HAL
open science

Variation de l'expression des formes de rage au cours de la parondontite chronique

Laurent Detzen

▶ To cite this version:

Laurent Detzen. Variation de l'expression des formes de rage au cours de la parondontite chronique. Sciences du Vivant [q-bio]. 2017. dumas-02337854

HAL Id: dumas-02337854
https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02337854v1

Submitted on 29 Oct 2019

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.

Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE
5, Rue Garancière 75006 PARIS

Année 2017 Thèse N°: 5177

N° attribué par la bibliothèque : 2017PA07G066

THESE pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR

en CHIRURGIE DENTAIRE

présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2017

par DETZEN Laurent

VARIATION DE L'EXPRESSION DES FORMES DE RAGE AU COURS DE LA PARODONTITE CHRONIQUE

Directeur de thèse : Mr le Professeur BOUCHARD

Co-directeur de thèse : Mme le Professeur GOSSET

J U R Y

M. le Professeur Philippe BOUCHARD	Président
Mme le Docteur M.-Hélène COTTET	Assesseur
M. le Professeur Olivier FROMENTIN	Assesseur
M. le Docteur Francis MORA	Assesseur
Mme le Docteur Hélène RANGÉ	Assesseur
Mme le Professeur Marjolaine GOSSET	Membre Invité
Mme le Professeur Evanthia LALLA	Membre Invité

UNIVERSITE PARIS DIDEROT - PARIS 7

FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE
5, Rue Garancière 75006 PARIS

Année 2017 Thèse N°:

N° attribué par la bibliothèque :

THESE pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR

en CHIRURGIE DENTAIRE

présentée et soutenue publiquement le 13 décembre 2017

par DETZEN Laurent

né le 5 Avril 1990

VARIATION DE L'EXPRESSION DES FORMES DE RAGE AU COURS DE LA PARODONTITE CHRONIQUE

Directeur de thèse : Mr le Professeur BOUCHARD

Co-directeur de thèse : Mme le Professeur GOSSET

J U R Y

M. le Professeur Philippe BOUCHARD	Président
Mme le Docteur M.-Hélène COTTET	Assesseur
M. le Professeur Olivier FROMENTIN	Assesseur
M. le Docteur Francis MORA	Assesseur
Mme le Docteur Hélène RANGÉ	Assesseur
Mme le Professeur Marjolaine GOSSET	Membre Invité
Mme le Professeur Evanthia LALLA	Membre Invité

U N I V E R S I T E P A R I S D I D E R O T – P A R I S 7

Présidente de l'Université :	Mme la Professeure Christine CLERICI
Doyenne de l'U.F.R. d'Odontologie :	Mme la Professeure Ariane BERDAL
Directrice Générale des Services :	Madame Pascale SAINT-CYR

J U R Y

M. le Professeur Philippe BOUCHARD	Président
Mme le Docteur M.-Hélène COTTET	Assesseur
M. le Professeur Olivier FROMENTIN	Assesseur
M. le Docteur Francis MORA	Assesseur
Mme le Docteur Hélène RANGÉ	Assesseur
Mme le Professeur Marjolaine GOSSET	Membre Invité
Mme le Professeur Evanthia LALLA	Membre Invité

M. le Professeur Philippe BOUCHARD Docteur en Chirurgie Dentaire
Diplôme de Doctorat
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect pour l'excellence de vos enseignements, la qualité de votre encadrement et votre soutien.

Mme le Docteur M.-Hélène COTTET Docteur en Chirurgie Dentaire
Diplôme de Doctorat
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

M. le Professeur Olivier FROMENTIN Docteur en Chirurgie Dentaire
Diplôme de Doctorat
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect pour votre enseignement et votre disponibilité tout au long de cet internat.

M. le Docteur Francis MORA Docteur en Chirurgie Dentaire
Diplôme de Doctorat
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma sincère estime pour la transmission sans réserve de votre savoir-faire et votre indéfectible soutien.

Mme le Docteur Hélène RANGÉ Docteur en Chirurgie Dentaire
Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de mon profond respect pour votre disponibilité et votre écoute tout au long de cet internat.

Mme le Professeur Marjolaine GOSSET Docteur en Chirurgie Dentaire
Diplôme de Doctorat
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Qui me fait l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements et de ma profonde gratitude pour votre encadrement et votre enseignement.

Mme le Professeur Evanthia Lalla Docteur of Dental Medecine
Doctoral Degree
Professor of Dental Medicine

Who did me the honor of being part of this thesis' jury. I would like to express my special appreciation and thanks; you have been a tremendous mentor for me. Your advices on both research and career have been priceless.

REMERCIEMENTS

I would like to express my special appreciation and thanks to Pr Panos Papapanou for his warm welcome in the department and laboratory of periodontics ; Columbia University College of Dental Medicine, for his support, the transmission of his knowledge and his great availability.

I would like to thanks Dr Bin Cheng of the department of Biostatistics , Columbia university, for the brillant management of statistical analyses.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'a témoigné Madame Celenti et l'aide inestimable de monsieur le Dr Chen à la paillasse au sein du laboratoire du service parodontologie de l'Université de Columbia.

Je tiens à remercier chaleureusement madame le Professeur Catherine Chaussain, monsieur le professeur Louis Maman et monsieur le docteur Yves Bolender, pour leur soutien inestimable, et sans qui ce travail n'aurait pas abouti.

Je tiens à remercier enfin l'équipe administrative de l'université Paris Diderot et celle de l'université de Columbia notamment monsieur Grégoire Aupiais et madame Annick Ligot pour leur efficience dans les démarche qui ont accompagné ce projet.

SOMMAIRE

I. PREFACE 3

II. INTRODUCTION 4

II.1. LES PARODONTITES 4
II.1.1. DEFINITION 4
II.1.2. CLASSIFICATION DES MALADIES PARODONTALES 4
II.1.3. PREVALENCE DES MALADIES PARODONTALES 6
II.1.4. PHYSIOPATHOLOGIE DES PARODONTITES 6
II.2. IMPACT SYSTEMIQUE DES PARODONTITES 8
II.2.1. PATHOLOGIES SYSTEMIQUES ET PARODONTITES 8
II.2.2.VOIE DE L'INFLAMMATION 8
II.2.3. LES BIOMARQUEURS DES PARODONTITES 9
II.2.4. LE DIABETE ET LES MALADIES PARODONTALES 10
II.2.5. MALADIES CARDIOVASCULAIRES (MCV) 13
II.3. LE RECEPTEUR SPECIFIQUE DES PRODUITS TERMINAUX DE GLYCOSYLATION AVANCEE ET SES LIGANDS 14
II.3.1. LA STRUCTURE DE RAGE 14
II.3.2. LES FORMES SOLUBLES ET ISOFORMES DE RAGE 16
II.3.3. LES LIGANDS DE RAGE 18
II.4. RAGE, L'INFLAMMATION ET LE STRESS OXYDANT 22
II.4.1. EXPRESSION DE RAGE 22
II.4.2.VOIES DE SIGNALISATION DE RAGE 22
II.4.3. ROLE DE RAGE DANS L'INFLAMMATION ET LES PATHOLOGIES ASSOCIEES 24
II.5. AGER1 UN NOUVEAU RECEPTEUR D'INTERET. 25
II.6. RAGE ET LES PARODONTITES 26
II.7. LES FORMES SOLUBLES DE RAGE : UN INTERET GRANDISSANT 29
II.7.1.LE TRAITEMENT PAR SRAGE 30
II.7.2. SRAGE/ESRAGE : UN NOUVEAU BIOMARQUEUR D'INTERET ? 30
II.8. OBJECTIFS 32

III. PATIENTS ET METHODES 33

III.1. PARTICIPANTS 33
III.1.1. SELECTION DES PATIENTS 33
III.1.2. EXAMEN CLINIQUE 34
III.2. RECUEIL DES ECHANTILLONS 35
III.2.1. COLLECTION SANGUINE 35
III.2.2. COLLECTION SALIVAIRE 35
III.2.3. COLLECTION DE BIOPSIE GINGIVALE 36
III.3. CONCENTRATION SERIQUE ET SALIVAIRE DE SRAGE, ESRAGE ET HMGB1 PAR TEST ELISA 37
III.3.1 PRINCIPE 37
III.3.2. PROTOCOLE 38
III.4. QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION GENIQUE RELATIVE DE RAGE ET AGER1 PAR TRANSCRIPTASE INVERSE ET QPCR. 41

III.4.1. PRINCIPE 41
III.4.2. PROTOCOLE 41
III.5. HISTOLOGIE 43
III.5.1. COLORATION A L'HEMATOXYLINE -ÉOSINE 43
III.5.2. IMMUNOMARQUAGE 44
III.6. ANALYSES STATISTIQUES 45

IV. RESULTATS 46

IV.1. POPULATION 46
IV.1.1. RESULTATS DEMOGRAPHIQUES 46
IV.2. CONCENTRATION DE sRAGE ET esRAGE 47
IV.2.1. CONCENTRATION SERIQUE DE sRAGE ET esRAGE 47
IV.2.2. CONCENTRATION SALIVAIRE DE sRAGE ET esRAGE 48
IV.3. CONCENTRATION DE HMGB1 49
IV.4. CORRELATION DES PARAMETRES CLINIQUES ET PARODONTAUX 49
IV.4.1. CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES PARODONTAUX ET LES RAGE SOLUBLES 49
IV.4.2. CORRELATION ENTRE LES PARAMETRES PARODONTAUX ET HMGB1 51
IV.5. EXPRESSION RELATIVE DES ARNM DE RAGE ET AGER1 DANS LES TISSUS GINGIVAUX DE PATIENTS PARODONTAUX 52
IV.6. EVALUATION QUALITATIVE DE RAGE ET AGER1 PAR IMMUNOMARQUAGE 53

V. DISCUSSION 56

V.1. IMPLICATION DE sRAGE DANS LA PARODONTITE CHRONIQUE 56
V.1.1. CONCENTRATIONS SERIQUES 56
V.1.2. ANALYSE SALIVAIRE 57
V.2. LES LIGANDS DE RAGE 57
V.3.RAGE ET AGER-1 AU NIVEAU TISSULAIRE 58
V.4. LIMITES 59
V.5. VALIDITE EXTERNE DES sRAGE ET DES PARODONTITES 59
V.6. PERSPECTIVES A MOYEN TERME 60

CONCLUSION 61

BIBLIOGRAPHIE 62

TABLE DES ILLUSTRATIONS 72

TABLES DES TABLEAUX 73

ANNEXE 1 : 74

DETZEN, L., S. C. Y. CHEN, B. CHENG, P. N. PAPAPANOU AND E. LALLA (2017). "INCREASED LEVELS OF SOLUBLE CD163 IN PERIODONTITIS PATIENTS." J CLIN PERIODONTOL 44(6): 585-590. **74**

I. PRÉFACE

Nous étudierons dans cette thèse d'exercice de chirurgie dentaire, la question des variations du récepteur spécifique des produits finaux de glycosylation avancée (RAGE), de ses formes solubles et de son antagoniste transmembranaire AGER1 en fonction de la présence ou non d'une parodontite chronique généralisée modérée à sévère.

Cette thématique s'articulera autour de quatre axes.

Dans la première partie nous introduirons les bases amenant à la compréhension de l'étude sous-jacente. De succincts rappels seront émis concernant les parodontites. Nous nous attarderons ensuite sur ses relations avec les maladies systémiques et plus particulièrement les maladies cardio-vasculaires et le diabète, où RAGE joue un rôle prépondérant dans leur physiopathologie. Enfin, nous décrirons RAGE ainsi que les différents protagonistes, de l'étude du niveau moléculaire jusqu'à leurs impacts en clinique.

Dans un deuxième temps, nous aborderons la partie patients et méthodes en décrivant la population étudiée, les différents prélèvements réalisés, tout en développant les techniques utilisées dont le test ELISA, la PCR en temps réel ou encore l'immunomarquage.

La pénultième partie présentera les différents résultats de cette étude. Nous finirons par les discuter et conclure ce travail.

Ce travail a été réalisé durant une « année recherche » dans le cadre de l'internat pour le diplôme d'études spécialisées en médecine bucco-dentaire. Elle a été réalisée au laboratoire de parodontologie de la faculté de médecine dentaire de l'université de Columbia New York city (NY ; USA) en association avec le laboratoire EA2496 Pathologies, imagerie et biothérapie oro-faciales Montrouge (France).

II. INTRODUCTION

II.1. Les parodontites

II.1.1. Définition

Les parodontites sont des maladies inflammatoires dysbiotique et multifactorielles conduisant à la destruction des tissus de soutien de la dent, le parodonte et provoquant un impact négatif sur la santé systémique(Hajishengallis 2015). La maladie parodontale est définie comme l'association de lésions parodontales correspondant à des entités nosologiques signant une altération plus ou moins étendue et sévère de la santé du parodonte. La lésion parodontale, quant à elle, est une entité étiopathogénique élémentaire à expression clinique, mettant en jeu la réponse inflammatoire, consécutive à la présence de pathogènes parodontaux de la plaque dentaire et entraînant une destruction non traumatique locale et individualisée du parodonte (Bouchard 2015).

Les signes cliniques recherchés pour diagnostiquer les parodontites sont, la récession parodontale, la profondeur de poche permettant de déterminer le niveau d'attache, l'inflammation gingivale, le saignement au sondage, la mobilité dentaire ainsi que les signes radiographiques de perte osseuse alvéolaire.

