d'évaluation du terrain, de choix thérapeutique ou encore de surveillance. Le « sens clinique » sera épaulé mais non remplacé par des indicateurs moléculaires.

La sonde millimétrée reste l'instrument parodontal par excellence et l'appréciation de paramètres qui reflètent les destructions tissulaires (mais non les mécanismes physiopathologiques) demeure le socle du diagnostic :

- présence de poches profondeur des poches,
- perte d'attache,
- saignement au sondage reflet d'une inflammation profonde (bien qu'à l'origine de nombreux faux positifs, son absence, en revanche, étant un bon indicateur de l'absence d'activité)
- alvéolyse

¹ Armitage, « Development of a classification system for periodontal diseases and conditions ».

Figure 1 L'évolution des moyens de diagnostic en parodontologie depuis les années 60



Source : Trindade, « Uncovering the molecular network », 2008

Il est à noter que certains de ces paramètres peuvent être parfois assez spécifiques comme dans le cas des parodontites agressives localisées. Par ailleurs, pour améliorer la caractérisation de la maladie, le facteur bactérien est évalué de façon quantitative et parfois qualitative. L'évaluation quantitative au moyen d'indices simple d'emploi comme le Plaque Control Record² reste aujourd'hui intéressante car elle permet de dégager une notion de charge bactérienne caractéristique de formes chroniques peu

² O'Leary, Drake, et Naylor, « The plaque control record ».

évolutives. Cependant les outils d'évaluation qualitative employés ces dernières années montrent aujourd'hui leurs limites. En effet, les travaux récents faisant appel aux techniques de métagénomique ont clairement montrés qu'il existait une très grande biodiversité bactérienne au niveau de la niche sous-gingivale, que des genres bactériens ayant pu être considérées comme des marqueurs d'une pathologie parodontale s'avéraient être présents chez presque 50% d'une population de patients sains, de façon non transitoire et en proportion appréciable³. Ainsi, très clairement l'espèce *P. gingivalis* aujourd'hui s'apparente plus à un commensal même s'il reste fortement associé aux parodontites. Sa présence ne peut plus être considérée comme un marqueur de la maladie puisqu'il est présent dans des situations cliniquement saines. Néanmoins il peut être un acteur d'une dysbiose au niveau parodontal notamment s'il acquiert ou exprime un phénotype plus agressif que les moyens d'investigation actuels ne permettent pas d'identifier en pratique courante⁴.

Il en est de même pour les mises en culture. En effet, les publications récentes portant sur l'identification des groupements de communautés bactériennes dans différents sites du corps humain (Human Microbiome Project), ont très clairement montré, notamment pour des pathologies du système digestif, que les espèces les plus abondantes n'étaient pas forcément les plus importantes au niveau fonctionnel, et qu'une grande partie des dites espèces n'étaient pas « cultivables ».

Enfin l'évaluation de la réponse de l'hôte par des tests ciblant IL-1, par des techniques de séquençage et par PCR (Polymerase Chain Reaction) de l'ADN, cytokine fortement impliquée dans les mécanismes inflammatoires et notamment au niveau parodontal, reste approximative avec des résultats peu probants⁵.

1.2 Le fluide oral en tant que milieu candidat à l'identification de biomarqueurs

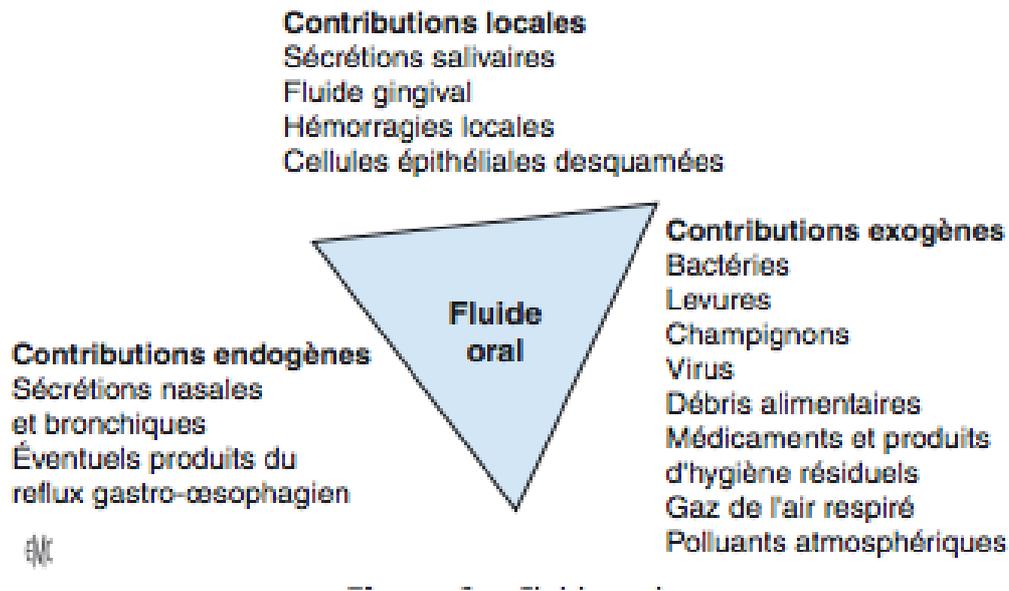
Dans le cadre de la recherche d'un marqueur biologique d'une pathologie, pour qu'un marqueur candidat soit proposé comme test clinique utilisable en routine, ce test doit idéalement, être peu coûteux, peu invasif, ne doit pas nécessiter un appareillage « lourd » et doit être relativement rapide.

³ Zhou et al., « Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults ».

⁴ Herath et al., « Tetra- and penta-acylated lipid A structures of Porphyromonas Gingivalis LPS differentially activate TLR4-mediated NF-κB signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts ».

⁵ Lavu et al., « Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis ».

Figure 2 : La composition du fluide oral



Source : Pellat, « Salives et milieu buccal », 2010

Dans le cadre des maladies parodontales si les échantillons tissulaires restent éligibles pour des analyses dans le cadre de recherche sur la physiopathologie des maladies parodontales, il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'un acte invasif qui doit être réservé en pratique courante à des situations particulières justifiant par exemple un examen anatomo-pathologique.

L'analyse sanguine n'apparaît pas non plus comme l'examen de choix du moins en première intention dans le cadre du diagnostic parodontal. Elle ne peut être réalisée en routine à moins d'avoir une infirmière à demeure, et reste un examen complémentaire destiné à confirmer ou infirmer un état systémique suspecté (hyperglycémie, trouble hématologique...).

Le fluide gingival et le fluide oral sont les deux sécrétions disponibles dans la cavité buccale. Le fluide gingival a été et reste une source très étudiée dans le cadre de la physiopathologie des maladies parodontales⁶. Cependant en pratique courante, le prélèvement de ce fluide reste une technique difficile si l'on souhaite éviter toute contamination ou s'il est nécessaire d'en recueillir une certaine quantité. Dans le cadre de notre étude nous avons tenté d'utiliser le fluide gingival mais avons dû renoncer d'une part en raison de l'insuffisance du volume recueilli, par rapport aux 10ml requis dans notre étude, lors de l'utilisation de micropipettes et d'autre part en raison de l'hétérogénéité de la composition des bandelettes de papier lors de l'utilisation d'une technique d'imprégnation par

⁶ Zhang et al., « Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions ».

capillarité. Cette hétérogénéité était totalement incompatible avec une technique de soustraction dans l'analyse des spectres obtenus par RMN.

La salive en revanche est un fluide facilement disponible et son prélèvement n'est pas invasif⁷. La salive est un fluide complexe produit et sécrété par trois paires de glandes salivaires majeures : la glande parotide, la glande sublinguale et la glande submandibulaire ainsi que des glandes salivaires mineures. Par abus de langage, nous parlerons de salive en lieu et place du fluide oral. Il y a cependant bien lieu de différencier les sécrétions pures prélevées aux ostia et le fluide oral qui baigne la cavité buccale⁸.

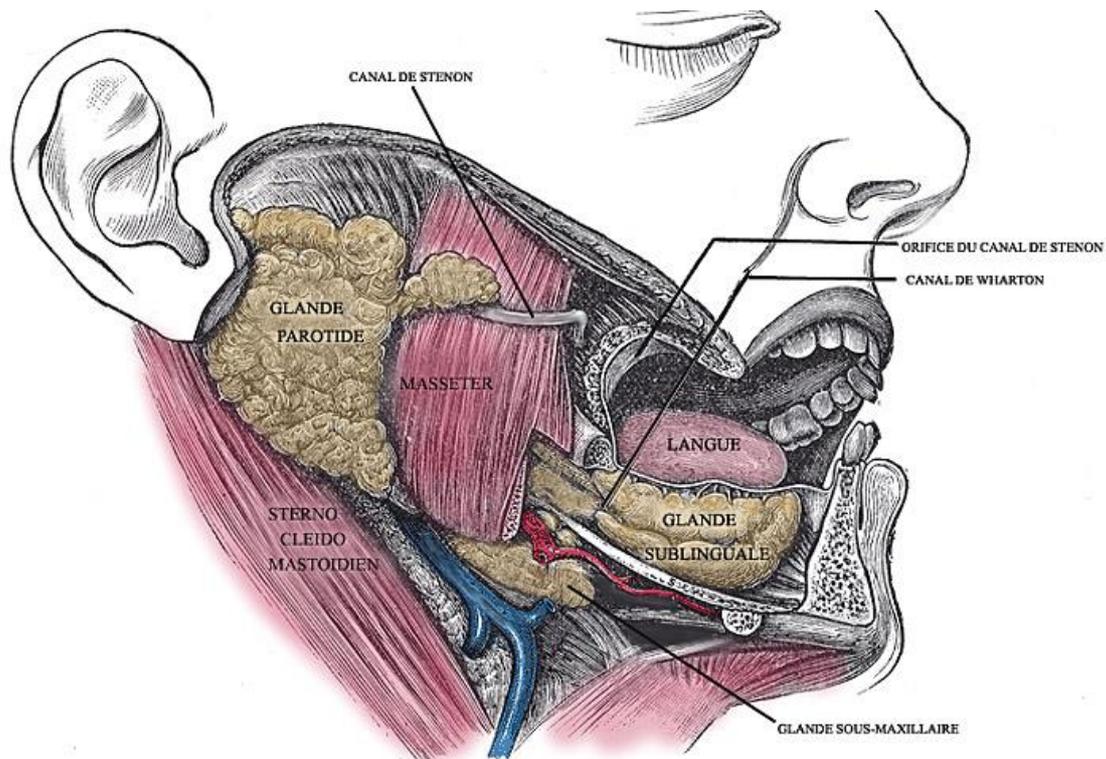
La salive est un biofluide constitué de 99,5 % d'eau, de 0,30 % à 0,34 % de substances organiques essentiellement protidiques et de 0,18 % à 0,22 % de substances inorganiques. Elle est très hypotonique par rapport aux autres fluides physiologiques (60 à 120mOsm/kg contre 290mOsm/kg pour le plasma). Son pH moyen, en l'absence de toute stimulation, est de 5,75 à 6,15. Toujours sans stimulation, la salive parotidienne est plus acide (pH 5,8) que la salive sous-mandibulaire (pH 6,4). Globalement après stimulation le pH augmente (7,2) en même temps que le débit salivaire. Les sécrétions de chaque type de glande ont leurs caractéristiques propres. D'un point de vue quantitatif, les glandes submandibulaires produisent 65 à 75% du volume total de la salive au repos, alors qu'après stimulation la salive est essentiellement parotidienne. Contrairement aux sécrétions salivaires qui sont normalement aseptiques, le fluide oral recèle :

- des micros organismes ($4,3 \times 10^6$ et $5,5 \times 10^9$ par ml)
- des constituants d'origine sérique et tissulaire, absents des sécrétions salivaires apportées par le fluide gingival.
- des débris cellulaires et alimentaires, des dérivés de sécrétions bronchiques, nasales, voire œsophagiennes
- des produits sanguins en cas de saignements, phénomène fréquent lors de maladies parodontales.