II.1.2. Classification des maladies parodontales

La classification communément utilisée permettant de classer les maladies parodontales a été introduite en 1999 par l'« International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions ». Ces pathologies sont subdivisées en 8 catégories comme suit. (Armitage 1999)

I : Maladie Gingivale
II : Parodontite chronique
III : Parodontite agressive
IV : Parodontite en tant que manifestation d'une maladie systémique
V : Maladies parodontales nécrotiques
VI : Abcès parodontaux
VII : Parodontites associées à des lésions endodontiques
VIII : Anomalies congénitales ou acquises

Table 1 : Classification des maladies parodontales (Armitage 1999)

Deux formes sont prédominantes : les parodontites chroniques et les formes agressives. La parodontite agressive est définie par une perte d'attache rapide, avec une non contribution de l'historique médical et dans laquelle les facteurs génétiques jouent un plus grand rôle (Lang, Bartold et al. 1999). La forme chronique, quant à elle, est la plus commune et est caractérisée, en opposition à la parodontite agressive, par une perte d'attache lente. Cette forme que nous allons étudier plus précisément dans cette thèse crée une perte tissulaire de sévérité et de localisation commensurable avec les facteurs étiologiques locaux. Elles est associée à des signes cliniques d'inflammation et peut être modifiée par des facteurs environnementaux. Les calculs tartriques sous-gingivaux sont invariablement présents au niveau des sites atteints par la maladie parodontale.
Les critères suivants permettent de définir l'étendue et la sévérité de la maladie parodontale

L'étendue de la maladie parodontale : si moins de 30 % des sites sont atteints, on parlera de parodontite localisée et de parodontite généralisée si 30% ou plus des sites sont atteints.

La sévérité de la maladie parodontale: elle est définie en fonction de la perte d'attache et est caractérisée de superficielle si la perte d'attache est comprise entre 1 et 2 mm, modérée si elle est comprise entre 3 et 4 mm. Elle est enfin caractérisée de sévère si elle est supérieure ou égale à 5 mm.

Parallèlement à cette classification clinique, la CDC-AAP (2012) a mis en place une classification épidémiologique pour l'étude de la prévalence au sein d'une population. (Eke, Page et al. 2012)
Les définitions proposées par Eke et coll. sont les suivantes :
- La parodontite superficielle est définie par ≥ 2 sites interproximaux avec une perte d'attache (PA) ≥ 3 mm et ≥ 2 sites interproximaux avec profondeur de poche (PP) ≥ 4 mm (pas sur la même dent) ou un seul site avec une PP ≥ 5 mm.
- La parodontite modérée est définie, quant à elle, par au moins 2 sites inter-proximaux avec PA ≥ 4 mm ou au moins 2 sites inter-proximaux avec PP≥5 mm sur des dents différentes.
- Enfin la parodontite sévère est caractérisée par au moins 2 sites inter-proximaux avec PA≥ 6 mm et 1 site inter-proximal avec PP≥5 mm.

II.1.3. Prévalence des maladies parodontales

Les maladies parodontales sont des pathologies universelles (Burt 2005). Une étude de la National Health and Nutritional Examination Survey NHANES, menée en 2009-2010, montre que plus de 47% des patients âgés de 30 ans et plus présentent une parodontite, dont 8,7% une forme superficielle, 30% modérée et 8,5% sévère (Eke, Dye et al. 2012).

II.1.4. Physiopathologie des parodontites

La santé parodontale nécessite un état inflammatoire contrôlé qui peut maintenir une homéostasie entre hôte et microbe au niveau du parodonte : la symbiose. La pathogenèse de la Les parodontites implique une synergie polymicrobienne et une dysbiose (Hajishengallis 2015). C'est un état qui est caractérisé par un déséquilibre de l'abondance ou l'influence de certaines espèces bactériennes dans un macrobiote, associées à une maladie ici les parodontites. Cet état conduit à une altération de la relation homéostatique hôte-microbiote qui permet la médiation de l'inflammation conduisant à la perte osseuse. (Figue 1)

Figure 1 Différences entre parodonte sain et parodonte atteint par la parodontite chronique

Ces bactéries subgingivales dysbiotiques ainsi que les endotoxines bactériennes (LPS) du biofilm initient la réaction inflammatoire parodontale. Cette infection augmente la perméabilité de l'épithélium de jonction offrant aux bactéries et à leurs produits un accès au tissu conjonctif sous-jacent. Un recrutement de neutrophiles puis de macrophages est observé.

Ces cellules immunitaires et les cellules résidentes du parodonte (cellules épithéliales, fibroblastes, cellules endothéliales ou encore cellules de Langerhans) sont activées et libèrent des médiateurs protéiques (ex : IL-1, TNF-a) et lipidiques (ex : PGE_2) de l'inflammation. Les macrophages phagocytent et présentent les antigènes bactériens aux lymphocytes (Th1, Th2, Th17 et B), et aux cellules dendritiques permettant la mise en place d'une réponse immunitaire acquise. Cette réponse inflammatoire est en premier lieu de nature protectrice pour contrôler l'infection bactérienne. Ces cellules produisent des médiateurs pro-inflammatoires (tels que des cytokines : TNF-α, IL-1β et IL-17) ayant une action sur la résorption. L'ensemble de ces médiateurs (cytokines, prostaglandines, protéases, métalloprotéinases, complexes auto-immuns) conduisent à la libération d'autres molécules de l'inflammation telles que par exemple, ROS, ainsi qu'à l'expression cruciale de RANKL par les ostéoblastes. Ceci entraîne la maturation des ostéoclastes précurseurs. Les neutrophiles activés expriment RANKL membranaire et peuvent stimuler directement l'ostéoclastogenèse.
Une migration apicale de l'attache épithélio-conjonctive qui lie la gencive à la dent est observée. Une perturbation des cellules du remaniement osseux en faveur d'une ostéoclasie accrue s'effectue. Ainsi, en présence d'inflammation, le sulcus s'approfondit et une poche parodontale se crée. Ce nouvel environnement est propice à la colonisation de bactéries anaérobies parodontopathogènes (ex : *Porphyromonas gingivalis*). La maladie est installée. (figure 2)

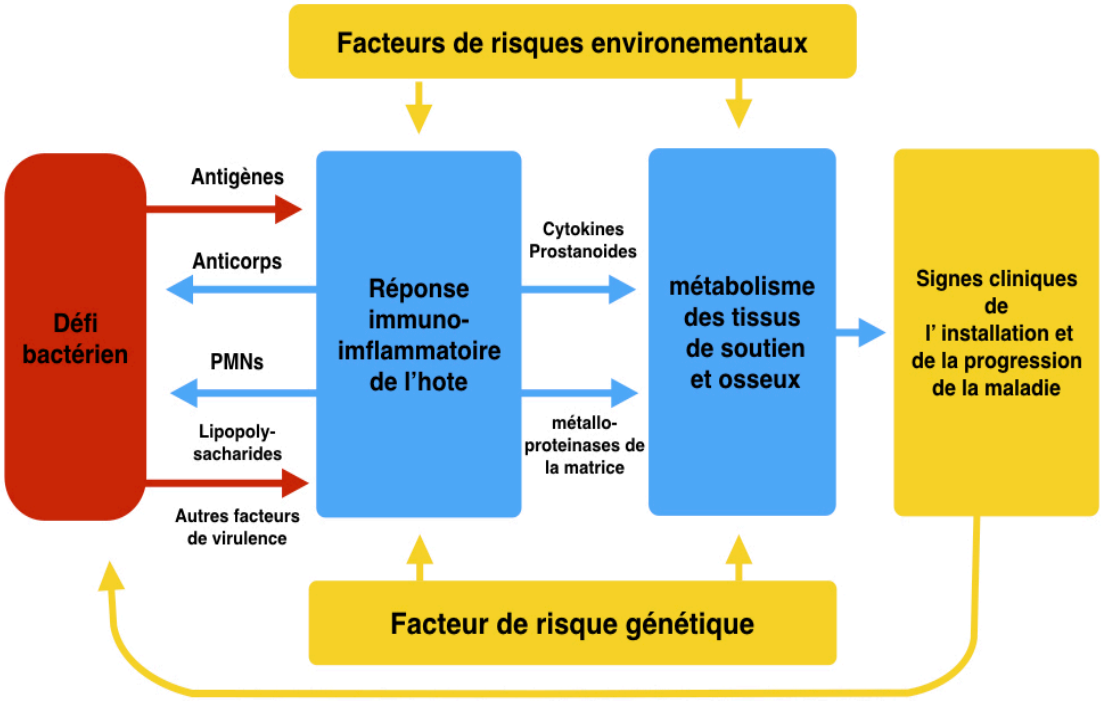

Figure 2 : Pathogénie des parodontites (Page and Kornman 1997)

II.2. Impact systémique des parodontites

II.2.1. Pathologies systémiques et parodontites

Malgré la nature localisée de la maladie parodontale, l'infection du site est responsable d'une réponse inflammatoire se développant bien au-delà du parodonte. L'épithélium sulculaire, dans des conditions saines, agit comme une barrière naturelle prévenant la pénétration bactérienne. Au cours des parodontites, l'épithélium de poche inflammée présente des aires de tissus vulnérables à la pénétration bactérienne (Davenport, Simpson et al. 1982) et sources de cytokines inflammatoires. Ainsi, cette plaie induit une inflammation systémique et une dissémination bactérienne (Hujoel, White et al. 2001). Les parodontites contribuent à des épisodes de bactériémie extrêmement fréquents et répétés (Daly, Mitchell et al. 2001) et à une diffusion de cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine (Loos 2005). A ce jour de multiples voies ont été décrites, nous offrant des hypothèses raisonnables de l'induction, par la maladie parodontale, d'une inflammation systémique.

Les parodontites représentent un facteur de risque de l'initiation et/ou de l'évolution de pathologies à distance. Des études épidémiologiques montrent que les parodontites sont indépendamment associées à de nombreuses pathologies telles que des pathologies inflammatoires : maladies cardio-vasculaires et tout particulièrement l'athérosclérose (Beck and Offenbacher 2005)), la polyarthrite rhumatoïde (Ribeiro, Leao et al. 2005), des complications au cours de la grossesse telles que la naissance d'enfants prématurés et de petit poids (Ide and Papapanou 2013), certains cancers (Hujoel, Drangsholt et al. 2003), des infections telles que les infections respiratoires (Scannapieco 1999) et du diabète avec ses complications (Lalla and Papapanou 2011).

II.2.2.Voie de l'inflammation

Une augmentation des parodontopathogènes, de leurs facteurs de virulence dans les tissus gingivaux et par conséquent dans la circulation systémique survient. Ils stimulent les tissus éloignés (Jain, Batista et al. 2003). Les leucocytes et les cellules endothéliales et hépatocytaires répondent à ces facteurs de virulence produisant des médiateurs immuns pro-inflammatoires. De plus, les antigènes solubles peuvent réagir avec des anticorps spécifiques créant des complexes immuns pouvant amplifier les réactions inflammatoires aux sites de déposition (Thoden van Velzen, Abraham-Inpijn et al. 1984).

Les médiateurs pro-inflammatoires tels que IL-1β, IL-6, TNF-α et PGE2 sont aussi impliqués dans l'inflammation systémique en réaction aux parodontites. Ils sont produits

localement par les cellules hôtes dans le tissu gingival inflammé et sont en partie libérés dans la circulation. Ils exercent aussi une action systémique à distance. Plus spécifiquement, les cytokines pro-inflammatoires activent les cellules endothéliales, engendrant notamment leurs dysfonctionnements (Amar, Gokce et al. 2003). La libération et la circulation de ces cytokines affectent des sites ectopiques causant une inflammation ou une exacerbation de différents processus inflammatoires existants. Les parodontites contribues à l'inflammation chronique globale. De nombreuses études ont montré une association entre les parodontites, la concentration de protéine C-réactive (CRP) (Fredriksson, Figueredo et al. 1999) et la réduction de sa concentration après traitement (D'Aiuto, Ready et al. 2004). La CRP est produite par le foie, est induite par des médiateurs immuns (Steel and Whitehead 1994) et est fortement associée aux maladies cardio-vasculaires (Fredriksson, Figueredo et al. 1999).

Les changements dans les paramètres sanguins dus aux parodontites n'excèdent que modestement les valeurs de référence. Néanmoins en analogie avec d'autres maladies inflammatoires chroniques, il est concevable que l'augmentation faible mais chronique de ces marqueurs au niveau systémique exacerbe d'autres processus inflammatoires en cours (Loos 2005).

L'inflammation systémique de bas grade d'origine parodontale est impliquée dans de nombreuses pathologies. Nous allons approfondir et explorer l'association entre les maladies parodontales, le diabète et les maladies cardiovasculaires. Ces deux dernières pathologies chroniques systémiques ont une voie physiopathologique commune : RAGE.

II.2.3. Les biomarqueurs des parodontites

Les mesures cliniques de la maladie parodontale peuvent parfois être considérées comme subjectives. Les biomarqueurs sont définis comme une caractéristique biologique qui est objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques normaux, pathologiques, ou à une réponse pharmacologique à une thérapeutique (Group 2001). De nouveaux biomarqueurs de la maladie parodontale peuvent émerger pour une meilleure détermination du diagnostic, du pronostic et de la prise en charge de la maladie parodontale. Des cytokines inflammatoires et des enzymes sont libérées dans le fluide gingival et la circulation sanguine, reflétant la réponse de l'hôte face à l'agression bactérienne. De potentiels biomarqueurs des parodontites ont été étudiés tels que les cytokines inflammatoires

TNF-α ou interleukin-1β (IL-1β) (Page 1992, Loos 2005), pour prédire la sévérité, la progression et la récurrence des parodontites (Giannobile 2012). Cependant à ce jour aucun n'est validé (Bouchard, Carra et al. 2016).

Un biomarqueur efficient de la maladie parodontale serait d'une aide considérable au fauteuil pour dépister et évaluer l'activité de la maladie parodontale, assurer le suivi et la réponse à un traitement donné. Il pourrait enfin aider à l'auto-évaluation par le patient de son statut inflammatoire et ainsi lui permettre d'en référer à son praticien. Des biomarqueurs sont utilisés dans certaines pathologies telles que l'hémoglobine glyquée A1 pour le diabète. Les chirurgiens-dentistes peuvent jouer un rôle important dans le dépistage de ces autres pathologies. La puissance du dépistage serait accrue si l'examen parodontal était associé à l'utilisation de ces bio-marqueurs. En effet, dans une cohorte, 601 patients, âgés de plus de 40 ans et n'ayant jamais été diagnostiqués pour un diabète, ont reçu un examen parodontal. Soixante-treize pourcents des patients ayant plus de 26% de poches parodontales profondes ou plus de 4 dents absentes ont été diagnostiqués diabétiques. Le dosage de HbA1c supérieur à 5.7% permet de déceler 92% de vrais positifs chez les présumés diabétiques (Lalla, Kunzel et al. 2011). Ces tests simples ont une bonne spécificité et sensibilité dans le diagnostic des patients pré-diabétiques et diabétiques non décelés.
L'inflammation systémique d'origine parodontale est impliquée dans de nombreuses pathologies. Nous allons approfondir et explorer l'association entre les maladies parodontales, le diabète et les maladies cardiovasculaires. Ces deux dernières pathologies chroniques systémiques ont une voie physiopathologique commune : RAGE.

II.2.4. Le diabète et les maladies parodontales

Le diabète est une maladie métabolique caractérisée par une perte de contrôle de l'homéostasie glycémique. L'hyperglycémie en résultant entraîne des complications sur court et long terme (cécité, maladies rénales, accidents cardio-vasculaires, maladies parodontales, etc) ; un diagnostic précoce est donc indispensable. Le diabète est lié soit à une anomalie de synthèse, soit à une anomalie de l'action de l'insuline, soit aux deux. A ceci se rajoutent des facteurs génétiques et environnementaux. Deux types principaux de diabète existent : le diabète de type I (5 à 10% des patients) et le diabète de type II (85 à 90% des patients). En 2010, 8,3% de la population des Etats-Unis présente un diabète. La prévalence augmente avec l'âge, en effet on retrouve 27% de diabétiques ayant 65 ans ou plus. C'est la 7ème cause de mortalité aux Etats-Unis en 2011.

Les recherches ont mis en évidence des relations bidirectionnelles entre parodontites et diabète. D'une part, les maladies parodontales sont considérées comme la 6ème complication du diabète (Loe 1993). La sévérité des parodontites semble influencer le contrôle de la glycémie et le développement des complications du diabète. Cependant, les traitements des parodontites ont un effet favorable mais modéré sur le contrôle de la glycémie. D'autre part, le diabète non équilibré est un facteur de risque reconnu des parodontites. En effet, les patients diabétiques présentent une réponse inflammatoire exagérée face à la charge bactérienne et une cicatrisation altérée. Or ces deux phénomènes sont médiés, en partie, par l'interaction RAGE-ligands, exacerbée lors du diabète (Lalla and Papapanou 2011).

II.2.4.1. Effets de l'hyperglycémie sur les parodontites

II.2.4.1.1. Plausibilité biologique

Les patients diabétiques présentent une réponse inflammatoire exagérée face à la charge bactérienne (Manouchehr-Pour, Spagnuolo et al. 1981) et un trouble de la réparation. Ces deux phénomènes sont médiés par l'interaction RAGE-ligands exacerbée lors du diabète (Lalla, Kunzel et al. 2011). Une diminution de la production de collagène et une augmentation de l'activité des collagénases produits par les fibroblastes gingivaux et ligamentaires, ont été observées. (Ramamurthy and Golub 1983, Sasaki, Ramamurthy et al. 1992, Yu, Li et al. 2012). L'hyperglycémie dans le diabète module le ratio RANK-L /ostéoprotegérine (OPG) dans les tissus parodontaux contribuant ainsi à la destruction osseuse (Lappin, Eapen et al. 2009, Santos, Lima et al. 2010).

II.2.4.1.2. Preuves provenant des études épidémiologiques

La plupart des études de cohorte concluent que la prévalence, l'étendue et la sévérité des maladies parodontales sont supérieures chez les patients diabétiques ayant une hyperglycémie en comparaison à ceux ayant une glycémie équilibrée (Taylor, Burt et al. 1998, Mattout, Bourgeois et al. 2006, Sun, Chen et al. 2010). 35247 patients participant à l'étude « Health professionals Follow up Study » (HPFUS), ayant une moyenne d'âge de 54 ans, ne présentant aucune parodontite, ont été suivis pendant 20 ans. 2285 hommes présentant un diabète de type 2 avaient un risque ajusté de développer une parodontite de 29 % (Jimenez, Hu et al. 2012). L'hyperglycémie sévère due à un diabète non équilibré est un facteur de risque important par rapport au simple facteur diagnostic du diabète (Genco and Borgnakke 2013). Un effet-dose existe : plus l'hyperglycémie est élevée, plus la santé parodontale est négativement affectée. Les patients présentant un diabète non équilibré sont sujets à des profondeurs de poche, pertes d'attaches et pertes osseuses radiographiques plus importantes. Les patients

ayant un diabète équilibré présentent une santé parodontale similaire aux patients non diabétiques (Costa, Miranda Cota et al. 2013).

II.2.4.2. Effets des parodontites sur la glycémie, le diabète et ses complications.

Les maladies parodontales ont aussi un impact sur le diabète et notamment sur le contrôle de la glycémie et le développement du diabète de type 2 (Borgnakke, Ylostalo et al. 2013)

II.2.4.2.1. Plausibilité biologique

L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires et des médiateurs prothrombotiques sériques générés par des parodontites, (Loos 2005, Kebschull, Demmer et al. 2010) favorise l'insulino-résistance, influence le contrôle métabolique et, à long terme, contribue aux complications du diabète. Dans des études expérimentales chez le rat obèse, l'induction des parodontites est associée à une détérioration du métabolisme de la glycémie.(Pontes Andersen, Flyvbjerg et al. 2007). Chez des adultes atteints de diabète de type 2, un effet dose a été évalué entre la sévérité du taux sérique de TNFα et la sévérité des parodontites (Engebretson, Chertog et al. 2007). Cette cytokine aggrave l'insulino-résistance (Shoelson, Lee et al. 2006). La thérapie parodontale permet de réduire le taux sérique de TNFα (Iwamoto, Nishimura et al. 2001) et des autres médiateurs circulant de l'inflammation tels que la CRP, l'IL-6, et le fibrinogène (Correa, Goncalves et al. 2010, Sun, Chen et al. 2010). Ses effets peuvent améliorer la sensibilité à l'insuline et éventuellement améliorer le contrôle de la glycémie.

II.2.4.2.2. Preuves épidémiologiques

Les maladies parodontales ont aussi un impact sur le diabète et notamment sur le contrôle de la glycémie et le développement du diabète de type 2 (Borgnakke, Ylostalo et al. 2013). La première étude longitudinale a été conduite par la « National institute of diabetes and Digestive and Kidney Diseases » chez les indiens PIMA en Arizona présentant une prévalence importante de diabète. Les patients ayant un diabète de type 2 bien contrôlé, associé à des parodontites sévères, perdent 6 fois plus l'équilibre de leur glycémie que ceux ne présentant pas de parodontites sévères au départ (Taylor, Burt et al. 1996). Dans une étude longitudinale de patients diabétiques (N=2793) menée sur une période de 5 ans, ceux ayant des parodontites présentent une incidence 5 fois plus importante de voir une augmentation de

leur hémoglobine glyquée que les parodontalement sains. Chaque millimètre de PP moyen en plus correspondait à une augmentation de 0,13 point de pourcentage du taux de HbA1c à 10 ans (Saito, Shimazaki et al. 2004). Le traitement des parodontopathies a donc un effet bénéfique sur le contrôle de la glycémie et réduit le taux de HbA1c (Simpson, Needleman et al. 2010). De nombreuses méta-analyses ont été réalisées : une diminution de 0.41% de Hb1ac a été évaluée après traitement (Liew, Punnanithinont et al. 2013).

II.2.5. Maladies cardiovasculaires (MCV)

Vingt-neuf pourcent des causes de mortalité sont d'origine cardio-vasculaire soit la 1ère cause de mortalité dans le monde (Fuster and Vedanthan 2008) L'athérosclérose, composante majeure des maladies cardio-vasculaires, affecte une personne sur 4. Elle résulte de la formation de plaque d'athérome au niveau de l'endothélium des artères (coronaires, cérébrales, périphériques) dont le développement complexe inclut l'action de molécules inflammatoires.

II.2.5.1. Plausibilité biologique

L'inflammation et l'infection originaires des parodontites, comme évoquées ci- dessus, sont des facteurs de risque pour l'athérosclérose. Les bactéries circulantes produisent, comme le LPS et les cytokines pro-inflammatoires, des molécules d'adhésion sur la surface de l'endothélium. Les monocytes circulants sont ainsi recrutés et adhèrent à l'endothélium activé. Ils migrent dans l'espace sous-endothélial, deviennent résidents et phagocytent les lipoprotéines oxydées de faible densité. Leur apoptose résulte d'une accumulation de ces lipoprotéines formant, de manière chronique, la plaque d'athérome. En concomitance, les pathogènes parodontaux induisent la prolifération de néo-intima et de cellules musculaires lisses dans l'intima. La plaque d'athérome mature jusqu'à sa rupture, conduisant à la formation d'un thrombus qui va entraîner une une possible occlusion vasculaire (Kebschull, Demmer et al. 2010). De nombreuses études ont montré la présence de bactéries orales dans la plaque d'athérome par immunomarquage (Chiu 1999) ou par polymérase Chain Reaction PCR (Haraszthy, Zambon et al. 2000). De plus *A. Actinomycetemcomitans* et *P. Gingivalis*, viables ont été isolés et cultivés à partir de plaques d'athérome humaines (Kozarov, Dorn et al. 2005).

II.2.5.2. Preuves épidémiologiques

Plusieurs méta-analyses sur l'association entre l'athérosclérose et les parodontites ont été conduites. Une augmentation de 20% du risque de maladie cardio-vasculaire a été évaluée chez des patients présentant une parodontite (95% CI : 1.08-1.32) (Meurman, Sanz et al. 2004). Une relation temporelle semble exister. En effet, dans une étude de cohorte, l'exposition aux parodontites précède les maladies cardio-vasculaires. Chez 9760 adultes suivis pendant 14 ans dans la cohorte NHANES I, les hommes de moins de 50 ans atteints de parodontite ont 72% de risques de développer une MCV en comparaison aux patients sans parodontite. (DeStefano, Anda et al. 1993)

Concernant les études interventionnelles, il a été démontré qu'après traitement parodontal via surfaçage radiculaire, une réduction importante des biomarqueurs des MCV, dont la CRP et l'IL-6 a été observée. (D'Aiuto, Ready et al. 2004). Dans une étude de cohorte, impliquant 700000 sujets, l'incidence des accidents vasculaires cérébraux a été évaluée sur 10 ans. Les patients parodontaux présentant une prophylaxie avaient une incidence plus basse d'AVC (0.14%/an) que les patients parodontaux sans traitement (0.48%/an) (Lee, Hu et al. 2013).

II.3. Le récepteur spécifique des produits terminaux de glycosylation avancée et ses ligands

II.3.1. La structure de RAGE

Le récepteur spécifique des produits finaux de glycosylation avancée (Receptor of Advanced Glycation Endproducts ou RAGE) appartient à la superfamille des immunoglobulines. RAGE a été identifié pour sa capacité à se lier aux produits terminaux de glycosylation avancée (AGE) (Schmidt, Vianna et al. 1992). RAGE reconnaît les structures tridimensionnelles et non des séquences spécifiques d'acides aminés (séquences primaires). Grâce à cette caractéristique, ce récepteur multi-ligand peut être considéré comme un récepteur de reconnaissance de motifs (pattern-recognition receptor).