⁷ Zhang et al., « The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease ».

⁸ Pellat, « Salives et milieu buccal ».

Figure 3 Les glandes salivaires



Source : Henry Gray, « Atlas of the Human Body », 1918

Globalement, le fluide gingival peut être considéré comme un réservoir bactérien. Les espèces bactériennes présentes dans ce fluide peuvent provenir de différentes niches écologiques très différentes de la cavité orale, comme la langue ou la plaque supra ou sous gingivale. Il en est de même au niveau moléculaire, car pour ce qui nous intéresse au niveau parodontal, il existe notamment un transit du fluide gingival vers le fluide oral. |

Ces vingt dernières années, la salive a été de plus en plus utilisée à des fins diagnostiques pour les caries dentaires, les cancers buccaux et les cancers du sein⁹, les maladies des glandes salivaires¹⁰, le VIH et VHC. Elle est utilisable pour le dépistage de substances illicites (cocaïne, méthamphétamine, cannabis, opiacés), le monitoring de médicaments, les dosages hormonaux¹¹.

⁹ Pfaffe et al., « Diagnostic potential of saliva ».

¹⁰ Duchemann et al., « Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of salivary metabolome in sarcoidosis. »

¹¹ Kaczor-Urbanowicz et al., « Saliva diagnostics – current views and directions ».

1.3 Les sciences « omiques »

En se référant aux publications du groupe de recherche en éthique des sciences « omiques » (Omics-Ethics research group) rattaché à l'Institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal (IRSPUM)¹², Les technologies dites « omiques » telles que la génomique et le séquençage de l'ADN à grande échelle sont apparues parallèlement au développement du projet Génome Humain dans les années 90. Les technologies « omiques » permettent de générer des quantités énormes de données grâce à l'utilisation de technologies informatiques poussées et ce à des niveaux biologiques multiples. De la génomique à la métabolomique en passant par la transcriptomique et la protéomique autrement dit depuis l'ADN jusqu'au métabolite ces données peuvent couvrir tous les mécanismes impliqués dans les variations qui se produisent dans les réseaux cellulaires et qui influencent le fonctionnement des organes dans leur totalité^{13, 14}.

Parallèlement à l'accroissement considérable du nombre de données traitées, les technologies en « omique » ont fondamentalement modifié les procédures de recherche et ont permis le passage de *l'hypothesis driven research* à la *data-driven research*. En d'autres termes il y a eu passage d'une démarche scientifique se basant sur une hypothèse de recherche clairement formulée et validée en la testant par un protocole de recherche, à une démarche qui part de données existantes comparées et analysées pour arriver à un résultat. Avec l'avènement des technologies « omiques », il n'est plus nécessaire de poser une question précise pour débiter une recherche. En effet, de nombreuses données peuvent être collectées au travers d'échantillons tissulaires ou de fluides biologiques dans le cadre de l'étude de la physiopathologie d'une maladie. Sans se baser sur une hypothèse initiale précise (par exemple la présence de telle ou telle protéine dans tel fluide biologique chez les patients malades), les données issues des échantillons sont « explorés » par un puissant outil informatique qui va au moyen d'algorithmes chercher à structurer les données en classe homogène. Autrement dit voir ce qui peut réunir ou différencier des échantillons. Cette inversion du modèle de recherche (de l'expérimentation traditionnelle basée sur des hypothèses précises à un modèle de recherche qui ne dépend pas de telles hypothèses) va permettre, dans le cadre de l'approche globale de telle ou telle pathologie, d'élargir les domaines explorés et ce de façon assez rapide et à un coût acceptable. En effet de part leur définition, ces outils de biologie moléculaire, intéressent toute la chaîne des composants du vivant, la transcriptomique analysant comment un génome est traduit en protéines, la

¹² OMICS-ETHICS Research group, « What we do ».

¹³ Nicholson et Lindon, « Systems biology ».

¹⁴ Wilke, Mareedu, et Moore, « The pathway less traveled ».

protéomique explorant l'ensemble des protéines produites par un génome, la métabolomique se consacrant à l'ensemble des métabolites produits par une cellule dans un certain environnement.

Ces approches extensives ont été appliquées récemment au fluide salivaire à des fins diagnostiques¹⁵. Les techniques de protéomique salivaire permettent une détection de marqueurs biologiques même présents en faible quantité, de façon simple et non invasive. Ces approches se révèlent donc être des voies prometteuses pour le dépistage de pathologies à des stades infra-cliniques tels que des cancers¹⁶.

Au niveau parodontal, le développement d'une approche globale, au moyen de ces sciences « omiques » qui intègrent de multiples paramètres offre de manière inédite des opportunités quant à la compréhension des mécanismes intervenant dans les maladies parodontales. Ces pathologies de nature complexe qui ne sauraient être ramenées à un simple conflit hôte/bactéries nécessitent d'intégrer de nombreux paramètres soumis à des fluctuations en réponse à des facteurs de nature diverse (environnementaux, comportementaux, etc.).

Les constituants salivaires qui ont été étudiés comme biomarqueurs candidats des maladies parodontales regroupent :

- des constituants bactériens,
- des protéines sécrétées par l'hôte ou d'origine bactérienne,
- du matériel génétique.

1.3.1 Approches génomique et transcriptomique

Au niveau de la cavité buccale et plus particulièrement de la salive ces approches s'avèrent intéressantes. Ainsi, récemment de l'ARN retrouvé dans la salive a pu être utilisé pour le diagnostic de cancers buccaux et du syndrome de Sjögren¹⁷. Au niveau parodontal, de nombreuses études ont souligné le rôle joué par le polymorphisme de certains gènes tant dans l'initiation d'affections parodontales que dans l'évolutivité de ces dernières^{18,19}. La réponse inflammatoire à la compétition bactérienne serait fortement influencée par certains allèles pour des gènes participant au contrôle de

¹⁵ Zhang et al., « The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease ».

¹⁶ Gowda et al., « Metabolomics-based methods for early disease diagnostics ».

¹⁷ Kaczor-Urbanowicz et al., « Saliva diagnostics – Current views and directions ».

¹⁸ Sofaer, « Genetic approaches in the study of periodontal diseases ».

¹⁹ Hodge et Michalowicz, « Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults ».

cette réaction. Ce lien semble avéré particulièrement pour les formes évolutives de parodontites²⁰. Il s'agit notamment de gènes codant pour des cytokines impliquées dans la régulation du processus inflammatoire comme IL-1²¹, TNF α ²², IL-10 ou de récepteurs Fc- γ ²³. Les recherches portant sur ces polymorphismes ont été menées sur des échantillons sanguins, tissulaires ou sur le fluide gingival avec des résultats parfois contradictoires, même si un allèle d'IL-1 α (IL-1 α ⁺⁴⁸⁴⁵) semble influencer les concentrations salivaires des transaminases aspartate aminotransférase (ASAT) et alanine aminotransférase (ALAT). En effet, les taux de ces enzymes au niveau salivaire seraient en rapport avec l'intensité de l'inflammation et des destructions tissulaires. Les métabolites issus des réactions initiées par ces enzymes à savoir l'aspartate, le glutamate, le pyruvate et le lactate pourraient être également considérés comme des biomarqueurs candidats pertinents.

L'approche par la génomique et la transcriptomique repose donc sur l'existence de ces polymorphismes génétiques qui induisent une vulnérabilité aux parodontites. Néanmoins, ces approches présentent certaines limites quant à l'identification de marqueurs biologiques et notamment méthodologiques (populations étudiées etc.) en ce qui concerne les maladies parodontales.

1.3.2 Approche protéomique

Pour ce qui nous concerne, l'objectif principal de l'approche protéomique et peptidomique est l'identification de protéines et leur quantification chez des patients atteints de parodontite. Une comparaison avec des patients sains pourrait permettre la caractérisation de profils en relation avec la maladie. La spectrométrie de masse est largement utilisée et deux approches sont employées dans ce cadre. La première approche ascendante (dite « bottom-up ») qui est la plus utilisée, analyse un mélange de peptides après digestion préalable des protéines par un enzyme. La seconde méthode descendante (dite « top-down ») analyse des peptides plus longs ou des protéines intactes. Le fluide gingival et la salive (stimulée ou non stimulée) ont été largement utilisés en protéomique. Dans le cadre des maladies parodontales, des protéines ont été identifiées dans la salive comme marqueurs biologiques candidats. Elles concernent des aspects-clefs du processus pathologique²⁴:

- inflammation
- la dégradation du collagène

²⁰ Kinane et Hart, « Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease ».

²¹ Kornman et al., « The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease ».

²² Singh et al., « Salivary TNF-alpha ».

²³ Van Dyke et Dave, « Risk factors for periodontitis ».

²⁴ Zhang et al., « The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease ».

- la destruction de l'os

Tableau 1 : Les différents biomarqueurs salivaires

Biomarqueur	Observations
TNF α	Les taux de TNF α sont élevés chez les patients qui ont des signes cliniques de maladies parodontales ²⁵
IL-1 β et MMP-8	Les taux moyens d'IL-1 β et MMP-8 salivaires sont significativement plus élevés chez patients présentant une maladie parodontale par rapport aux témoins ^{26,27}
MMP-8	MMP-8 est à la fois un indicateur de l'activité de la sévérité de la maladie parodontale ²⁸
Protéine C-réactive	Le taux de protéine C-réactive est directement lié au statut parodontal et semble associée à la parodontite chronique ²⁹
IgA	Les individus susceptibles aux maladies parodontales ont une capacité de sécrétion élevée d'IgA salivaires ^{30,31}

Source : Henry Gray, « Atlas of the Human Body », 1918

1.3.3. La métabolomique et la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

La métabolomique est définie comme étant la mesure quantitative d'une réponse métabolique multiparamétrique des systèmes vivants suite à un stimuli physiopathologique ou une modification génétique³². Un métabolite est un composé organique intermédiaire ou issu du métabolisme. On réserve ce terme en général aux petites molécules et aux monomères, par opposition aux macromolécules, qui sont la polymérisation de monomères. Ainsi, le glucose est un métabolite, contrairement au glycogène, qui est un polysaccharide de poids moléculaire très élevé. Les métabolites

²⁵ Gupta, Govila, et Saini, « Proteomics – The research frontier in periodontics ».

²⁶ Ibid.

²⁷ Rangbulla et al., « Salivary IgA, interleukin-1 β and MMP-8 as salivary biomarkers in chronic periodontitis patients ».

²⁸ Gupta, Govila, et Saini, « Proteomics – the research frontier in periodontics ».

²⁹ de Souza et al., « Short-term changes on C-reactive protein (CRP) levels after non-surgical periodontal treatment in systemically healthy individuals ».

³⁰ Rangbulla et al., « Salivary IgA, Interleukin-1 β and MMP-8 as salivary biomarkers in chronic periodontitis patients ».

³¹ Bachrach et al., « Assessing the levels of immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection ».

³² Lindon et al., « Metabonomics ».

primaires sont directement impliqués dans les processus indispensables au développement normal et à la reproduction de la cellule. Ce sont par exemple des acides aminés, des acides carboxyliques, des alcools, des antioxydants, des nucléotides, des polyols ou encore des vitamines. Les métabolites secondaires ne participent pas directement aux processus vitaux de la cellule, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes. Ce sont par exemple les antibiotiques et les pigments. L'analyse du métabolome concerne les molécules avec un poids inférieur à 1000 Da. On recense actuellement entre 1000 et 200000 métabolites primaires et secondaires.