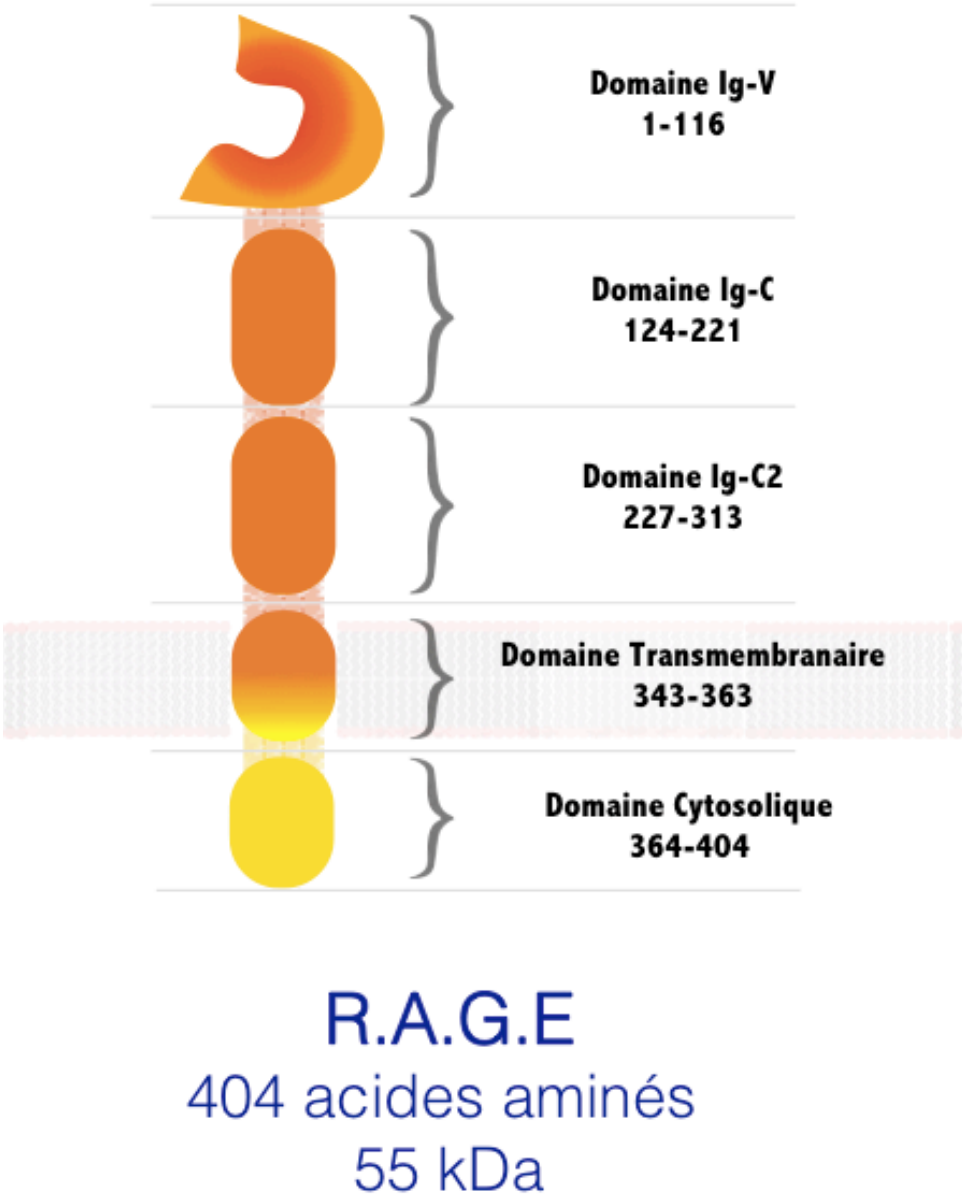

Figure 3: Le récepteur spécifique des produits terminaux de glycosylation avancée

Chez les humains et les souris, le gène codant pour RAGE est situé sur le chromosome 6 (environ 1,4 kb), proche du complexe majeur d'histocompatibilité III (CMH classe III), au voisinage des gènes pour la lymphotoxine, le tumor necrosis factor (TNF) et le gène à homéoboîte HOX12(Sugaya, Fukagawa et al. 1994). La traduction de l'ARNm codant RAGE produit une protéine de 404 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 55 kDa.

RAGE est composé d'un domaine transmembranaire hydrophobe unique, un domaine cytosolique hautement chargé et une région extracellulaire. Cette région extracellulaire est composée d'un domaine N-terminal type–V d'immunoglobuline et deux types C (C1 et C2)

(Schmidt, Yan et al. 2001). Le domaine de type-V est considéré comme le premier site d'interaction avec un ligand extracellulaire. Le court domaine cytosolique est la zone critique de transduction intracellulaire du signal de RAGE (Neeper, Schmidt et al. 1992, Gonzalez, Romero et al. 2013). (figure 3)

II.3.2. Les formes solubles et isoformes de RAGE

Cinq formes principales de RAGE sont distinguées :

- la forme totale ***« full-lenght RAGE » ;***
- les deux formes solubles, **esRAGE** (endogenous secretory RAGE) **cRAGE** (forme clivée de fl-RAGE) ;
- les formes N-tronquées ;
- les dominants négatifs ne signalant pas.

Il existe au total 19 isoformes de flRAGE classés de RAGE-v1 à RAGE-v19 par « le comité de la nomenclature du gène humain» (Hudson, Carter et al. 2008). L'existence d'isoformes tronquées provenant du même gène implique que les pré-mRNA de RAGE sont sujets à l'épissage alternatif (Schlueter, Hauke et al. 2003).

a) La forme totale de RAGE ou « ***full-lenght » RAGE (fl-RAGE)*** décrite précédemment, est ***liée à la membrane cellulaire*** et est constituée de trois domaines : un extracellulaire, un transmembranaire et un cytosolique.
b) ***Les deux formes solubles*** **esRAGE** et **cRAGE** ont les régions V et le domaine extracellulaire (de type C) identiques à fl-RAGE. Cependant elles ne présentent pas de domaine transmembranaire ni cytoplasmique. L'épissage alternatif de l'ARNm et le clivage protéolytique de fl-RAGE sont les principaux mécanismes donnant lieu à ces formes solubles.

- **esRAGE** provient d'un épissage alternatif de l'exon 9 : une forme C-tronquée de RAGE en résulte. L'épissage alternatif chez les humains dépend du type cellulaire. Dans le poumon humain et les cellules musculaires lisses aortiques, l'ARNm fl-RAGE est la forme la plus répandue alors que dans les cellules endothéliales l'ARNm esRAGE est exprimée plus fréquemment.
- **cRAGE** provient du clivage protéolytique de fl-RAGE. Les MMPs, dont ADAM10, clivent à la surface de la cellule, la protéine libérant son domaine extracellulaire. cRAGE est le variant prédominant dans le sérum. La concentration sérique de sRAGE est décrite comme étant 4 à 5 fois supérieure à celle de esRAGE.

La mesure de **sRAGE** comprend celle d'esRAGE et de cRAGE. esRAGE constitue 20% de sRAGE (Humpert, Djuric et al. 2007). Les sRAGE sont présents dans l'espace extracellulaire et agissent comme récepteurs leurres. L'équilibre entre le niveau de sRAGE et de RAGE est un système dynamique.

c) La forme **N-tronquée** présente une absence du domaine V et ne peut interagir avec les ligands.

d) La forme **dominante négative** présente à l'inverse une absence du domaine cytosolique empêchant la transduction du signal.

sRAGE, RAGE et ses ligands sont trois éléments en balance avec la présence de contrôles positifs et négatifs qui peuvent être modifiés par des situations physiopathologiques (Hudson, Carter et al. 2008) (figure 4).

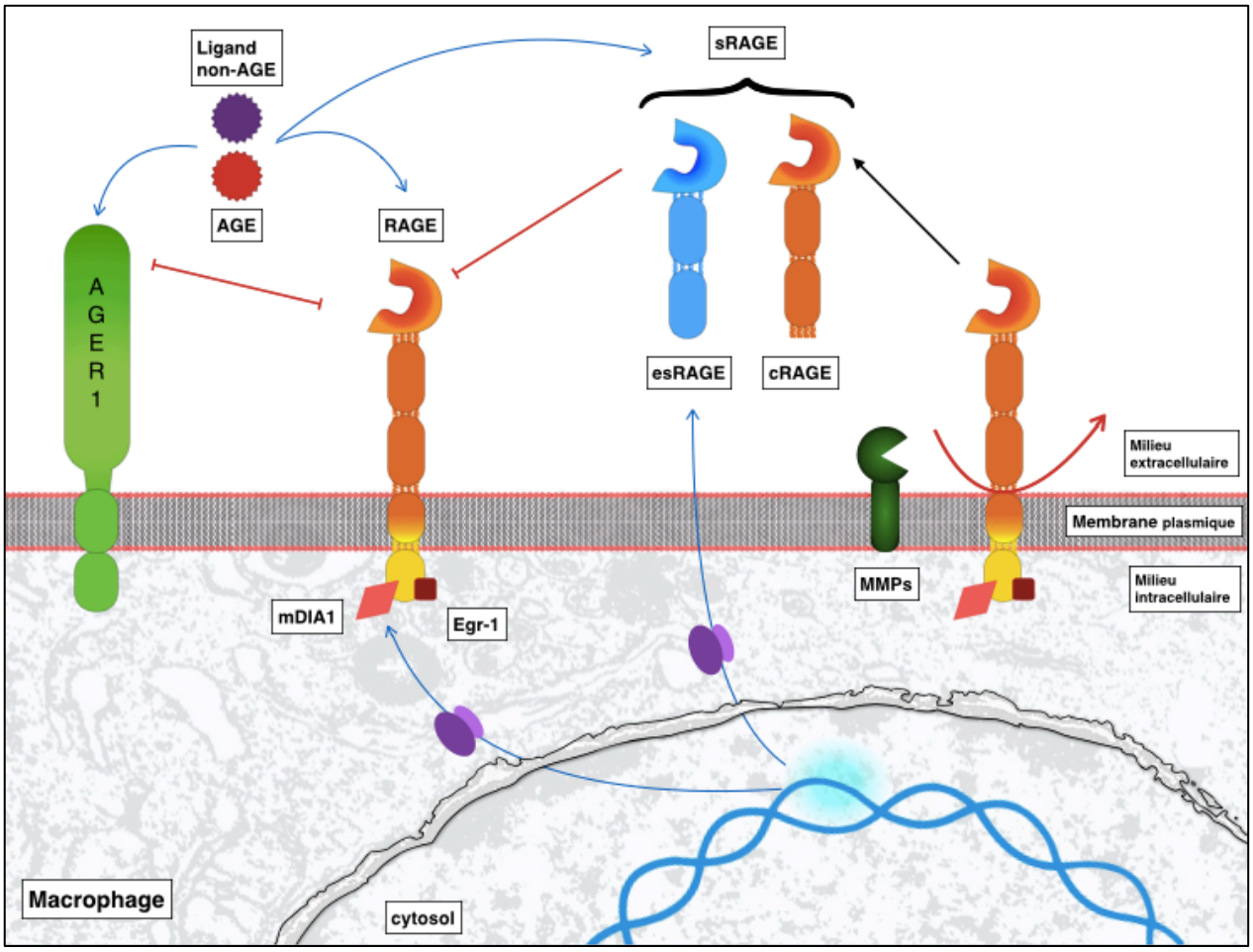

Figure 4 : RAGE, ses formes solubles et AGER1

II.3.3. Les ligands de RAGE

RAGE est capable de reconnaître une classe de ligands hétérogènes dans leurs séquences et de transduire leur signaux tels que :

- les AGEs,
- l'amyloïde β-peptide, et les fibrilles à feuillets béta (Yan, Chen et al. 1996),
- HMGBl / amphotérine (Taguchi, Blood et al. 2000),
- S100 / calgranulines (Hofmann, Drury et al. 1999),
- l'acide lysophosphatidique(Rai, Toure et al. 2012)
- MAC1 (Chavakis, Bierhaus et al. 2003)
- et la fraction du complément C1q (Ma, Rai et al. 2012).

II.3.3.1. Les produits terminaux de glycosylation avancée AGEs

II.3.3.1.1. Origine des AGEs

Les AGEs sont des dérivés métaboliques pro-oxydants (origine interne) provenant de réactions non enzymatiques (réaction de Maillard) entre les sucres réducteurs, les amines libres de protéines, les aminolipides et les acides nucléiques. Les AGEs sont surexprimés dans le diabète en raison de l'hyper-glycémie sanguine. Ils sont cependant retrouvés dans des conditions de normo-glycémie. Le stress oxydant, l'inflammation et l'âge provoquent par exemple leur formation (Ramasamy, Vannucci et al. 2005). L'autre origine est externe, notamment dans les pays industrialisés : ils sont retrouvés dans des procédés de conservation des aliments via des traitements par haute température. Dans ces pays, une augmentation significative du taux de AGE a été observée chez l'homme (Vlassara and Striker 2011).

II. 3.3.1.2. Rôles et mécanismes d'action des AGEs

Les AGEs sont connus pour moduler une multitude de structures intracellulaires et extracellulaires et ont des effets pro-oxydants dans l'inflammation, la prolifération cellulaire ou l'apoptose. Ils forment des molécules glycosylées. Ces procédés d'oxydation altèrent de façon permanente les protéines des tissus, les lipoprotéines plasmatiques, les phospholipides de la membrane cellulaire ou encore l'ADN. Les AGEs peuvent favoriser la génération de nouveaux AGEs et des espèces réactives de l'oxygène (ROS), épuiser les systèmes antioxydants et favoriser la perpétuation de l'inflammation. L'interaction de AGEs-RAGE active un signal de transduction et surexprime la transcription de certains gènes, tel que le « Vascular Cell Adhesion molécule 1 » (VCAM-1), qui engendre le stress cellulaire et mène

aux complications de différentes pathologies. Certains AGEs, tels que la pentosidine, sont capables de se lier aux protéines qui raffermissent des tissus préalablement souples et élastiques. D'autres peuvent glyquer des protéines et changer leurs fonctions (Prasad, Imrhan et al. 2014).

Les ROS, générés par les AGEs ou par l'interaction AGEs/RAGE(Wautier, Chappey et al. 2001), sont des espèces chimiques oxygénées (radicaux libres, peroxydes…) à forte réactivité due à la présence d'électrons de valence non appariés. Ils oxydent les protéines, l'ADN et les membranes cellulaires et entraînent la génération de tumeurs, de mort cellulaire par apoptose ou de nécrose. Enfin ils contribuent à l'augmentation de la rigidité artérielle, aux problèmes cardiovasculaires et à la détérioration du collagène et donc à la rigidité des tissus. Ils sont l'une des causes du vieillissement.

II. 3.3.1.3. Variations du taux de AGEs et pathologies

Le processus chimique de glycosylation est lent et strictement réglementé par l'équilibre entre oxydants et antioxydants naissants. Le niveau d'AGEs circulants est fonction de l'équilibre délicat entre la production endogène, la prise exogène et la clairance rénale et enzymatique. Différentes enzymes (glyoxylase I, II, carbonyl reductase), les récepteurs solubles (sRAGE) et le récepteur AGER1 participent à la détoxification et à la contre-régulation de l'effet pro-oxydant des AGEs. Enfin la fonction rénale joue un rôle important dans l'excrétion des AGEs. Cependant, une perturbation dans cet équilibre est responsable de certaines pathologies telles que l'athérosclérose (Prasad, Imrhan et al. 2014). Dans des conditions pathologiques telles que le diabète, les AGEs se forment à des taux considérablement accélérés. Leur concentration dans les tissus augmente dans le diabète mais aussi en cas de néphropathie non diabétique et physiologiquement avec l'âge, le stress et l'inflammation (Morimoto-Yamashita, Ito et al. 2012, Cohen 2013).

II.3.3.2.HMGB1

La protéine nucléaire High Mobility Group Box 1 (HMGB1) est un régulateur de transcription nucléaire. HMGB1 présente une séquence très conservée entre les espèces. Elle est constituée de deux domaines nommés HMG box A et B. HMGB1 agit comme un régulateur de la transcription intracellulaire, et joue un rôle crucial dans le maintien de la fonction de l'ADN. La forme extracellulaire de HMGB1 est libérée par différentes cellules (macrophages, monocytes, cellules endothéliales) ou par des cellules nécrotiques. Cette forme extracellulaire agit comme une cytokine pro-inflammatoire avec RAGE ou avec les Toll-Like Receptors (TLR) 2 and 4 (Lu, Kobayashi et al. 1996). HMGB1 joue un rôle critique dans la

progression de pathologies inflammatoires telles que les chocs septiques, la polyarthrite rhumatoïde ou l'athérosclérose (Taniguchi, Kawahara et al. 2003, Kalinina, Agrotis et al. 2004) .

Cette protéine aurait également un lien avec les parodontites. En effet, HMGB1 a été retrouvée de manière significativement plus concentrée dans le fluide gingival (FG) et est très exprimée dans la gencive de patients atteints de parodontite chronique sévère, agressive, généralisée et de péri-implantites (perte d'os péri-implantaire à la suite d'une réaction inflammatoire d'origine bactérienne) (Luo, Xie et al. 2011). D'autres études histologiques ont montré que HMGB1 est exprimée de manière prédominante dans le noyau des cellules gingivales humaines saines et est transloquée du noyau au cytoplasme dans les fibroblastes du tissu gingival issu de patients atteints d'une parodontite chronique (Ebe, Hara-Yokoyama et al. 2011). (figure 5)

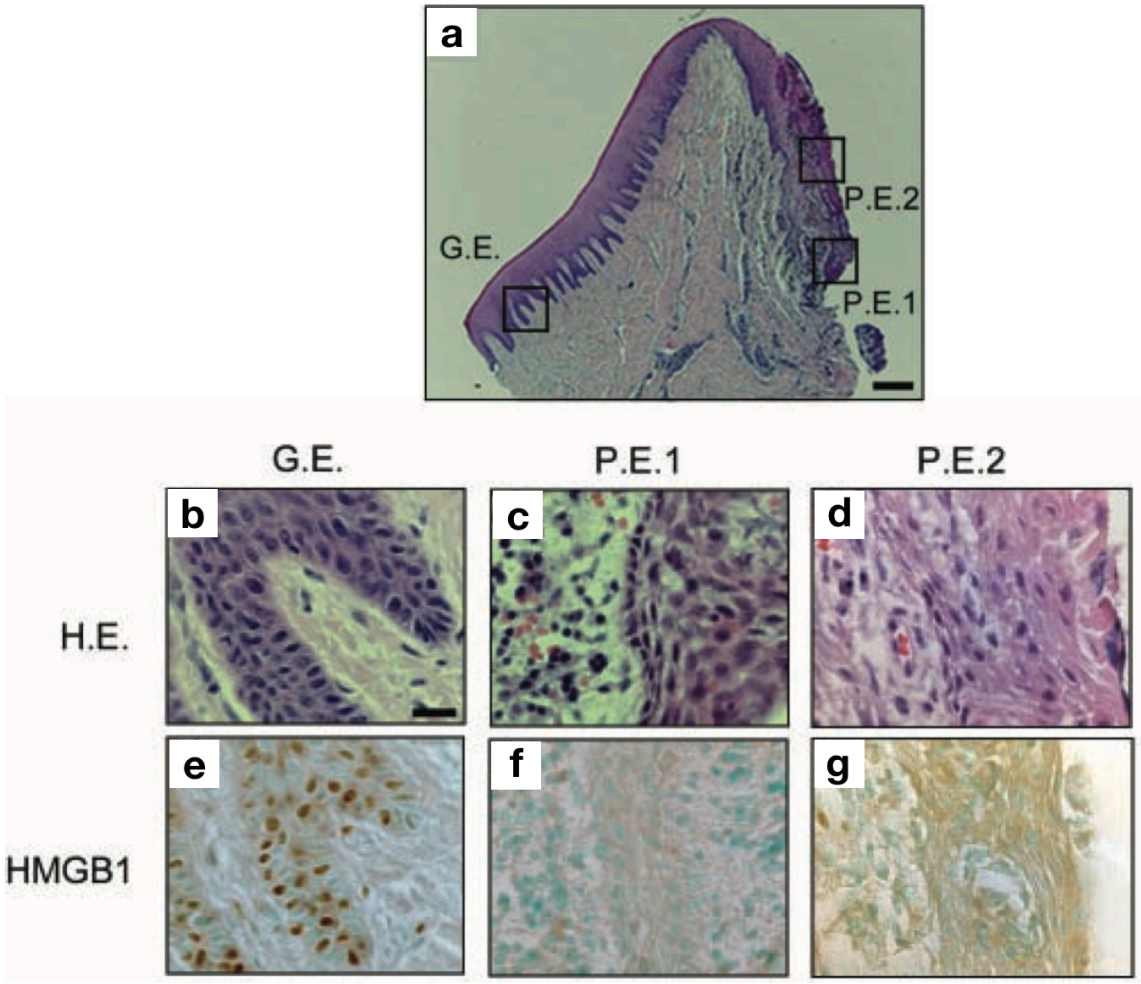

Figure 5 Expression de HMGB1 au niveau parodontale (Ebe, et al 2011)

A Coupe coronale parodontale d'un patient présentant une parodontite chronique. Coloration hématoxyline éosine (H.E.) au niveau : b) épithélium gingival, c) épithélium de poche zone 1, d) épithélium de poche zone 2. Himmunolocalisation de HMGB1 (peroxydase) au niveau : e) épithélium gingival, f) épithélium de poche zone 1, g) épithélium de poche zone 2

Au sein de ce tissu, les macrophages expriment aussi HMGB1, ce qui suggère un rôle de HMGB1 au cours de l'inflammation parodontale. *In vitro*, HMGB1 est libérée par les cellules épithéliales et les fibroblastes gingivaux stimulés par TNF-α , par le LPS ou l'acide butyrique secrétés par les bactéries parodontopathogènes (Morimoto, Kawahara et al. 2008, Feghali, Iwasaki et al. 2009, Ebe, Hara-Yokoyama et al. 2011). HMGB1 jouerait donc un rôle dans les parodontites, rôle qui serait médié par le récepteur RAGE (Morimoto-Yamashita, Ito et al. 2012).

II.3.3.3. Les autres ligands de RAGE

Les ligands de RAGE s'accumulent dans les tissus et altèrent leur fonction ainsi que leur structure. Ils provoquent la cascade inflammatoire par l'interaction avec le récepteur RAGE. Enfin, ils induisent la surexpression de ce dernier (Cohen 2013). En plus de se lier aux ligands qui participent activement à l'inflammation chronique et à la réponse immunitaire, RAGE interagit aussi avec les molécules des surfaces bactériennes, les prions (Sasaki, Takeuchi et al. 2002) et les leucocytes via Mac-1 (macrophage 1 antigen) (Chavakis, Bierhaus et al. 2003).
RAGE dispose d'un large répertoire de ligands. Ceux-ci partagent la propension à s'accumuler dans les tissus durant le vieillissement, les maladies chroniques, l'inflammation et la réponse de l'hôte (Bierhaus, Humpert et al. 2005) (Table 2).

Ligands	Commentaire	Références
Amyloid-β	S'accumule dans la maladie d'Alzheimer et dans le syndrome de Down	(Yan, Chen et al. 1996).
Amyloid-α	S'accumule dans l'amyloidosis systémique	(Yan, Chen et al. 1996).
S100-A4/A8/A9/A12/B calgranulins	S'accumulent dans le compartiment extracellulaire des zones d'inflammation chronique. Associés aux cancers du rein, poumon, sein et de la thyroïde	(Hofmann, Drury et al. 1999, Donato, Cannon et al. 2013).

Table 2 : Principaux ligands non-AGE de RAGE

II.4. RAGE, l'inflammation et le stress oxydant

II.4.1. Expression de RAGE

RAGE est exprimé par différents types cellulaires. Cette expression est constitutive ou induite et diffère en intensité selon le type cellulaire, son état ainsi que le stade de développement (Brett, Schmidt et al. 1993). Il est présent dans une large gamme de cellules différenciées, telles que les cardiomyocytes, les neurones, les neutrophiles, les monocytes / macrophages, les lymphocytes, les cellules dendritiques (CD), les cellules épithéliales et endothéliales (Chuah, Basir et al. 2013, Daffu, del Pozo et al. 2013). Au cours du développement embryonnaire, RAGE est majoritairement exprimé de manière constitutive et améliore la survie des neurones durant cette même période. Par la suite, son expression chute à un niveau faible au cours de la vie dans les tissus sains.

Dans certaines conditions, telles que le vieillissement ou certaines pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, le diabète, l'inflammation, les tumeurs ou encore la neuro-dégénération, RAGE est surexprimé par rapport aux sujets contrôle humain ou animaux sains (Yan, Ramasamy et al. 2010, Chuah, Basir et al. 2013). La voie de signalisation alors activée est dépendante de la durée d'interaction ligand/récepteur du type cellulaire en question (Daffu, del Pozo et al. 2013).

II.4.2.voies de signalisation de RAGE

La stimulation de RAGE par ses ligands active différentes voies de signalisation dont les voies JAK/STAT, RAS, MAPK et NF-kB.

- voie JAK/STAT(Huang, Guh et al. 2001)

- voie RHO : Rho est impliquée dans la formation stable de filaments d'actine et à la migration cellulaire(Huang, Guh et al. 2001)

- voie RAS : RAS est impliquée dans la réponse au stress et à l'apoptose

- **voie NF-kB :** NF-kB a une action pro-inflammatoire. Une fois activé, NF-kB se transloque au noyau pour activer des gènes cibles, incluant différentes cytokines responsables de l'immunité innée ou adaptative, des molécules vasoconstrictrices, pro-thrombotique et d'adhésions. RAGE est également un gène cible régulé par NF-kB, présentant un site de liaison fonctionnel pour NF-kB dans son promoteur proximal. La signalisation entre RAGE et NF-kB est donc interconnectée (Li and Schmidt 1997). Elle permet le maintien, l'amplification du signal et l'entretien de la réponse cellulaire, qui va enlever 1 espaceà son

tour déclencher des altérations tissulaires chroniques. En outre NF-kB peut se lier à glyoxalase (GLO1) qui est un détoxifiant supprimant son activité inhibitrice de production d'AGEs et sa protection contre les effets délétères du stress oxydant. Les gènes cibles de NF-kB comprennent les gènes anti-apoptotiques tels que les protéines Bcl ; par conséquent la survie de la cellule est sous le contrôle de NF-kB (Lee and Park 2013).

- voie MAPK : RAGE stimule ERK (p42), p38 et JNK et conduit à l'induction de la prolifération cellulaire.