Plusieurs applications existent pour la métabolomique :

- En génomique fonctionnelle³³

- En médecine : selon des chercheurs de la Harvard Medical School, les taux sanguins de cinq acides aminés (isoleucine, leucine, valine, tyrosine et phénylalanine) aideraient à prédire le risque de diabète³⁴.

L'analyse exhaustive de différents métabolites présents dans les fluides biologiques (sang, urine) est également utilisée en toxicologie. En oncologie : l'étude de la quantité relative de métabolites entre lignées cancéreuses ou tumeurs permet de déterminer les principales perturbations métaboliques associées à celles-ci. Puisque les métabolites intracellulaires sont des composantes de voies biochimiques impliquées notamment au niveau du catabolisme et de l'anabolisme, il devient donc possible, grâce à la connaissance de la quantité relative des métabolites qui les composent, de cibler des enzymes dont l'activité ou l'expression sont modifiées sous un stade oncogénique, et ainsi permettre une intervention pour rétablir la biochimie propre à une cellule saine. Ces études ont permis de souligner l'importance de voies biochimiques bien connues dans la tumorigenèse (glycolyse, cycle de l'acide citrique)³⁵ ainsi que d'autres dont l'importance n'a été saisie que récemment (glutaminolyse, biosynthèse de la sérine).

L'approche métabolomique consiste à étudier une pathologie ou un traitement au travers de son phénotype métabolique. Ce dernier est caractérisé par les concentrations relatives de l'ensemble des petits métabolites (< 1 kDa) présents dans un liquide biologique, une cellule, un tissu ou un organisme entier. Bien que complémentaire des autres approches en «Omique», la métabolomique possède des avantages permettant de dépasser les contraintes des autres techniques, notamment grâce à une observation qui intervient en aval des modifications cellulaires et donc des différentes chaînes

³³ Romero et al., « Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome ».

³⁴ Wang et al., « Metabolite profiles and the risk of developing diabetes ».

³⁵ Sajjani et al., « Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis ».

métaboliques, permettant une amplification des résultats. L'analyse s'en trouve simplifiée et tout changement observé y est probablement plus significatif, d'autant plus qu'un changement métabolique agit sur un groupe de métabolites. L'expression des gènes, des protéines, et la génomique agissent à des échelles de temps différentes les unes des autres : ceci présente un problème car il devient alors difficile d'établir des liens de causalité entre leurs différentes données. Par ailleurs, le mode de vie influence grandement le métabolome. L'influence de l'environnement sur l'expression des gènes complique la tâche de l'interprétation génique, notamment pour la prédiction de la susceptibilité individuelle à une maladie. L'approche métabolomique contourne ces problèmes en analysant le résultat global de l'ensemble des facteurs d'influence sans présumer de l'effet d'un seul de ces facteurs sur ce résultat.

L'approche métabolomique est une des plus récentes. Elle présente un potentiel de contribution très productif vis-à-vis du diagnostic des parodontites. L'objectif princeps est de réaliser une identification complète des métabolites dans un échantillon biologique donné et ensuite interpréter comment ces profils métabolomiques peuvent changer en fonction de la physiopathologie. Les techniques les plus utilisées dans ce domaine sont la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), la Chromatographie en phase gazeuse-Spectrométrie de Masse (GC-MS) ou la chromatographie en phase liquide-Spectrométrie de Masse (LC-MS).

La Spectrométrie de Masse est une technique plus précise que la spectroscopie standard et nécessite des conditions plus strictes quant à la manipulation et aux traitements des échantillons à analyser. La sensibilité de la spectroscopie de masse est supérieure à celle de la RMN mais la réponse variable de beaucoup de composants dans une solution complexe peut être trompeuse.

La préparation des échantillons dépend de la stratégie d'analyse envisagée. Les produits additionnels utilisés présentent des contraintes dans chaque technique. Pour la spectroscopie RMN du proton appliqué à la salive, le solvant est du D₂O à 10 % par volume et H₂O à 90 % par volume. Dans ce cas un atome d'hydrogène est alors remplacé par un atome de deutérium. Les techniques, utilisées de façon plus confidentielle, impliquant une ionisation par électro-nébuliseur sont incompatibles avec les composants de tampons non volatils car ils peuvent représenter une source de contamination.

La RMN :

La spectroscopie RMN du proton détecte le signal électromagnétique la présence des atomes d'hydrogène qui ont été excités dans l'échantillon. Dans un fluide biologique, toute molécule contenue dans l'échantillon, y compris la quasi-totalité des métabolites, va donner un signal RMN à partir du moment où sa concentration dépasse le seuil de détection, (de l'ordre du μM). Le spectre RMN d'un fluide biologique est ainsi le résultat de la superposition des signaux de tous les métabolites présents dans le fluide.

Selon la technique utilisée et le type de prélèvement étudié des dizaines ou des centaines de métabolites différentes sont détectés simultanément à chaque acquisition. Pour analyser la quantité importante de données ainsi générées, il est fait appel à une approche statistique : l'analyse multivariée. Ce type d'analyse permet de prendre en compte simultanément les variations de toutes les concentrations pour tous les échantillons observés. Il est possible grâce à ce type d'approche d'établir une empreinte métabolique caractéristique d'une pathologie ou d'un traitement. Il existe des banques de données métabolomiques créées sur le modèle existant pour la génomique et la protéomique.

À l'échelle du proton, les phénomènes physiques sont décrits dans le cadre de la mécanique quantique. Le proton, noyau de l'atome d'hydrogène, possède une masse, une charge élémentaire positive et un moment de spin, lui conférant un moment magnétique caractéristique. D'un point de vue macroscopique, et en l'absence de champ extérieur, l'orientation des moments magnétiques élémentaires est aléatoire. Leur somme est donc nulle. Lors de l'application d'un champ extérieur 50.000 fois plus intense que le champ magnétique terrestre, les protons entrent dans un mouvement de précession. Les protons se séparent en deux catégories : les plus nombreux, de spin $+\frac{1}{2}$ ou parallèles au champ, de basse énergie et les moins nombreux, de spin $-\frac{1}{2}$ ou anti parallèles au champ, de haute énergie. Les protons précessent autour de l'axe du champ appliqué avec une vitesse angulaire proportionnelle à son intensité selon le coefficient gyromagnétique γ caractéristique du proton.

Soumis à une radiofréquence dont la longueur d'onde est liée à la vitesse de précession des protons, les protons précessent en phase. C'est le phénomène de résonance. Un certain nombre de protons à spin parallèle vont subir une inversion de spin. Le vecteur moment magnétique somme des moments magnétiques élémentaires va alors s'incliner d'un angle θ par rapport au champ appliqué. Il pourra être décomposé en une composante longitudinale et une composante transversale.

Lorsque l'impulsion cesse, l'énergie est réémise par les protons sous forme d'une onde électromagnétique. C'est le signal RMN. Les composantes longitudinales et transversales reviennent alors à leur état initial avec un temps de relaxation T1 dit spin réseau et T2 dit spin spin. Dans les liquides, ces valeurs sont voisines, de l'ordre de la seconde.

Le spectroscope RMN :

L'action conjuguée d'un champ magnétique intense et d'une impulsion électromagnétique sur un proton permet d'obtenir un pic d'absorption unique. La surface du pic est proportionnelle au nombre de protons, ce qui rend la méthode quantitative. Cependant, l'environnement chimique du proton crée un effet d'écran à l'origine d'un déplacement chimique que l'on exprime en parties par million par rapport au spectre d'une molécule référence, l'acide propionique pour nous. Ce phénomène permet de repérer les différents groupements chimiques et l'étude des structures moléculaires donc l'identification des métabolites. La spectroscopie RMN à haute résolution est un outil établi dans le domaine de la métabolomique, qui a été utilisé de façon extensive afin d'analyser le statut métabolique de biofluides. Ces dernières années, l'amélioration rapide des spectromètres RMN à haute résolution avec l'utilisation d'aimants supraconducteurs permettant d'obtenir des champs magnétiques encore plus puissants couplée à l'utilisation de cryosondes refroidies à l'azote liquide éliminant le bruit dû à l'agitation thermique a permis une avancée importante en termes de sensibilité et de résolution de cet instrument, avec une augmentation jusqu'à 4 fois du rapport signal/bruit, ouvrant l'opportunité d'analyses quantitatives d'une majorité de biofluides (urine, plasma sanguin, liquide céphalo-rachidien, liquide amniotique, bile, larmes, etc.) y compris la salive.

Nous avons eu recours à deux spectromètres pour ce travail : BUNKER AVANCE II (en 2015) et BUNKER AVANCE III 500 MHz (en 2016). Ils rendent possibles un traitement rapide et à la volée des signaux numériques, ce qui permet de se concentrer sur des solvants deutérés complexes qui ont plusieurs pics de solvants. Le spectromètre utilisé en 2016 est muni d'une sonde réfrigérée permettant de conserver la température de l'échantillon avant qu'il ne passe à la phase de l'analyse. Il est aussi muni d'un passeur capable d'analyser 24 échantillons.

Cette technique permet de déterminer simultanément des milliers de composants y compris les biomarqueurs et les métabolites les plus importants à des fins diagnostiques ou à titre d'exemples, de détermination de groupes de patients susceptibles de développer des maladies cardiovasculaires.

Son application diagnostique chez l'homme a été testée sur plusieurs biofluides dont l'urine, le plasma sanguin et le liquide céphalorachidien avec par exemple des résultats dans les utilisations suivantes :

Urine :	<ul style="list-style-type: none"> • Transplantation d'organes (monitorage du risque de rejet suite à greffe rénale) • Détection de la dysfonction rénale • Test de la fonction rénale lors d'empoisonnements • Détermination de désordres métaboliques congénitaux chez les nouveaux nés
Plasma sanguin :	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnostic de dysfonctions organiques • Diabète (dosage du glucose et de corps cétoniques) • Dépistage de cancers, l'applicabilité de cette méthode à ce domaine reste encore discutée
Liquide céphalo-rachidien :	<ul style="list-style-type: none"> • Diagnostic et suivi de l'évolution de la sclérose en plaque, de la maladie de Parkinson et d'Alzheimer • Autres : overdose, méningite bactérienne, diabète, déficit en vitamine B12

2. : ÉTUDE CLINIQUE

2.1. Matériels et Méthodes

2.1.1 Considération éthique

Le protocole a été approuvé, *sous le numéro n°10-047*, par le CEERB de Paris Nord (N°IRB00006477) en accord avec les directives de protection des individus.

2.1.2. Population étudiée et déroulement de l'étude

Les patients ont été recrutés parmi les consultations du Département de Parodontologie de l'hôpital Bretonneau (AP-HP, Université Paris Descartes). Après la confirmation du diagnostic d'une parodontite, les patients répondant aux critères d'inclusion (cf. ci-dessous) se sont vus proposer une participation à l'étude qu'ils ont formalisée par la signature d'un consentement éclairé. La participation à l'étude ne génère qu'un temps supplémentaire de 30 minutes lors de la première et de la dernière séance de prélèvement, les relevés cliniques et les soins étant réalisés de façon habituelle lors de la prise en charge des patients atteints de parodontite. Ce temps additionnel correspond au temps nécessaire à la préparation du matériel, au temps accordé au patient pour secréter 10ml de salive et au temps d'étiquetage et de stockage des échantillons récupérés. Aucun critère de sélection n'a été basé sur l'origine ethnique ni sur le niveau socio-économique.