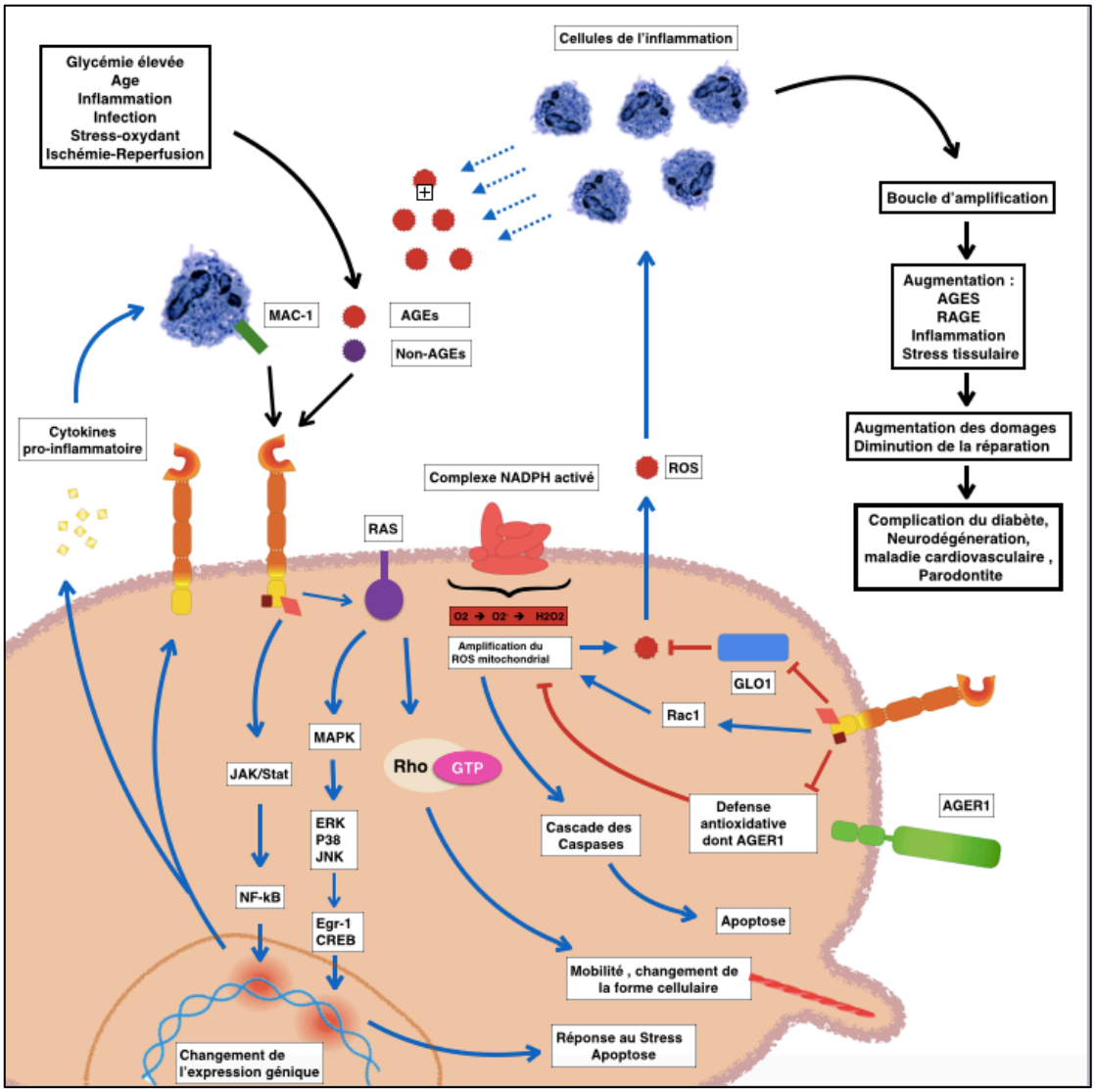

Figure 6 : Illustration des voies de signalisation de RAGE

RAGE est concerné par de multiples voies de signalisation cellulaire et en particulier dans les réponses immunitaires et la survie cellulaire. Le domaine cytoplasmique de RAGE est dépourvu d'activité endogène tyrosine-kinase. Il se lie à ERK ou diaphanous 1 (mDia1), un membre de la famille de formin. Le blocage de RAGE ou de mDia1 est de plus en plus proposé en tant que cible thérapeutique (Ramasamy, Yan et al. 2012) (Figure 6).

II.4.3. Rôle de RAGE dans l'inflammation et les pathologies associées

RAGE a le potentiel de convertir une réponse pro-inflammatoire transitoire, provoquée par un stimulus inflammatoire, en dysfonctionnement cellulaire soutenu. L'augmentation de l'expression de RAGE a été observée dans un certain nombre de maladies inflammatoires aiguës et chroniques et coïncide avec l'accumulation de ses ligands. Le développement de nombreuses maladies humaines et leurs complications sont associés à ces voies. RAGE et ses ligands sont anormalement régulés lors du diabète, des maladies inflammatoires, des cancers et des maladies cardio-vasculaires, dont l'athérosclérose, des troubles neurodégénératifs (incluant la maladie d'Alzheimer), la polyarthrite rhumatoïde ainsi que les maladies chroniques inflammatoires de l'intestin (Chuah, Basir et al. 2013).

L'expression basale de RAGE est retrouvée notamment dans plusieurs cellules immunitaires et dans les cellules endothéliales. Dans un contexte inflammatoire, ces cellules expriment des ligands de RAGE. Les interactions de RAGE avec ses ligands régulent positivement son expression (Bierhaus, Humpert et al. 2005). Ainsi l'accroissement de la concentration des ligands de RAGE augmente son expression. Les cellules endothéliales exprimant RAGE interagissent physiquement avec les Mac 1 (qui sont une intégrine β2) des leucocytes. RAGE fonctionne ainsi comme un récepteur d'adhésion aux leucocytes et est impliqué dans le recrutement de cellules inflammatoires. En synergie, ces interactions induisent l'expression de facteurs pro-inflammatoires et de molécules d'adhérences recrutant les cellules inflammatoires (Chuah, Basir et al. 2013). RAGE est capable de moduler la réponse immunitaire innée (Bierhaus, Humpert et al. 2005). Dans un modèle murin présentant une délétion du gène de RAGE (-/-), une diminution significative de la migration des cellules de l'inflammation a été observée dans un contexte de péritonite (Chavakis, Bierhaus et al. 2003, Liliensiek, Weigand et al. 2004).

De plus, l'interaction AGE/RAGE initie la génération d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxidant species, ROS) via un mécanisme cytosolique dépendant de la NADPH oxydase. RAGE contribue ainsi à l'amplification du stress oxydant via l'induction des superoxydes mitochondriaux. Les AGEs générés par ce stress oxydant créent une boucle d'amplification du stress oxydant et de la signalisation de RAGE.

Le rôle critique de la signalisation de RAGE dans ces pathologies lui confère, ainsi qu'à ses ligands et ses formes associées (formes solubles cRAGE ou esRAGE), un rôle primordial de biomarqueur dans le diagnostic, le pronostic, le suivi et le traitement (blocage de RAGE ou mDIA1) de ces pathologies (Lee and Park 2013) dont les parodontites.

II.5. AGER1 un nouveau récepteur d'intérêt.

AGER1, codée par le gène DDOST, est une protéine conservée dans l'évolution. Sa délétion est létale. Elle est constituée d'un domaine transmembranaire court et d'une longue partie intra-cellulaire. AGER1 est la protéine antagoniste du récepteur RAGE. Elle lie et dégrade spécifiquement les AGEs, prévenant leur accumulation dans le cytoplasme et le milieu extra cellulaire. Elle est ainsi impliquée de manière critique dans la survie cellulaire et la régulation de ROS. En effet, ses taux d'expression sont positivement corrélés avec des protéines antioxydantes intracellulaires, telles que la Sirtuine (Sirt)-1 et négativement avec des voies pro-oxydantes telles que la NADPH oxydase et la translocation nucléaire de NfκB (p65) et donc la réponse de AGEs promue par RAGE.

Cette protéine d'environ 50 kDa est exprimée par la plupart des cellules incluant les macrophages et les cellules mononucléaires. Les niveaux de protéines AGER1 dans les cellules mononucléaires isolées du sang chez l'homme en bonne santé sont en corrélation avec les taux circulants d'AGE. Après de longues périodes d'exposition à des niveaux élevés d'AGEs, comme chez les patients atteints de diabète sucré ou de pathologies rénales chroniques, l'expression d'AGER1 diminue. Le niveau d'AGER1 est alors inversement proportionnel à la concentration intracellulaire de AGEs (Vlassara and Striker 2011).

AGEs et ROS s'accumulent alors, créant ainsi un cercle vicieux. La stimulation prolongée des macrophages par AGE inhibe l'expression d'AGER1 par ces cellules et favorise leur polarisation en un phénotype inflammatoire M1. Ce changement permettrait de promouvoir davantage la formation de ROS, un processus de l'inflammation chronique. Après une exposition prolongée à AGE, l'expression d'AGER1 disparaît de ces cellules inflammatoires et monocytaires. AGER1 est impliquée dans la régulation des réponses inflammatoires. Les changements dans l'expression d'AGER1 reflètent des ajustements d'états inflammatoires et métaboliques (figure 7) (Vlassara and Striker 2011).

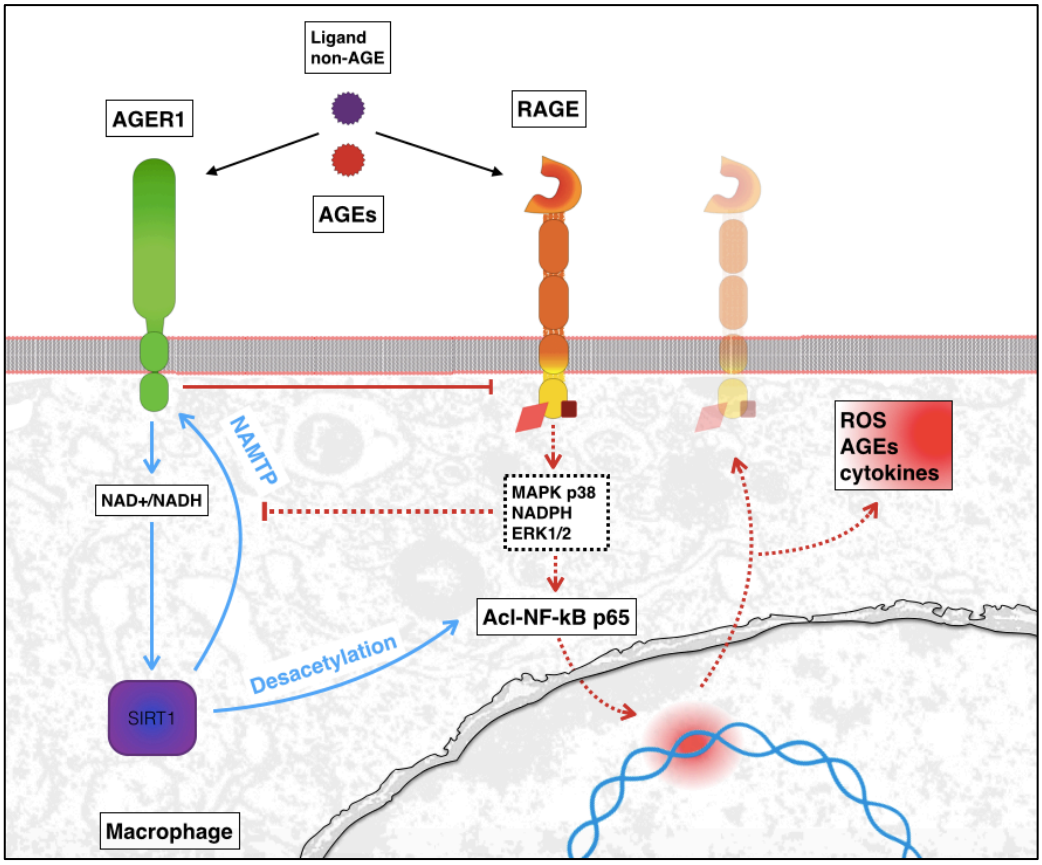

Figure 7: Voie de signalisation de AGER1 chez un macrophage

II.6. RAGE et les parodontites

Le lien entre RAGE et les parodontites a essentiellement été étudié dans la pathologie du diabète. Le diabète intensifie l'axe AGEs/RAGE et amène à un phénotype exacerbé par rapport à la physiopathologie des parodontites seules. L'agression bactérienne dans un environnement où l'expression de RAGE est accrue, tel que le parodonte d'une personne atteinte de diabète, conduirait à une inflammation exagérée et à des troubles de la réparation, provoquant une destruction parodontale accélérée et sévère. Les études animales indiquent que RAGE participerait à l'inflammation parodontale et diminuerait les capacités de cicatrisation du parodonte. En effet, dans un modèle murin d'infection orale avec *P. gingivalis*, une augmentation de l'expression dans les tissus gingivaux de RAGE, d'AGE et de MMP, parallèlement à une perte d'os alvéolaire augmentée, est observée chez les animaux diabétiques en comparaison aux groupes contrôles. L'administration de sRAGE, bloquant compétitivement les interactions de RAGE-AGE, permet une diminution des niveaux de TNFα, IL-6 et de MMP dans les tissus gingivaux et supprime les pertes osseuses alvéolaires chez les animaux diabétiques, indépendamment du niveau de glycémie. Un modèle « two-hit » semble s'appliquer dans la pathogenèse des parodontites associée au diabète où la

destruction parodontale est due à une sur-activation de l'axe RAGE-Ligands. Dans ce contexte, la charge bactérienne provoque une inflammation exagérée et des troubles de la réparation avec pour conséquence une destruction parodontale accélérée et sévère (Figure 8).(Lalla and Papapanou 2011)

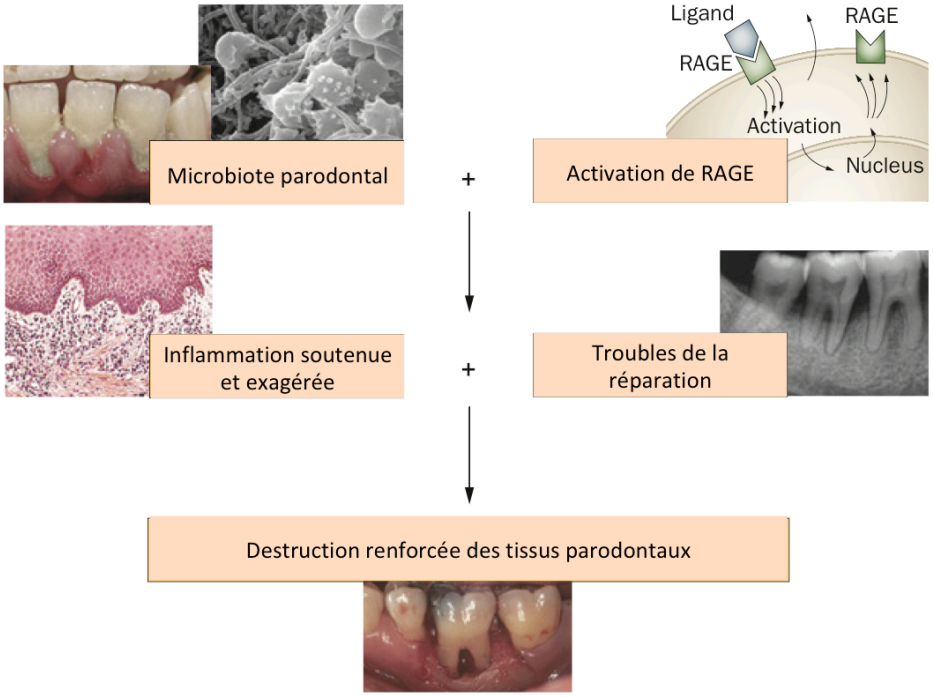

Figure 8: Le modèle « Two hit » pour la pathogenèse de la destruction parodontale chez les patients diabétiques

RAGE joue néanmoins un rôle non négligeable dans des parodontites seules. RAGE est exprimé par les cellules épithéliales, endothéliales et inflammatoires au niveau des tissus gingivaux de manière significativement plus importante chez les patients ayant des parodontites sévères avec ou sans diabète par rapport à des patients ayant un parodonte sain (Abbass, Korany et al. 2012).(figure 9)

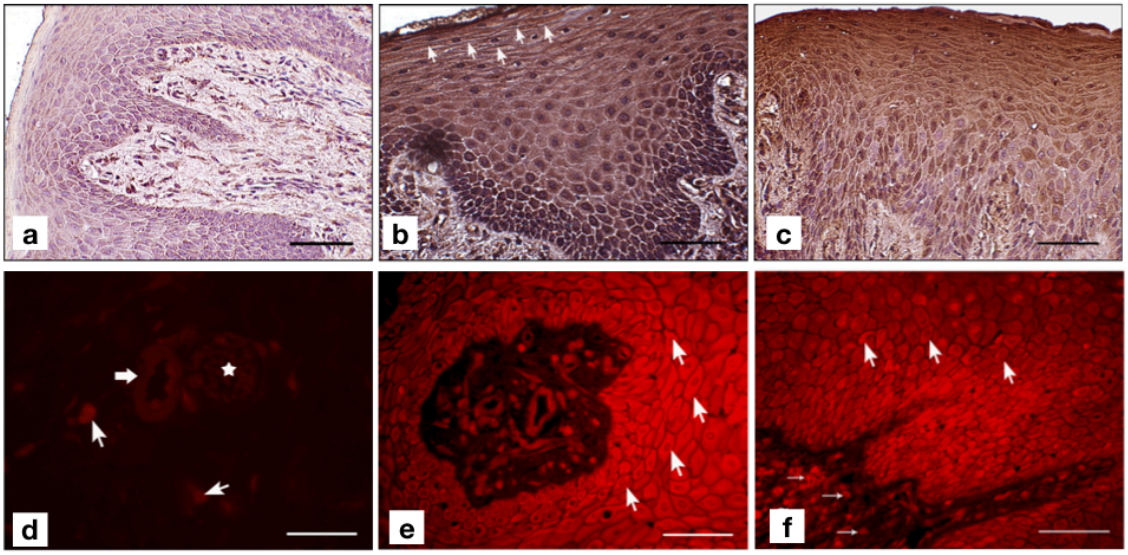

Figure 9 Immunolocalisation de RAGE (Abbass, Korany et al. 2012).

Marquage au peroxydase de raifort a) parodonte sain, b) Parodontite chronique d'un patient diabétique, c) parodontite chronique. Marquage par immunofluorescence (anticorps secondaire : rhodamine) d) parodonte sain, e) Parodontite chronique d'un patient diabétique, f) parodontite chronique. L'échelle représente 50 µm

Les parodontopathogènes activent RAGE, sa cascade inflammatoire, ce qui génère du stress oxydant (Chang, Chien et al. 2013). Les ROS induisent la génération des AGEs créant un cycle vicieux clos (Abbass, Korany et al. 2012). Les cellules inflammatoires (recrutées dans les zones d'inflammation où RAGE joue un rôle dans le chimiotactisme) libèrent s100/calgranulines et activent les récepteurs RAGE environnants, dont ceux des cellules épithéliales et endothéliales. Ces activations amènent à la génération de ROS, de cytokines, de molécules d'adhésion et de métalloprotéinases des tissus matriciels (MMPs). De plus les ROS sont responsables d'une augmentation de l'apoptose dans les zones les plus profondes de la poche parodontale (Abbass, Korany et al. 2012) (Figure 10). *In vitro* les AGEs et les ROS sont impliqués dans la suppression de la production de collagène des fibroblastes gingivaux et du ligament parodontal provoquant des microangiopathies et une altération de la cicatrisation. L'implication de RAGE dans les retards de cicatrisation chez les souris diabétiques a été étudiée sur des défauts osseux par craniotomie. Dans ce modèle, l'interaction de RAGE avec le ligand AGE carboxymethyllysine-albumine contribue à une cicatrisation osseuse retardée en l'absence d'infection. *In vitro*, il a été montré que la carboxymethyllysine exerce un effet apoptotique sur les ostéoblastes, médiée par RAGE, par activation des voies MAPK p38, JNK et des enzymes caspase 3 et caspase 8. L'accumulation d'AGEs et leur interaction avec RAGE contribuent également à l'ostéoclastogenèse par augmentation de l'expression de RANKL et à la régulation négative de l'ostéoprotégérine OPG.

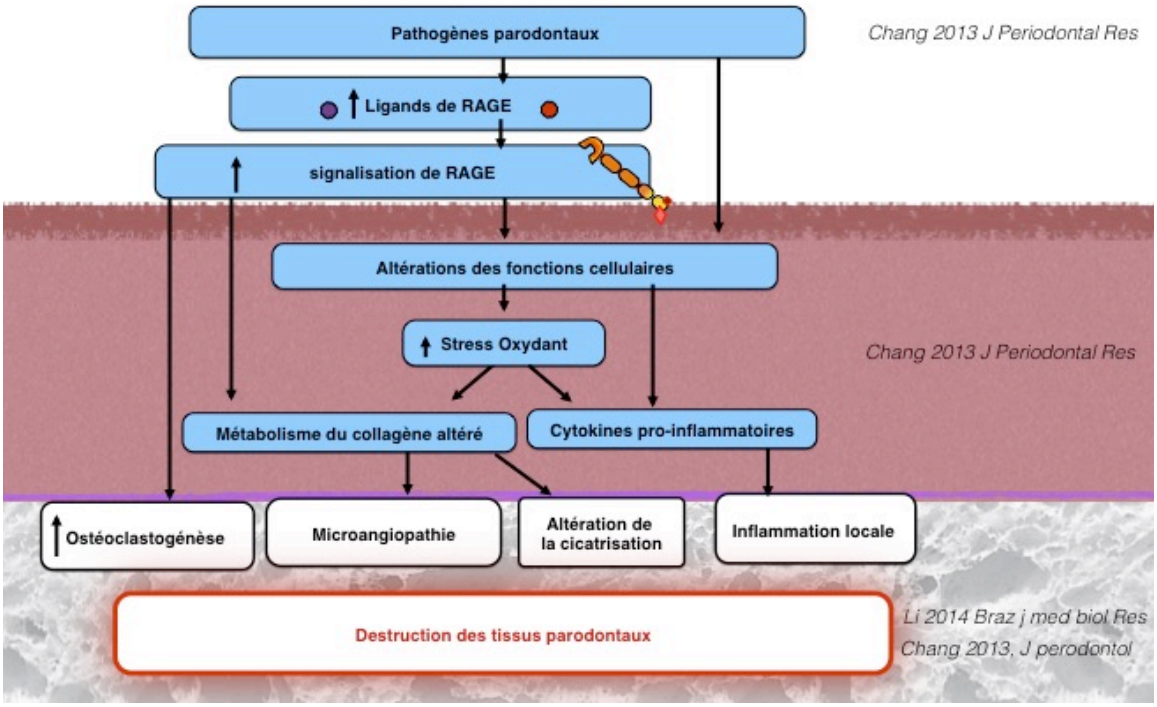

Figure 10: Interrelation entre RAGE et les parodontites

II.7. Les formes solubles de RAGE : un intérêt grandissant

Pour rappel, les sRAGE sont constituées principalement d'esRAGE, produit par épissage alternatif, et de cRAGE générée par des métalloprotéines. Le clivage de cRAGE est notamment promu par une augmentation de la concentration d'un de ses ligands HMGB1 (Sugaya, Fukagawa et al. 1994).

cRAGE et esRAGE sont fonctionnellement équivalents. esRAGE constitue 20% des formes solubles de RAGE. Les formes solubles de RAGE agissent comme un récepteur leurre et permettent de réguler l'activité de RAGE par inhibition compétitive. Les sRAGE se lient aux différents ligands de RAGE sans traduire de signaux. En dehors de ce rôle concernant RAGE, cette inhibition compétitive s'applique aux autres nombreux récepteurs avec lesquels les ligands de RAGE interagissent, tels que la famille des Toll like receptors TLR (Bierhaus, Humpert et al. 2005). L'injection de sRAGE *in vitro* et in vivo conduit au blocage effectif du récepteur RAGE transmembranaire. Les formes solubles de RAGE ont été évaluées pour leurs qualités thérapeutiques à l'encontre des pathologies et de leurs complications mais aussi de biomarqueurs.

II.7.1.Le traitement par sRAGE

L'administration de formes solubles de RAGE dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (exclusivement animaux) a été testée. *In vitro* elles bloquent l'expression des marqueurs de l'inflammation, de migration cellulaire, de prolifération et de cytotoxicité (Yan, Ramasamy et al. 2010). *In Vivo* elles suppriment de nombreuses pathologies telles que les pathologies micro et macro vasculaires, notamment de l'athérosclérose (Sakaguchi, Yan et al. 2003, Wendt, Tanji et al. 2003) dans des modèles murins. Elle réduit les complications du diabète expérimental (dysfonctions myocardiques, complications rénales, rétiniennes et neuropathies) (Chen, Yan et al. 2004, Yan, Ramasamy et al. 2010) et les retards de cicatrisation (Goova, Li et al. 2001). sRAGE protège contre le développement de tumeurs primaires et le développement de métastases (Taguchi, Blood et al. 2000). Dans un modèle de polyarthrite rhumatoïde, où RAGE est fortement exprimé par les macrophages résidant des tissus articulaires, l'administration de sRAGE réduit l'œdème articulaire, l'érythème et supprime l'activation des cytokines pro-inflammatoires et des métalloprotéinases (Hofmann, Drury et al. 2002). L'injection de sRAGE augmente le taux de survie du modèle murin dans le cas d'infections et de lésions massives (Yan, Ramasamy et al. 2010). Enfin au niveau parodontal, l'administration de sRAGE bloque la destruction de l'os alvéolaire dans un modèle de parodontite chez la souris diabétique (Lalla, Lamster et al. 2000).

Les formes solubles, en se liant aux ligands de RAGE, ont montré leur intérêt thérapeutique. Il est important cependant de noter que l'expression de sRAGE n'a pas été étudiée chez le gros animal ni même chez l'homme dans le contexte de la maladie parodontale. Singulièrement, sRAGE n'est pas mesurable quantitativement dans le sérum des modèles murins mais est détectable chez l'homme.

II.7.2. sRAGE/esRAGE : un nouveau biomarqueur d'intérêt ?

Depuis la première description de niveaux détectables de sRAGE ou esRAGE dans le sérum, de nombreuses études dans la littérature ont établi des corrélations entre les différentes concentrations des formes solubles de RAGE et la présence de pathologies ainsi que leurs sévérités. La concentration de sRAGE et de esRAGE au niveau systémique (sérum) varie en fonction de diverses pathologies, en particulier du diabète et des maladies inflammatoires. (Tableau 3)

Le cas particulier du diabète et de l'insuffisance rénale *:* La concentration sérique de sRAGE est plus élevée en cas d'insuffisance rénale due, notamment, à la diminution de la fonction de la clairance. Dans le cas du diabète, les résultats de nombreuses études sont

contradictoires. Dans ces deux situations, les concentrations tissulaires de RAGE et les concentrations tissulaires et sériques des AGEs sont augmentées. (Maillard-Lefebvre, Boulanger et al. 2009, Yan, Ramasamy et al. 2010).

Les pathologies inflammatoires : La concentration sérique de sRAGE est diminuée ; sRAGE pourrait devenir un biomarqueur d'intérêt dans le suivi de pathologies, de leur sévérité ainsi que de la réponse du patient à une thérapeutique. Au regard de la littérature, la concentration sérique de sRAGE est diminuée dans un certain nombre de pathologies telles que l'athérosclérose, les maladies coronariennes, l'hypertension essentielle et la maladie d'Alzheimer. Plus spécifiquement, l'expression d'esRAGE est diminuée dans d'autres pathologies comme l'infarctus du myocarde et le diabète.