Chacun des patients inclus a été prélevé à deux reprises. Le premier prélèvement du fluide oral a été effectué lors de l'inclusion du patient, lors du diagnostic et avant la réalisation du traitement étiologique. Le second prélèvement a été réalisé 8 semaines après la dernière séance de thérapeutique initiale, lors de la réévaluation³⁶, ce qui donne une moyenne de 16 semaines entre le diagnostic et la réévaluation.

Alors que l'anamnèse générale a été faite en amont afin de permettre une inclusion éventuelle, après recrutement, ont été relevées, chez les patients qui ont accepté de participer à l'étude, les données démographiques, socio-économiques, les antécédents locaux, les habitudes d'hygiène bucco-dentaire

³⁶ Segelnick et Weinberg, « Reevaluation of initial therapy ».

et le cas échéant le niveau de tabagisme. Le tabagisme a été quantifié en nombre de paquet-années (nombre de paquets de cigarettes fumées par jour multiplié par le nombre d'années de tabagisme).

Tableau 2 : Le statut tabagique

Statut Tabagique	Nombre de paquet-années (PA)
1	Non Fumeur
2	Ancien Fumeur (Date d'arrêt)
3	0-5,2 PA
4	5,3-15 PA
5	15,1-30 PA
6	>30 PA

Source : Auteur

Tableau 3 : tableau synoptique du déroulement de l'étude clinique

T₀	Consultation spécialisée	<ul style="list-style-type: none"> • Motif de consultation • Anamnèse générale • Anamnèse locale et confirmation de l'existence d'une parodontite par recherche de signes d'appels • Prescription (le cas échéant) d'un bilan long cône • Si conformité aux critères d'inclusion, proposition de participation à l'étude après présentation de celle-ci • Signature du consentement éclairé • Si l'heure est compatible avec le prélèvement de fluide oral, ce dernier est réalisé. • Dans le cas contraire un rendez-vous répondant aux critères du dit prélèvement est fixé
T₁	Phase diagnostique (Entre 9:00 et 11:00)	<ul style="list-style-type: none"> • Prélèvement salivaire • Relevé initial d'indices : NDR, PCR, GBI • Examen de l'imagerie • Pose du diagnostic • Elaboration du plan de traitement
	Phase thérapeutique (début)	<ul style="list-style-type: none"> • Corrections des techniques d'hygiène
T₂	Phase thérapeutique (suite)	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle qualité de l'hygiène bucco-dentaire • Elimination des facteurs de rétention (tartre, correction d'obturation débordante...)
T₃	Evaluation de la situation parodontale	<p>Environ 2 semaines après la dernière séance (au minimum) d'élimination des facteurs de rétention, l'obtention d'une HBD satisfaisante étant un prérequis.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relevé d'indices : DP, REC, CAL, BOP • Décision thérapeutique associée : antibiothérapie, débridement
T₄	Réévaluation de la situation parodontale	<p>Environ 8 semaines après la dernière session de débridement sous-gingival :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Second prélèvement salivaire • Relevé d'indices : PD, REC, CAL, BOP • Décision thérapeutique complémentaire

Temps

2.1.3 Critères d'inclusion

Les critères d'inclusion dans cette étude pour les patients atteints de parodontite ont été :

- un âge compris entre 18 et 64 ans
- une couverture par l'assurance maladie
- une absence de pathologie systémique
- aucune prise d'antibiotiques depuis les 3 mois précédents
- aucune consommation régulière d'alcool (supérieure à 3 unités d'alcool par jour chez l'homme et supérieure à 2 unités d'alcool par jour chez une femme)³⁷
- aucune femme ne devait allaiter ou être enceinte.

Par ailleurs, les patients ne devaient pas avoir reçu de traitement parodontal au cours des six derniers mois comme un détartrage, un débridement sous-gingival ou un traitement avec des solutions buccales antiseptiques.

2.1.4 Diagnostic des parodontites

Le diagnostic d'une parodontite est basé sur des critères cliniques et radiographiques. Il dépend des mesures cliniques de la profondeur de poches (PD), la perte d'attache clinique (CAL), et l'identification de perte d'os alvéolaire par des clichés radiographiques³⁸.

Selon les définitions de CDC-AAP (Centers for Disease Control and Prevention – American Academy of Periodontology), revues en 2012³⁹, les patients atteints de parodontite devaient avoir au minimum ≥ 2 sites interproximaux avec une perte d'attache ≥ 3 mm, et ≥ 2 sites interproximaux avec une profondeur de poche ≥ 4 mm (pas sur la même dent) ou un seul site avec une profondeur de poche ≥ 5 mm, définition correspondant à une parodontite superficielle selon les auteurs. L'examen clinique comprend l'évaluation du saignement au sondage (BOP : Bleeding on Probing) afin de caractériser la présence

³⁷ Thun et al., « Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults ».

³⁸ Page et Eke, « Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis ».

³⁹ Eke et al., « Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis ».

d'une inflammation gingivale profonde, l'activité de la parodontite, n'étant pas reflétée uniquement

DIAGNOSTIC	Définition	par la perte
Absence de Parodontite	Aucun signe de parodontite superficielle, modérée ou sévère	
Parodontite superficielle	≥ 2 sites interproximaux avec une perte d'attache ≥3 mm, ≥ 2 sites interproximaux avec une profondeur de poche ≥ 4 mm (pas sur la même dent) ou un seul site avec une profondeur de poche ≥ 5mm	
Parodontite modérée	≥ 2 sites interproximaux avec une perte d'attache ≥4 mm (pas sur la même dent), ou ≥ 2 sites interproximaux avec une profondeur de poche ≥ 5 mm (pas sur la même dent)	
Parodontite sévère	≥ 2 sites interproximaux avec une perte d'attache ≥6 mm (pas sur la même dent) et ≥1 site interproximal avec une profondeur de poche ≥ 5 mm	

d'attache, la profondeur de poche et les mesures de la perte osseuse⁴⁰.

Tableau 4 : Définitions de CDC-AAP (Page & Eke) des parodontites

Source : Auteur

Selon la classification proposée par l'*International Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions*⁴¹, la parodontite chronique (PC) a été décrite comme étant associée à une mauvaise hygiène orale, et où les destructions sont en rapport avec la présence plus ou moins abondante de la plaque bactérienne, parfois accentuée par le concours des facteurs locaux ou systémiques. La progression de la perte d'attache et la résorption de l'os alvéolaire se font sur un mode globalement lent. La forme chronique est plus répandue chez les adultes mais elle peut se déclencher à n'importe quel âge.

À l'inverse, la parodontite agressive (PA) est caractérisée par une destruction rapide du système

⁴⁰ Chaves et al., « Relationship of "bleeding on probing" and "gingival index bleeding" as clinical parameters of gingival inflammation ».

⁴¹ Armitage, « Development of a classification system for periodontal diseases and conditions ».

d'attache chez des patients en bonne sante générale. Le diagnostic clinique de la PA est basé sur l'historique et sur l'évolution clinique en évaluant le ratio âge et taux de destruction. De manière inconstante, la quantité de plaque bactérienne est basse comparée à la sévérité de la destruction parodontale. De plus, une agrégation familiale pourrait exister pour ces entités cliniques.

Les parodontites chroniques ou agressives peuvent être caractérisées par leur sévérité et leur étendue. La parodontite est diagnostiquée comme locale si $\leq 30\%$ des sites sont atteints et généralisée si $>30\%$ des sites sont atteints⁴².

2.1.5 Evaluation des données cliniques

Dans un premier temps une appréciation des antécédents locaux par le relevé du Nombre de dents résiduelles (NDR) et la raison d'éventuelles extractions, une évaluation quantitative du facteur bactérien au moyen du Plaque Control Record et une évaluation de la réponse des tissus superficiels par le Gingival Bleeding Index (GBI)⁴³ ont été réalisées.

Dans un second temps, lors de l'évaluation des résultats des mesures de prophylaxie, soit environ deux semaines après la correction des techniques d'hygiène bucco-dentaire et l'élimination du tartre et autres facteurs de rétention, les indices évaluant les destructions tissulaires ou la présence d'une inflammation profonde ont été relevés à savoir respectivement la Profondeur de Poches (PD), la perte d'attache clinique (Clinical Attachment Loss, CAL), et le saignement au sondage (Bleeding On Probing, BOP). Les paramètres cliniques ont été évalués au niveau de quatre sites sur chaque dent (Mésio-vestibulaire, Disto-vestibulaire, Mésio-lingual et Disto-lingual) en utilisant une sonde parodontale manuelle (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA), avec une « pression de 20g ».

D'après l'OMS⁴⁴, un test pratique pour évaluer cette force est de placer la pointe de la sonde sous l'ongle du pouce et appuyer jusqu'à obtenir un blanchiment.

Les dents exclues de l'examen sont les dents incluses, les racines et les dents avec une jonction amélo-cémentaire indéterminable. La troisième molaire était exclue de l'analyse. Les pertes d'attache (CAL) ont été classés en trois groupes : *CAL superficielle: [3-4mm]*, *CAL modérée : [5-6mm]* et *CAL sévère >6mm*. Pour chaque patient, la valeur la plus haute de la destruction tissulaire était désignée par

⁴² Ibid.

⁴³ Ainamo et Bay, « Problems and proposals for recording gingivitis and plaque ».

⁴⁴ World health organization, « Oral health survey : basic methods ».

CALMAX et la CAL moyenne était la CALMEAN. L'évaluation de la perte osseuse (BL) était réalisée sur un bilan rétro-alvéolaire long cône. La perte osseuse est évaluée selon la classification modifiée de Hugoson & Jordan⁴⁵.

La totalité des paramètres cliniques ainsi que la collecte du fluide oral a été réalisée pour tous les patients par le même examinateur.

2.1.6 Prélèvement du fluide oral

Les échantillons de salive ont été recueillis dans des conditions standardisées. Avant l'évaluation des paramètres cliniques, pour éviter une contamination sanguine, un volume de 10 ml de salive était recueilli pour chaque patient, entre 09:00 et 11:00 et immédiatement stocké à -25°C. Le pH était mesuré systématiquement sur les échantillons. Les patients devaient s'abstenir de manger, boire, mâcher un chewing-gum et de se brosser les dents 2h au minimum avant le prélèvement. Ce dernier en l'absence de stimulation demandait un temps d'environ 5 minutes pour atteindre le volume requis.

2.1.7 Spectroscopie ¹H RMN

Pour l'analyse RMN, les échantillons ont été décongelés à la température ambiante. Un volume de 0,6ml de salive a été placé dans un tube spécifique de 5mm de diamètre avec un 0,1ml de D₂O (deutérium). Une solution tampon : TBS (Tris-Buffered Saline) est rajoutée sur cet échantillon pour pouvoir maintenir le pH à 7,4. Ce tampon est composé de 50mM de Tris et de 150mM de Chlorure de Sodium (NaCl). Le pouvoir tampon est alcalin et varie entre 7,4 et 8,0. Cette solution tampon largement utilisée, est isotonique, non-toxique et permet de respecter les conditions physiologiques.

Les spectres de protons ont été acquis à 50 MHz sur un spectromètre Varian Unity Inova® à 25°C. Un signal est acquis après une impulsion à 90° de points de données à 32K sur une fenêtre de spectre à 5000Hz. Le temps de relaxation est de 4 secondes. Le signal de l'eau a été supprimé par une séquence de pré-saturation par le biais d'une irradiation à faible signal (0,03 W pendant 2 secondes) sur la fréquence signal de l'eau durant le temps de relaxation. Les désintégrations obtenues par la libre induction, obtenus avec 128 transitoires, ont été traitées par le logiciel NMR Pipe. Une transformation de Fourier est appliquée avec une fonction exponentielle pour produire une raie d'élargissement de 1 Hz. Les spectres sont mis en phase et une correction multicentrique linéaire de base est appliquée.

⁴⁵ Hugoson et Jordan, « Frequency distribution of individuals aged 20–70 years according to severity of periodontal disease ».

Chaque spectre a été référencé en utilisant le signal de l'acide propionique (1,04 ppm). La région spectrale entre 0-9 ppm est divisée en 9000 régions spectrales de 0,001-ppm de largeur, appelées Buckets ou tranche de spectre, utilisant un code C interne. La région de l'eau est exclue. Chaque bucket est intégré et échelonné avec la normalisation du quotient probabilistique.

2.1.8 Analyse statistique

Analyse multivariée

L'analyse en composantes principales (PCA/ACP) est réalisée sur les données cliniques et de RMN. L'ACP est utilisée pour évaluer l'homogénéité de la cohorte et de détecter et exclure toute aberration qui serait située en dehors de l'intervalle de confiance de 95% du modèle. Cette analyse est accomplie avec le progiciel statistique SIMCA-P (Umetrics, Umeå, Suède) et en utilisant un code Matlab interne pour détecter toute séparation de groupe basée sur la variabilité du signal.

L'analyse par composante principale (ACP) est la technique la plus utilisée dans l'analyse multivariée. Elle réduit le nombre des dimensions des données et fournit une vue d'ensemble, sans biais, des variables issues de l'ensemble des données. Dans cette technique, les échantillons sont groupés en fonction de leurs similarités/différences sans aucune connaissance préalable de leur appartenance à des classes. L'ACP permet d'identifier les variables qui varient ensemble, beaucoup et systématiquement. Chaque composante principale (CP) est une combinaison linéaire des variables d'origine, et chaque CP est orthogonales (décorrélées) à la CP précédente. Les résultats de l'ACP sont généralement reportés sous le terme de Component Scores et Loadings. Dans un Scores plot, chaque point correspond au spectre d'un échantillon. Les Scores plots fournissent une vue d'ensemble de la totalité des tendances, des groupements et des valeurs aberrantes. Un Loading Plot illustre quelles variables contribuent le plus au niveau du positionnement des échantillons sur les Scores Plot.

Habituellement, l'ACP constitue la première étape de l'analyse des données en métabolomique et est souvent suivie par des analyses supervisées. Ces méthodes utilisent des informations d'appartenance aux classes pour améliorer la séparation des différents groupes d'échantillons et donc détecter la signature métabolomique qui contribue aux classifications (ex : PLS, OPLS). Le progiciel MATLAB est un langage informatique permet de réaliser l'analyse statistique des données numériques issues du spectromètre.

Pour créer ce modèle, les 18 échantillons sont sélectionnés et les patients sont appariés en fonction de leur nom et en fonction du temps afin de pouvoir comparer les deux échantillons d'un même patient. Les spectres sont normalisés pour supprimer la variabilité associée à la dilution des échantillons. Il s'agit de : Quotient Normalization. Sur l'ensemble des spectres, la région incluse entre 4,50 et 6,0 ppm doit être exclue. Cette région est constituée essentiellement du signal de l'eau et l'urée. Elle correspond à un signal qui ne doit pas être pris en compte car les pics attribués à cette région peuvent affecter les autres pics qui sont plus faibles.

2.2. Résultats

Afin de pouvoir réaliser l'étude sur 10 patients, 12 patients ont été recrutés afin de palier au risque de défection. Au total 9 patients (5 femmes et 4 hommes, d'âge moyen : 36,9 ans \pm 10,5 ans) ont pu être suivis selon le protocole initialement défini (tableau 4). Parmi ces patients 5 étaient atteints de parodontite chronique généralisée modérée à sévère, 3 de parodontite agressive généralisée modérée à sévère et 1 de parodontite agressive localisée sévère. Les patients 6, 8 et 9 atteints de parodontite agressive ont reçu une antibiothérapie per os associant amoxicilline (2g/jour) et métronidazole (1,5g/jour) pendant 7 jours. Ce traitement a été instauré juste avant les séances de débridement sous-gingival.

Si la moyenne d'âge globale de notre échantillon de patients était de 37,2 \pm 10,4 ans, les patients atteints de parodontite chronique avaient une moyenne de 44 \pm 6,6 ans versus 28,8 \pm 7,6 ans pour ceux atteints d'une parodontite agressive. Les patients atteints d'une parodontite chronique étaient majoritairement des hommes (4 Hommes vs 1 Femme), tandis que la totalité des parodontites agressives étaient des femmes.

Tableau 5 : Tableau des données cliniques des 9 patients

Patient	Age	Genre	Diagnostic	Temps Clinique 1 et valeur du pH	Temps clinique 2 et valeur du pH
Sp1	51 ans	Homme	Parodontite Chronique généralisée modérée à sévère	15/07/2014 pH = 7,6	14/01/2015
Sp2	47 ans	Homme	Parodontite Chronique généralisée modérée à sévère	12/11/2013	27/05/14
Sp3	41 ans	Femme	Parodontite Chronique généralisée modérée à sévère	03/06/2014 pH=7,2	29/10/2014 pH=7,2
Sp4	29 ans	Femme	Parodontite agressive généralisée modérée à sévère	06/05/2014 pH=6,8	09/09/2014 pH=7
Sp5	34 ans	Homme	Parodontite Chronique généralisée modérée à sévère	17/12/2013 pH=7,4	10/06/2014 pH=7,2
Sp6	18 ans	Femme	Parodontite Agressive localisée sévère	15/07/2015 pH=7,6	20/10/2015 pH=7,8
Sp7	47 ans	Homme	Parodontite Chronique généralisée modérée	01/07/2015 pH = 7,8	02/11/2015 pH= 7,6
Sp8	35 ans	Femme	Parodontite agressive généralisée sévère	06/05/2015 pH=5,6	02/09/2015 pH=7,6
Sp9	33 ans	Femme	Parodontite Agressive généralisée modérée à sévère	08/02/2016 pH= 6,4	20/06/2016 pH=7,6

Source : Auteur

Au niveau des paramètres cliniques si le PCR, indice représentatif de la présence du facteur bactérien, présentait une moyenne globale de 60% celui-ci était respectivement de 71% et de 45% lorsque l'on comparait les parodontites chroniques aux parodontites agressives. Le GBI moyen des patients atteints de parodontite agressive était très diminué par rapport aux patients atteints de parodontite chronique (9,6% vs. 39,2%). La valeur du GBI du patient 8 pourrait être « faussée » car c'est le seul patient qui est fumeur actif (5 PA) puisque le GBI semble souvent diminué chez les fumeurs⁴⁶. Au moment de l'évaluation de la situation parodontale (T¹), la profondeur moyenne des poches était de 3,7±1,1mm pour une perte d'attache moyenne de 4,8±1,4mm et 40% des sites saignaient au sondage. L'association de ces paramètres reflète que les patients étaient bien atteints de parodontites en activité.

Il est intéressant de noter que la mise en œuvre du traitement se traduit par une faible réduction de la profondeur de poche (3,7±1,1mm vs 3,3±0,7mm) mais par contre est associée à une réduction significative du saignement au sondage puisque seulement 23% des sites sont identifiés positifs par opposition aux 40% avant traitement. L'analyse détaillée des résultats montre que le traitement, en se concentrant seulement sur le BOP, indice considéré comme représentatif de la présence d'une inflammation profonde, semble avoir été plus efficace sur les entités chroniques qu'agressives. Le BOP passe de 46% à 22% pour les parodontites chroniques et de 32 à 24% pour les agressives. Il convient néanmoins compte tenu du faible nombre de patients et de la courte durée de cette étude de ne considérer ces résultats que comme des tendances.

⁴⁶ Luzzi et al., « Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers ».

Tableau 6 : Paramètres cliniques des 9 patients

Paramètres	Statut Tabagique	NDR	PCR (%)	GBI (%)	PD T1 (mm)	BOP T1 (%)	CAL T1 (mm)	% CAL 3-4	% CAL ≥5	% CAL ≥6	CALMAX (mm)	PD T2 (mm)	BOP T2 (%)
Patients													
Sp1	1	27	100	89,8	3,4	46,9	6	14	83	65	9	3,3	11,5
Sp2	1	18	58	8,5	3,1	35,8	6,4	19,3	74,7	66,3	14	3,1	20
Sp3	2 (4ans)	21	94,1	34,5	5,3	69	5,4	18,6	80,7	64,3	10	4,1	35
Sp4	1	28	66,1	11,6	2,5	9,8	2,8	24,8	22,2	14,5	8	2,9	7,1
Sp5	1	27	100	41,7	4,7	66,7	5,5	26,5	70,1	50,4	11	4,2	44
Sp6	1	28	26,9	10,2	2,7	54,2	2,7	59	2	1	6	2,9	50
Sp7	1	26	4,8	11,5	3,1	11,5	3,6	59,3	22,2	13,9	8	2	1
Sp8	3	22	16,7	6,8	3,33	22,7	5,2	30,4	37	23,9	10	3,6	27,3
Sp9	2 (10ans)	23	69,6	9,8	5,2	41,3	5,8	13,1	72,7	54,5	16	3,8	10
Moyenne		24,4	59,6	24,9	3,7	39,8	4,8	29,4	51,6	39,3	10,2	3,3	22,9
Ecart Type		3,6			1,1		1,4				3,1	0,7	

Source : Auteur

Il est intéressant de noter également qu'en terme de résultats les patients 4 et 8, tous atteints de parodontite agressive, ne présentent qu'un statu quo si l'on considère la profondeur de poches et/ou le BOP voire une légère aggravation au terme de cette étude.

Analyse statistique

L'ensemble des patients appartient à la sphère centrale de corrélations (cercle blanc central). Il n'y a donc aucune valeur aberrante (Outlier) qui n'a été détectée dans le plan défini par les deux composantes PC1 (21,2%) et PC2 (18,7%).

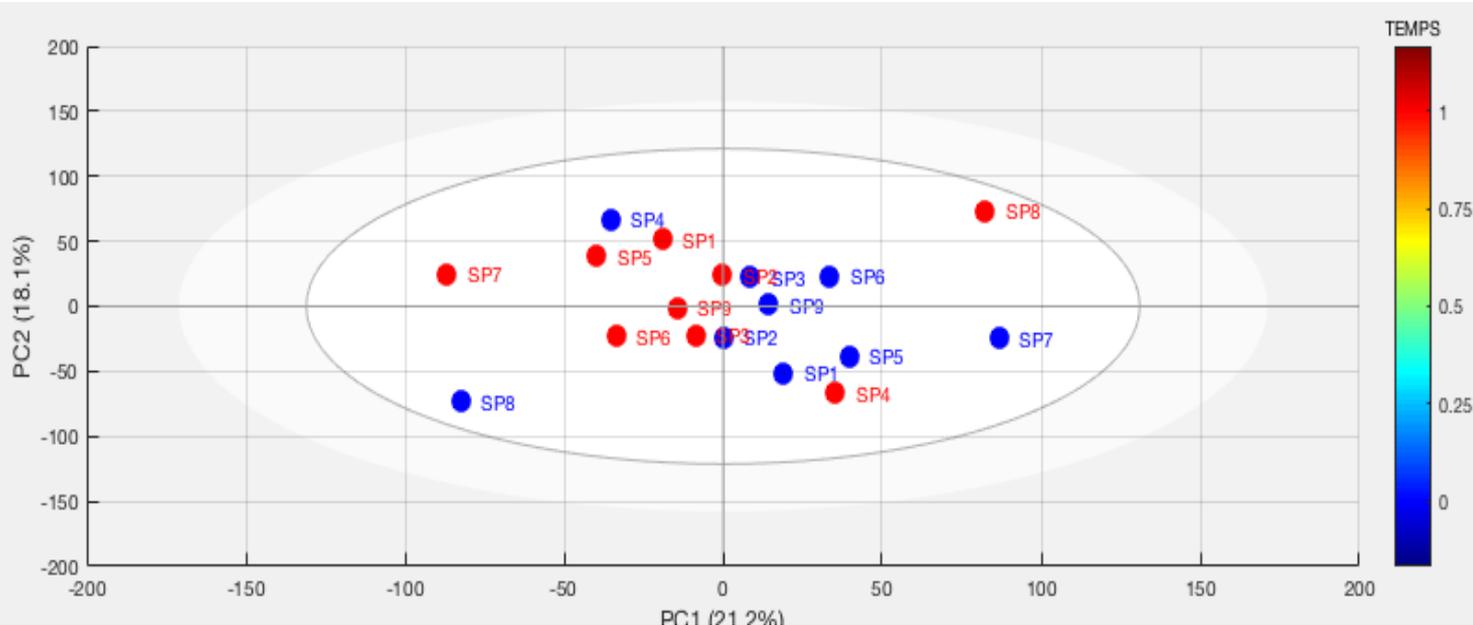
Sur la figure 4, 7 points bleus sur 9 sont situés sur la moitié droite du plan et 7 points rouges sur 9 sont situés sur la partie rouge du plan.

Cette séparation quasi nette entre le temps clinique 1 (avant la réalisation du traitement étiologique) et le temps clinique 2 (lors de la réévaluation) indique qu'il existe une différence dans les métabolites qui sont présents dans chaque prélèvement. Pour rappel, cette distribution est totalement indépendante du logiciel. Il n'y a aucune interférence de la part du logiciel pour obtenir une meilleure discrimination.

La discrimination des patients n'a pu être réalisée sur leur statut quant au diagnostic. En d'autres termes, il n'a pas été possible de séparer dans notre échantillon les parodontites agressives des parodontites chroniques qui semblent se comporter de façon similaire d'un point de vue métabolique avec l'instauration du traitement.

De façon intéressante les deux patients représentés par les points 6 et 8 qui semblent être inversés quant à leur statut, sont également les patients qui présentaient des résultats cliniques mitigés.

Figure 4 : Score Plot



Source : Auteur, avec le logiciel MATLAB

Nous avons attribué au temps clinique 1 (avant traitement) la couleur bleue et au temps clinique 2 (lors de la réévaluation) la couleur rouge. La composante principale PC1 est située sur l'axe des ordonnées et la deuxième PC2 sur l'axe des abscisses. La position des points n'a aucune valeur numérique sur les 2 axes. Pour analyser l'Analyse en Composantes Principales (ACP), il faut observer la distance entre les points d'un même patient et la position des points d'un même temps clinique

Identification des métabolites

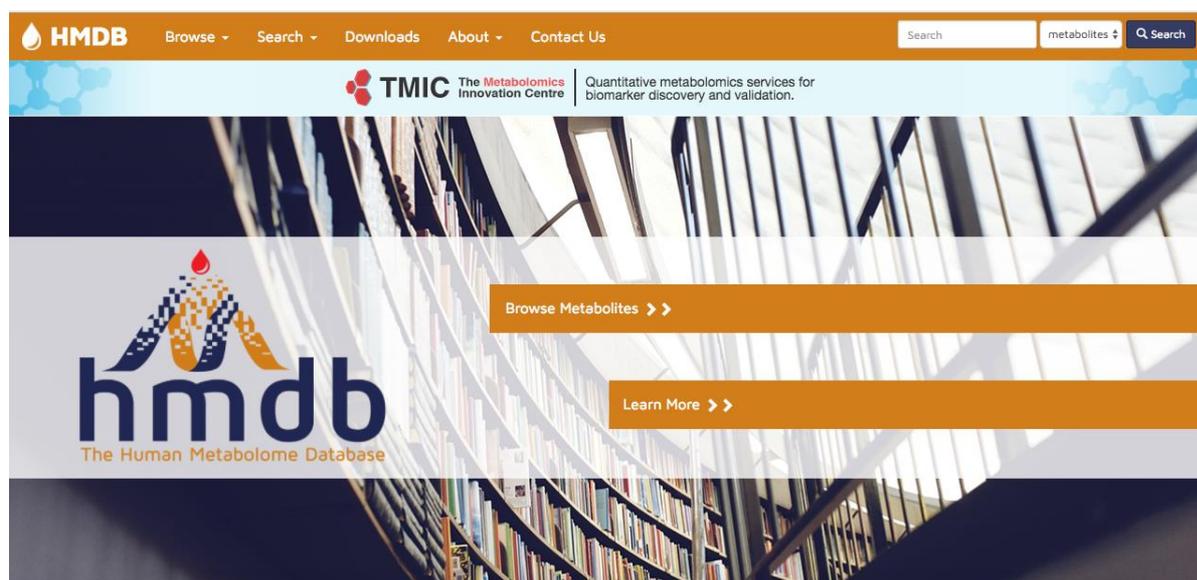
L'identification des métabolites se fait grâce au loadings plot, figure présentée par MATLAB lors de l'analyse du modèle. Les loadings plot représentent la covariance entre la matrice Y-réponse et l'intensité du signal des domaines de spectres variées. Les couleurs ont aussi été utilisées dans le loading

plot en fonction de la corrélation entre l'intensité de chaque tranche de spectre (bucket) correspondant et la variable Y. Les signaux positifs correspondent aux métabolites qui ont augmenté en concentration dans le deuxième temps clinique. Inversement, les signaux négatifs correspondent aux métabolites ayant diminué en concentration. L'identification des tranches du spectre qui ont changé de manière significative entre l'ensemble des spectres du temps clinique 1 et du temps clinique 2 par plusieurs moyens soit en comparant les p-value en comparant la corrélation soit par l'indice AUROC qui correspond à l'aire sous la courbe ROC. L'utilisation de p-value a été privilégiée ici car c'est une valeur statistique utilisée de manière régulière dans le domaine médical.

En se basant sur la première composante principale de l'ACP (Ppca1 = 21,2%), la comparaison entre les deux cliniques se fait en identifiant les changements significatifs entre les deux temps cliniques colorés en rouge ($p < 0,05$ dans un premier temps puis $p < 0,01$ dans un deuxième temps). Si la zone identifiée correspond à un pic référencé et attribué à un métabolite, celui-ci a donc varié de manière significative entre les deux temps cliniques, soit à la baisse soit à la hausse. L'attribution d'un pic se fait grâce à une base de données déjà réalisées sur les métabolites salivaires par ^1H RMN, ou via le site www.hmdb.com (Human Metabolome Database), site qui recense tous les métabolites retrouvés et les classe en fonction de leur statut, de leur origine, en fonction du biofluide auxquels ils se trouvent. Une description succincte, une formule, une structure, une masse, un numéro HMDB et un numéro CAS [séquence biologique et alliage est son numéro d'enregistrement unique auprès de la banque de données Chemical Abstracts Service (CAS), une division de l'American Chemical Society (ACS)] sont fournis pour chaque métabolite.

L'aspect typique du pic de fréquence du métabolite sur les spectres différents dans lesquels se peut se trouver le métabolite est également fourni. (^1H RMN, ^{13}C RMN, 2D RMN, Spectrométrie de Masse. etc.). Le spectre ^1H RMN est le spectre utilisé dans l'étude.

Figure 5 : Capture d'écran de la page d'accueil du site web de The Human Metabolome Database



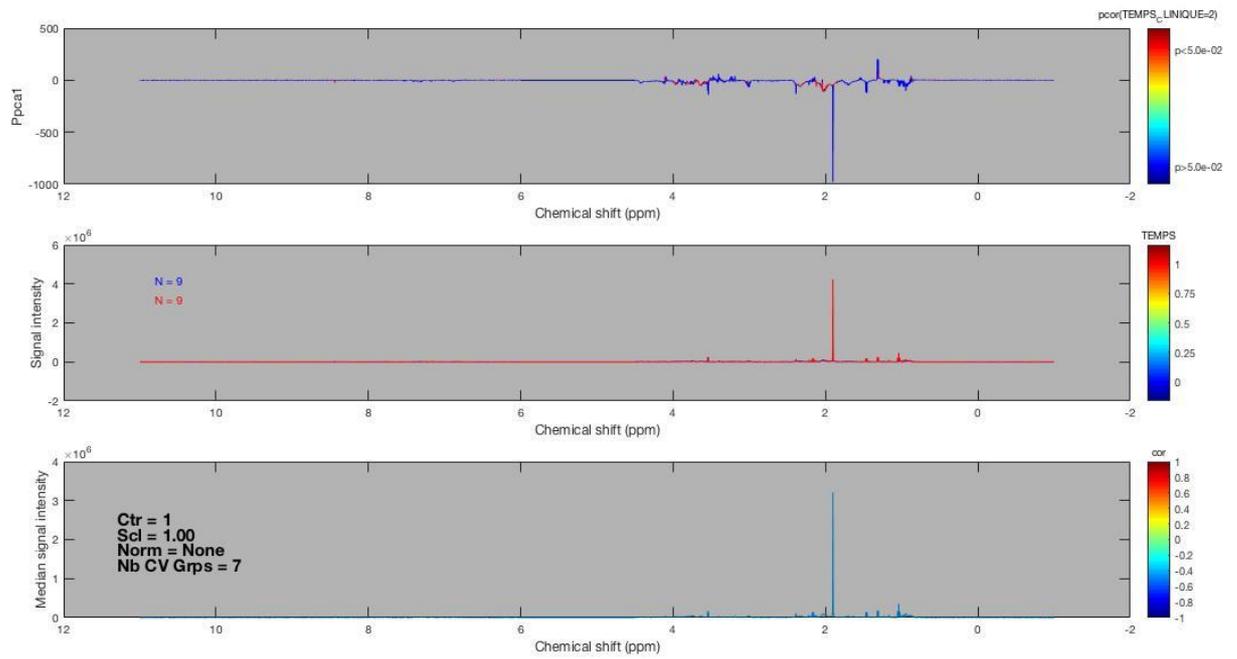
Entre les temps cliniques 1 et 2 nous observons une augmentation significative ($p < 0,05$ notée par * et $p < 0,01$ notée par **) des métabolites suivants :

Tableau 7 : Les métabolites ayant varié de manière significative

Acide Formique ou Formate (acide méthanoïque) **
Acide Lactique ou Lactate *
La Glycine (acide 2-aminoacétique) *
L-Valine (acide 2-amino-3-méthylbutanoïque) *
Acide Succinique ou Succinate (acide butan1,4-dioïque) **
Acide Propionique ou Propionate (acide propanoïque) **
Acide Acétique ou Acétate *
Acide Isovalérique ou Isovalérate (acide 3-méthylbutanoïque) *

Source : Auteur

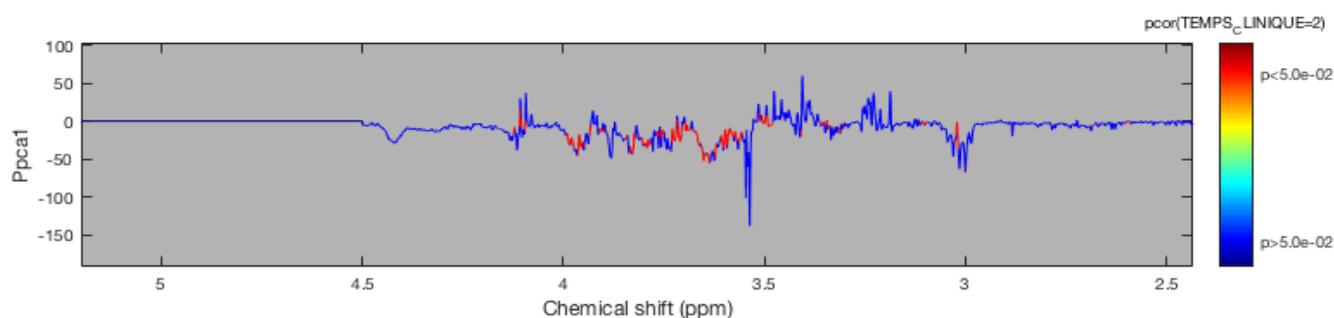
Figure 6 : Loadings Plot (1)



Source : Auteur, avec le logiciel MATLAB

Le premier graphe correspond aux différences significatives (en rouge) des spectres ($p < 0,05$) entre les deux temps cliniques. Le deuxième graphe présente les intensités des signaux provenant des spectres du T1 (Bleu) et T2 (Rouge). Le troisième graphe montre la médiane des intensités des signaux.

Figure 7 : Loadings Plot (2)



Source : Auteur, avec le logiciel MATLAB

Vue élargie sur les Loadings plots. En rouge, la comparaison entre les deux cliniques se fait en identifiant les changements significatifs entre les deux temps cliniques ($p < 0,05$)

Les acides formique, acétique, propionique, isovalérique sont des acides gras à chaîne courte. La chaîne courte consiste en un nombre d'atomes de carbone inférieur à 6. La présence de ces acides gras est associée à un microbiote physiologique⁴⁷.

2.3. Discussion

Modifications métaboliques dans le fluide oral

Cette étude longitudinale s'inscrit dans la continuité de l'étude précédente SPAME 1. En effet, nous avons montré dans cette étude cas-témoins (publication soumise) qu'il était possible de discriminer des patients atteints de parodontite de patients témoins sur la base de leur empreinte métabolomique. Les résultats complémentaires apportés par cette étude longitudinale semblent montrer qu'il existe une modification importante du profil métabolomique faisant suite à l'instauration du traitement (tableau 6 et figure 6). Ces résultats doivent être pondérés compte tenu

⁴⁷ Morrison et Preston, « Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism ».

du faible nombre de patients inclus dans cette étude et de sa durée. Il est nécessaire de vérifier si ces modifications perdurent sur une durée plus importante. En effet, sur la base de la littérature les délais de réévaluation dans cette étude ont été fixés à 8 semaines⁴⁸ après la dernière séance de débridement sous-gingival. Or, il apparaît de plus en plus aujourd'hui que cet intervalle est trop court pour permettre la réinstallation d'un microbiote commensal dans une relation équilibrée avec l'hôte. Ainsi, selon Lindhe et Rylander⁴⁹, le délai nécessaire pour apprécier l'efficacité d'un traitement pourrait être porté à 6 mois.

Les résultats cliniques de notre échantillon semblent aller dans ce sens en considérant deux points. D'une part les indices cliniques montrent une diminution significative du saignement au sondage (BOP), diminution qui n'est pas assortie d'une réduction marquée de la profondeur de poches. Il est potentiellement possible que les tissus requièrent un délai plus important pour retrouver leur architecture normale. D'autre part les résultats semblent différents entre le groupe des parodontites agressives et celui des parodontites chroniques. Ces dernières reposant plutôt sur un modèle associé à une charge bactérienne importante, la réduction quantitative de ce facteur permettrait un retour à l'homéostasie plus rapide que dans le cadre des parodontites agressives où la notion de terrain est un des éléments déterminants à côté d'un facteur bactérien qui n'est que l'étincelle qui allume la mèche.

Par ailleurs une étude menée sur 6 mois montre la cinétique de recolonisation des sites⁵⁰ et il semble cohérent de vérifier si les changements observés dans notre étude au niveau des signatures métaboliques perdurent.

En ce qui concerne les deux patients qui présentent des profils inversés identifiables sur le score plots sous les numéros 4 et 8, une erreur de manipulation lors du stockage de l'échantillon, de sa préparation ou de l'identification des spectres ne peut être écartée. Au niveau clinique, en se référant à la classification en vigueur des maladies parodontales et aux valeurs des indices recueillis, le diagnostic de parodontites agressives généralisées avec des sites en activité, semble s'imposer pour ces deux patients. Une autre hypothèse peut se référer à une spécificité de la pathologie parodontale dont sont atteints ces deux patients, spécificité en terme de mécanismes de destruction tissulaire ou d'écologie microbienne se traduisant par des profils métaboliques suffisamment distincts pour qu'ils ne puissent être intégrés dans le modèle construit à partir du résultat des autres échantillons.

⁴⁸ Segelnick et Weinberg, « Reevaluation of initial therapy ».

⁴⁹ Lindhe, Karring, et Lang, *Clinical periodontology and implant dentistry*.

⁵⁰ Qiqiang, Huanxin, et Xuejun, « Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy ».

Les données cliniques (tableau 5) ne reflètent pas d'amélioration sensible à la suite du traitement chez ces deux patients voire une très légère aggravation. Toutefois cette dernière appréciation doit être pondérée compte tenu du caractère opérateur-dépendant d'un sondage qui cependant a été réalisé par le même praticien.

Statistiquement aucun modèle séparant les parodontites agressives des parodontites chroniques n'a pu être construit. Nous pourrions en déduire qu'aucune différence significative dans les signatures métabolomiques n'a pu être mise en évidence entre les parodontites agressives et les parodontites chroniques. Cependant, compte tenu du petit nombre de patients inclus dans cette étude pilote, il n'est pas possible d'en tirer des conclusions définitives. Néanmoins, il est intéressant de rapprocher ces résultats avec ceux obtenus par une étude transversale précédente (26 cas vs 25 témoins) dans laquelle il n'était pas mis en évidence de différence significative entre les parodontites chroniques et agressives en terme de signature métabolique (publication soumise).

Identification des métabolites

Une modification de l'empreinte métabolique a été clairement identifiée dans le fluide oral faisant suite à l'instauration du traitement. En particulier une augmentation significative du lactate et de l'acétate (tableau 5). Les empreintes métaboliques observées dans la salive peuvent provenir en premier lieu des mécanismes de destruction tissulaire. En second lieu ces signatures peuvent trouver leur origine dans les produits du métabolisme bactérien. En ce cas les changements observés seraient issus de modifications dans la composition du microbiote. Ainsi les niveaux augmentés de certains acides gras à chaîne courte (SCFAs) comme l'acide lactique ou acétique reflèteraient ce « basculement » bactérien. Dans notre étude précédente, nous avons montré que les patients atteints de parodontites présentaient une empreinte métabolique associée à une forte réduction des niveaux d'acétate et de lactate par rapport aux témoins sains. Or au niveau de la cavité buccale, l'acide lactique provient de bactéries considérées comme des commensaux qui sont associées à la santé comme dans d'autres niches muqueuses. Ainsi comme plusieurs études l'ont montré, le microbiote commensal observé au niveau vaginal de femmes en bonne santé est fréquemment dominé par ces espèces produisant entre autre de l'acide lactique. Ces bactéries contribuent à un équilibre au sein du microbiote commensal par des mécanismes de compétition où interviennent l'adhésion aux cellules épithéliales ou la production de composants antimicrobiens. L'acide lactique

est ainsi capable d'inhiber la croissance de bactéries notamment anaérobies Gram-négative⁵¹. Ces relations symbiotiques supposent qu'il existe un dialogue étroit avec l'hôte. Il semblerait cohérent qu'un traitement permette une recolonisation par ces bactéries et que l'efficacité de la thérapeutique puisse être appréciée par le « retour » de ces espèces bactériennes commensales, encore faut-il que cette recolonisation perdure à long terme.

L'étude SPAME1 a montré la capacité de cette technique à séparer les patients sains des patients atteints de parodontites sur la base de leur empreinte métabolique au niveau du fluide oral. Cette étude pilote qui bien que ne portant que sur quelques cas confirme néanmoins cette capacité et par ailleurs montre que cette technique présente une certaine sensibilité puisqu'elle permet de visualiser des changements dans les profils métaboliques consécutivement à la mise en place d'un traitement et ce de façon assez précoce. En effet, les seconds prélèvements n'ont été réalisés que huit semaines après la fin du traitement initial ce qui d'un point de vue écologique peut paraître très tôt notamment dans des situations sévères où subsistent des poches profondes. Les changements métaboliques semblent refléter de profondes modifications dans les populations bactériennes, les métabolites permettant la discrimination semblant plutôt associés au métabolisme bactérien, ainsi que l'avait montré la précédente étude. La validation de cette technique de métabolomique par RMN va permettre de construire des études avec un échantillon de population plus large et un monitoring plus complet sur du long terme. En effet, ces deux études assoient la crédibilité de la technique quant à la recherche de financements. Par ailleurs, complétées par de la protéomique et de la métagénomique, il deviendrait possible d'avoir une vision plus complète des mécanismes en jeu et d'identifier des marqueurs biologiques propres à intercepter très tôt une parodontite et à confirmer l'efficacité d'un traitement.

⁵¹ Alakomi et al., « Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane ».

Conclusion

Les sciences en Omique représentent une opportunité quant à la compréhension des mécanismes physiopathologiques intervenant dans les maladies parodontales et ce par la capacité de ces approches à traiter un nombre important de données à un coût maîtrisée à partir de fluides biologiques aisés à recueillir. Cette étude préliminaire longitudinale menée sur 9 patients, comme l'étude cas-témoins précédente, ont permis de valider ce protocole de métabolomique faisant appel à la RMN. En effet, dans ces deux études il a été possible d'une part de séparer les patients atteints d'une parodontite des patients témoins sur la base de leur empreinte métabolique et d'autre part de mettre en évidence les modifications de ces empreintes à la suite d'un traitement. Les métabolites identifiés semblent en rapport avec le métabolisme bactérien et signalent probablement des changements dans les populations bactériennes. En effet, à titre d'exemple la thérapie parodontale s'accompagne d'une augmentation importante du lactate. Or l'acide lactique est issu du métabolisme de bactéries en relation avec la santé parodontale. De nombreux métabolites restent encore à identifier. La mise en évidence de biomarqueurs signalant une parodontite active semble donc théoriquement possible en utilisant cette approche. Il est nécessaire pour cela de prévoir une étude à plus grande échelle tant en terme de population que de durée.

Bibliographie

- Ainamo, J., et I. Bay. « Problems and proposals for recording gingivitis and plaque ». *International dental journal* 25, no 4 (1975): 229- 35.
- Alakomi, H.-L., E. Skyttä, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, et I. M. Helander. « Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane ». *Applied and environmental microbiology* 66, n° 5 (2000): 2001–5.
- Armitage, G. C. « Development of a classification system for periodontal diseases and conditions ». *Annals of periodontology* 4, n° 1 (1999): 1–6.
- Bachrach, G, Z Muster, I Raz, G Chaushu, A Stabholz, G Nussbaum, M Gutner, et al. « Assessing the levels of Immunoglobulins in the saliva of diabetic individuals with periodontitis using checkerboard immunodetection: salivary checkerboard immunodetection ». *Oral Diseases* 14, n° 1 (2007): 51- 59. doi:10.1111/j.1601-0825.2006.01345.x.
- Chaves, E. S., R. C. Wood, A. A. Jones, D. A. Newbold, M. A. Manwell, et K. S. Kornman. « Relationship of “bleeding on probing” and “gingival index bleeding” as clinical parameters of gingival inflammation ». *Journal of clinical periodontology* 20, n° 2 (1993): 139–43.
- Duchemann, B., M. N. Triba, D. Guez, M. Rzeznik, P. Savarin, H. Nunes, D. Valeyre, et al. « Nuclear magnetic resonance spectroscopic analysis of salivary metabolome in sarcoidosis. » *Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung disease* 33, n° 1 (2016): 10–16.
- Eke, P. I., R. C. Page, L. Wei, G. Thornton-Evans, et R. J. Genco. « Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis ». *Journal of periodontology* 83, n° 12 (2012): 1449- 54. doi:10.1902/jop.2012.110664.
- Gowda, GA. Nagana, S. Zhang, H. Gu, V. Asiago, N. Shanaiah, et D. Raftery. « Metabolomics-based methods for early disease diagnostics ». *Expert review of molecular diagnostics* 8, n° 5 (2008): 617- 33. doi:10.1586/14737159.8.5.617.
- Gupta, A., V. Govila, et A. Saini. « Proteomics – the research frontier in periodontics ». *Journal of oral biology and craniofacial research* 5, no 1 (2015): 46- 52. doi:10.1016/j.jobcr.2015.01.001.
- Herath, T., R. P. Darveau, C. J. Seneviratne, C-Y. Wang, Y. Wang, et L. Jin. « Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas Gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF-κB signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts ». *PLoS ONE* 8, n° 3 (2013): e58496. doi:10.1371/journal.pone.0058496.
- Hodge, P., et B. Michalowicz. « Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults ». *Periodontology 2000* 26, n° 1 (2001): 113–34.
- Hugoson, A., et T. Jordan. « Frequency distribution of individuals aged 20–70 years according to severity of periodontal disease ». *Community dentistry and oral epidemiology* 10, n° 4 (1982): 187–92.
- Kaczor-Urbanowicz, K. E., C., M. Carreras-Presas, K. Aro, M. Tu, F. Garcia-Godoy, et D. TW Wong. « Saliva diagnostics – current views and directions ». *Experimental biology and Medicine* 242, n° 5 (2017): 459- 72. doi:10.1177/1535370216681550.
- Kinane, D. F., et T. C. Hart. « Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease ». *critical reviews in oral biology & medicine* 14, n° 6 (2003): 430–449.
- Kornman, K. S., A. Crane, H. Y. Wang, F. S. di Giovine, M. G. Newman, F. W. Pirk, T. G. Wilson, et al. « The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease ». *Journal of clinical periodontology* 24, n° 1 (1997): 72- 77.
- Lavu, V., V. Venkatesan, B. Venkata K. S. Lakka, P. Venugopal, S. F. D. Paul, et S. R. Rao. « Polymorphic regions in the Interleukin-1 Gene and susceptibility to chronic periodontitis: a genetic association study ». *Genetic testing and molecular biomarkers* 19, n° 4 (2015): 175- 81. doi:10.1089/gtmb.2014.0275.

- Lindhe, J., T. Karring, et N. P. Lang, éd. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 4th ed. Oxford, UK ; Malden, MA: Blackwell, 2003.
- Lindon, J. C., J. K. Nicholson, E. Holmes, et J. R. Everett. « Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids ». *Concepts in magnetic resonance* 12, n° 5 (2000): 289- 320. doi:10.1002/1099-0534(2000)12:5<289::AID-CMR3>3.0.CO;2-W.
- Luzzi, L. Tavares, S. Greggi, E. Passanezi, A. Sant'Ana, J. Lauris, et T. Cestari. « Evaluation of clinical periodontal conditions in smokers and non-smokers ». *Journal of Applied Oral Science* 15, n° 6 (2007): 512–17.
- Morrison, D. J., et T. Preston. « Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism ». *Gut microbes* 7, n° 3 (2016): 189- 200. doi:10.1080/19490976.2015.1134082.
- Nicholson, J., K., et J., C. Lindon. « Systems biology: metabonomics ». *Nature* 455, n° 7216 (2008): 1054–1056.
- O'Leary, T. J., R. B. Drake, et J. E. Naylor. « The Plaque control record ». *Journal of periodontology* 43, n° 1 (1972): 38- 38. doi:10.1902/jop.1972.43.1.38.
- « OMICS-ETHICS » Research group "What we do". Consulté le 16 avril 2017. <http://www.omics-ethics.org/en/what-is-omics-science>.
- Page, R., C., et P., I. Eke. « Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis ». *Journal of periodontology* 78, n° 7s (2007): 1387- 99. doi:10.1902/jop.2007.060264.
- Pellat B. « Salives et milieu buccal ». EMC Médecine buccale, [28-080-A-10]. Paris : Elsevier Masson, 2010.
- Pfaffe, T., J. Cooper-White, P. Beyerlein, K. Kostner, et C. Punyadeera. « Diagnostic potential of saliva: current state and future applications ». *Clinical chemistry* 57, n° 5 (2011): 675- 87. doi:10.1373/clinchem.2010.153767.
- Qiqiang, L., M. Huanxin, et G. Xuejun. « Longitudinal study of volatile fatty acids in the gingival crevicular fluid of patients with periodontitis before and after nonsurgical therapy: *volatile fatty acids in gingival crevicular fluid* ». *Journal of periodontal research* 47, n° 6 (2012): 740- 49. doi:10.1111/j.1600-0765.2012.01489.x.
- Rangbulla, V., A. Nirola, M. Gupta, P. Batra, et M. Gupta. « Salivary IgA, interleukin-1 β and MMP-8 as salivary biomarkers in chronic periodontitis patients ». *Chinese journal of dental research*, n° 1 (2017): 43–51. doi:10.3290/j.cjdr.a37741.
- Romero, P., J. Wagg, M., L. Green, D. Kaiser, M. Krummenacker, et P. D. Karp. « Computational prediction of human metabolic pathways from the complete human genome ». *Genome biology* 6, n° 1 (2004): R2.
- Sajnani, K., F. Islam, R., A. Smith, V. Gopalan, et A., K-Y Lam. « Genetic alterations in Krebs cycle and its impact on cancer pathogenesis ». *Biochimie* 135 (2017): 164- 72. doi:10.1016/j.biochi.2017.02.008.
- Segelnick, S., L., et M., A. Weinberg. « Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? » *Journal of periodontology* 77, n° 9 (2006): 1598–1601.
- Singh, P., N. Gupta, A. Bey, et S. Khan. « Salivary TNF-alpha: A potential marker of periodontal destruction ». *Journal of indian society of periodontology* 18, n° 3 (2014): 306. doi:10.4103/0972-124X.134566.
- Sofaer, J. A. « Genetic approaches in the study of periodontal diseases ». *Journal of clinical periodontology* 17, n° 7 Pt 1 (1990): 401- 8.
- Souza, A., B. de, R., T., P. Okawa, C., O. Silva, et M., G. Araújo. « Short-term changes on C-reactive protein (CRP) levels after non-surgical periodontal treatment in systemically healthy individuals ». *Clinical oral investigations* 21, n° 1 (2017): 477- 84. doi:10.1007/s00784-016-1817-0.
- Thun, M., J., R. Peto, A., D. Lopez, J., H. Monaco, S., J. Henley, C., W. Heath Jr, et R. Doll. « Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly US adults ». *New england journal of medicine* 337, n° 24 (1997): 1705–14.

- Van Dyke, T., E., et S. Dave. « Risk factors for periodontitis ». *Journal of the international academy of periodontology* 7, n° 1 (2005): 3.
- Wang, T., J., M., G. Larson, R., S. Vasan, S. Cheng, E., P. Rhee, E. McCabe, G., D. Lewis, et al. « Metabolite profiles and the risk of developing diabetes ». *Nature medicine* 17, n° 4 (2011): 448- 53. doi:10.1038/nm.2307.
- Wilke, R. A., R. K. Mareedu, et J. H. Moore. « The pathway less traveled: moving from candidate genes to candidate pathways in the analysis of genome-wide data from large scale pharmacogenetic association studies ». *Current pharmacogenomics and personalized medicine (formerly current pharmacogenomics)* 6, n° 3 (2008): 150–159.
- World Health Organization. « Oral health survey : basic methods ». World health organization, 1997. <http://www.who.int/iris/handle/10665/41905>.
- Zhang, L., B., S. Henson, P., M. Camargo, et D., T. Wong. « The clinical value of salivary biomarkers for periodontal disease ». *Periodontology 2000* 51, n° 1 (2009): 25–37.
- Zhang, Q., B. Chen, D. Zhu, et F. Yan. « Biomarker levels in gingival crevicular fluid of subjects with different periodontal conditions: a cross-sectional study ». *Archives of oral biology* 72 (2016): 92- 98. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.08.020.
- Zhou, X., X. Liu, J. Li, R., M. Aprecio, W. Zhang, et Y. Li. « Real-time PCR quantification of six periodontal pathogens in saliva samples from healthy young adults ». *Clinical oral investigations* 19, n° 4 (2015): 937- 46. doi:10.1007/s00784-014-1316-0.

Table des figures

Figure 1 : L'évolution des moyens de diagnostic en parodontologie depuis les années 60	6
Figure 2 : La composition du fluide oral.....	8
Figure 3 : Les glandes salivaires	10
Figure 4 : Score Plot.....	32
Figure 5 : Capture d'écran de la page d'accueil du site web de The Human Metabolome Database	33
Figure 6 : Loadings Plot (1)	35
Figure 7 : Loadings Plot (2)	36

Table des tableaux

Tableau 1 : Les différents biomarqueurs salivaires	14
Tableau 2 : Le statut tabagique	21
Tableau 3 : tableau synoptique du déroulement de l'étude clinique	22
Tableau 4 : Définitions de CDC-AAP (Page & Eke) des parodontites	24
Tableau 5 : Tableau des données cliniques des 9 patients	29
Tableau 6 : Paramètres cliniques des 9 patients	31
Tableau 7 : Les métabolites ayant varié de manière significative	34

Vu, le Directeur de thèse

Vu, le Doyen de la Faculté de Chirurgie dentaire
de l'Université Paris Descartes

Docteur Dominique GUEZ

Professeur Louis MAMAN

Vu, le Président de l'Université Paris Descartes

Professeur Frédéric DARDEL

Pour le Président et par délégation,

Le Doyen Louis MAMAN

Métabolome salivaire et parodontites : modifications de la signature métabolomique obtenue par résonance magnétique nucléaire consécutives à une thérapeutique parodontale

Résumé :

La parodontite est une maladie infectieuse à composante inflammatoire qui atteint les tissus de soutien de la dent de manière irréversible. Des changements histopathologiques comme la destruction du ligament alvéolo-dentaire, la création d'une poche parodontale, la destruction osseuse convergent vers la perte de la dent à terme si un traitement n'est pas entrepris. La susceptibilité et la vitesse d'évolution de la maladie sont deux notions moins claires jusqu'à présent malgré les efforts dans les domaines de la génomique, transcriptomique, protéomiques et métabolomiques. Ces derniers n'ont pas encore trouvé un biomarqueur objectif des maladies parodontales qui puisse évaluer leur incidence, leur diagnostic ou leur pronostic. La salive et le fluide gingival ont été beaucoup analysés récemment pour leur potentielle aide au diagnostic. Dans ce travail, nous nous focaliserons sur l'analyse par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de la salive en réalisant un suivi longitudinal de neuf patients et l'analyse du profil métabolomique avant et après traitement. Les résultats de cette étude montrent l'existence d'un changement au niveau des métabolites, notamment une augmentation de l'acétate, du valérate, du succinate, du propionate, du lactate, du formate, de la valine, de la glycine.

Discipline :

Parodontologie

Mots clés fMesh et Rameau :

Métabolomique -- Dissertations universitaires ; Spectroscopie par résonance magnétique -- Dissertations universitaires ; Parodontite -- thérapie -- Dissertations universitaires ; Métabolites -- Thèses et écrits académiques

Université Paris Descartes
Faculté de Chirurgie dentaire
1, rue Maurice Arnoux
92120 Montrouge