Conditions	**sRAGE**	**esRAGE**	**Références**
Diabète de type 2	↓ ↑	↓	(Grossin, Wautier et al. 2008)
Diabète de type 1	↑	↓	(Challier, Jacqueminet et al. 2005, Katakami, Matsuhisa et al. 2005, Koyama, Shoji et al. 2005)
Insuffisance rénale	↑	↑	(Kalousova, Hodkova et al. 2006, Dalal, Semba et al. 2011)
hypercholestérolémie	↓		(Santilli, Bucciarelli et al. 2007)
hypertension essentielle	↓		(Geroldi, Falcone et al. 2005)
Maladie d'Alzheimer	↓		(Emanuele, D'Angelo et al. 2005)
Arthrite rhumatoïde	↓		(Pullerits, Bokarewa et al. 2005)
Maladie de Kawasaki	↓		(Wittkowski, Hirono et al. 2007)
Coronaropathies	↓		(Falcone, Emanuele et al. 2005)
Artériopathie oblitérante des membres inférieurs	↓		(Catalano, Cortelazzo et al. 2008)
Broncho-pneumopathie chronique obstructive	↓		(Boschetto, Campo et al. 2013)

Table 3 : Concentration sérique de sRAGE et esRAGE en fonction de différentes pathologies

sRage et esRAGE sont corrélés à différents facteurs. Ils sont notamment corrélés négativement avec l'âge, la pression artérielle systolique et l'indice de masse corporelle. De surcroît, esRAGE et sRAGE sont corrélés positivement avec l'adiponectine. sRAGE est inversement corrélé à la durée du diabète et esRAGE au taux de HbA1c.(Norata, Garlaschelli et al. 2009).

II.8. Objectifs

Les parodontites sont des pathologies inflammatoires chroniques à forte prévalence, aux conséquences orales et systémiques notables. Nous ne disposons pas à ce jour de biomarqueurs pour aider au diagnostic, pronostic, suivi et conséquences extra orales des parodontites. Le récepteur RAGE est impliqué dans la physiopathologie des parodontites liée au diabète. Son implication et celle de ses formes solubles n'ont été que très peu étudiées dans les parodontites non associée au diabète.

L'objectif principal de ce travail a été de réaliser une étude transversale afin d'évaluer l'expression des formes solubles de RAGE au niveau systémique selon l'existence d'une parodontite chronique dans le sérum et la salive, d'évaluer leur intérêt comme biomarqueurs de la parodontite chronique. L'évaluation de RAGE et de son antagoniste AGER1 a aussi été évaluée au niveau local dans des biopsies gingivales.

III. PATIENTS ET METHODES

Cette étude est de nature transversale. L'échantillon est issu d'une population sélectionnée sur la présence ou l'absence de la parodontite chronique. La description de la population et la méthode de recueil des échantillons ont été décrites (voir annexe 1)(Detzen, Chen et al. 2017)

III.1. Participants

III.1.1. Sélection des patients

L'étude a été conduite en accord avec la déclaration d'Helsinski de l'association médicale mondiale et approuvée par le « *Columbia institutional Review Board (AAAE7056)* ». Les patients ont signé un consentement éclairé avant le début de leur participation. Cent quarante patients présentant une parodontite chronique et patients parodontalement sains âgés de 26 à 65 ans ont été recrutés pendant un entretien individuel, à la clinique de l'université de médecine dentaire de Columbia à New York.

III.1.1.1. Les critères d'inclusion

<table>
<tr><td rowspan="2">Critères d'inclusion généraux</td><td colspan="2">Homme et Femme</td></tr>
<tr><td colspan="2">Age Supérieur à 20 ans</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Critères d'inclusion parodontaux</td><td>Groupe ayant une parodontite chronique</td><td>Groupe contrôle</td></tr>
<tr><td>Parodontite chronique généralisée, modérée à sévère
(définie par la présence d'au moins deux poches parodontales dans deux quadrants mesurant 5 mm ou plus, ayant des pertes d'attache concomitantes de plus de 3 mm et saignement au sondage supérieur à 30%</td><td>Ayant un parodonte sain (les patients ayant une perte d'attache n'excédant pas 2 mm et aucune poche parodontale excédant 4 mm).</td></tr>
<tr><td colspan="2">Plus de 20 dents</td></tr>
</table>

Table 4 : Critères d'inclusion

III.1.1.2. Les critères d'exclusion

Fumeurs réguliers ou anciens fumeurs ayant cessé moins de 6 mois avant le début du recrutement
Patients ayant pris des antibiotiques, de l'aspirine, et/ou des anticoagulants moins de 3 mois avant le début du recrutement
Patientes enceintes
Patients ayant des pathologies systémiques incluant : diabète, pathologie cardio-vasculaire, maladie rhumatismale, maladie inflammatoire intestinale et rénale.

Table 5 : Critères d'exclusion

Soixante et onze hommes et cinquante et une femmes (âgés de 26 à 65 ans, avec un âge moyen de 43 ans) ont été recrutés. Soixante-dix patients pour le groupe parodontite et le groupe contrôle ayant un parodonte sain ont été recrutés.

III.1.2. Examen clinique

Un examen parodontal complet a été effectué en tenant compte de six sites par dent, et toutes les dents ont été examinées par deux examinateurs calibrés utilisant une sonde parodontale manuelle (UNC-15, HU-Friedy, Chicago, IL). La présence de plaque dentaire (PD) et de saignement au sondage (SS) a été mesurée de manière dichotomique. La profondeur de poche et la perte d'attache ligamentaire ont été mesurées au millimètre près. La présence de la plaque dentaire de manière quantitative traduit le niveau d'hygiène bucco-dentaire du patient (compliance du patient au brossage et des conseils d'hygiène bucco dentaire). La profondeur de poche et la perte d'attache ligamentaire sont des indices permettant la quantification précise de la destruction tissulaire. La profondeur de poche, ou profondeur de sondage, est la distance entre la gencive marginale et le fond de la poche parodontale. La perte d'attache est la distance de la jonction amélo-cémentaire (JAC) au fond de la poche parodontale (Figure 11). Le poids et la taille des participants ont été mesurés afin de calculer leur indice de masse corporelle (IMC).

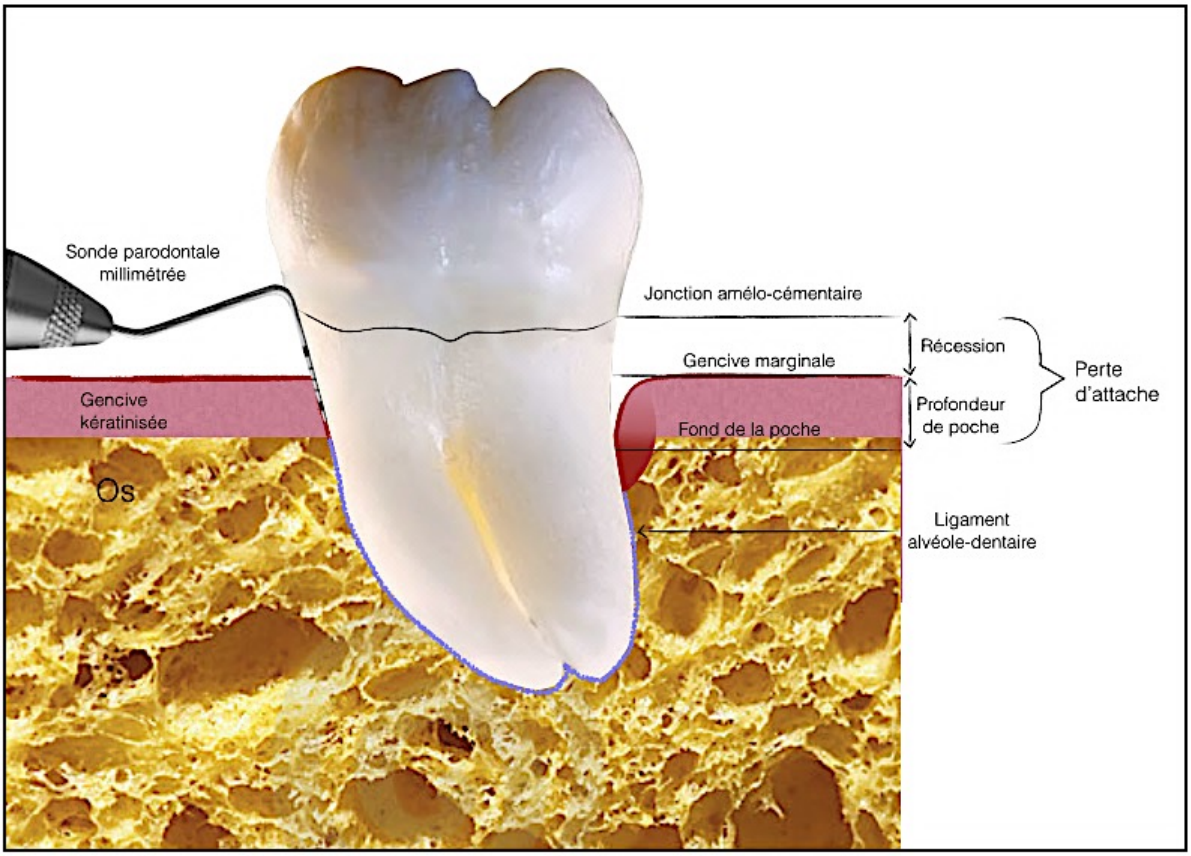

Figure 11 : schéma d'une coupe sagittale d'une dent pluriradiculée et de son tissu de soutien.

III.2. Recueil des échantillons

Des échantillons sanguins (n=140) et salivaires (n=40) ont été prélevés dans la population (figure 10)

III.2.1. Collection sanguine

Trente-cinq ml de sang veineux pour chaque participant a été collecté par deux infirmiers dans des tubes de collections contenant de l'EDTA (Vacutainer, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Le sérum est obtenu grâce à l'utilisation d'un tube séparateur de sérum (SST). Les échantillons sont centrifugés à 1000 g pendant 15 min. Enfin, le sérum est aliquoté et entreposé à -80°C.

III.2.2. Collection salivaire

5 ml de salive non stimulée a été collectée par expectoration dans un tube de collection de 50 ml puis aliquotée et stockée à -80°C. Avant utilisation, les échantillons sont centrifugés à 10000 g pendant 2 min. L'objectif est de précipiter la partie du mucus et les éventuels débris alimentaires qui pourraient interférer avec le test ELISA.

III.2.3. Collection de biopsie gingivale

Chez 20 patients présentant une parodontite chronique généralisée modérée à sévère, deux biopsies papillaires ont été prélevées. Le premier échantillon a été biopsié au niveau d'un site atteint caractérisé par PP > 4 mm et un AL≥ 3 mm associé à un SS positif. La deuxième biopsie a été excisée au niveau d'un site non atteint parodontalement caractérisé par PD< 4mm , AL≤ 2 mm et un SS négatif. Les spécimens ont été entreposés dans un agent stabilisateur d'ARN (RNAlater, Ambion, Austin, TX) et stockés dans du nitrogène liquide. Ces biopsies sont des déchets biologiques prélevés lors de chirurgies parodontales ou associées à des avulsions dentaires (figure 12).

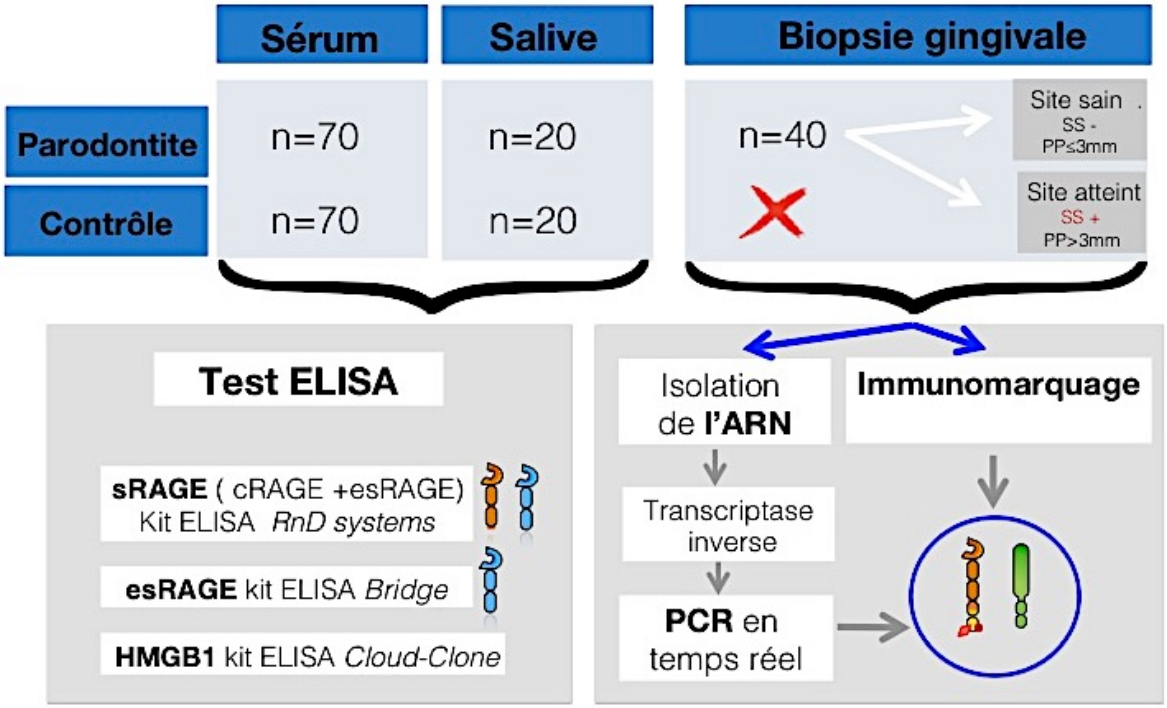

Figure 12: Caractéristiques des prélèvements et méthodes réalisées

III.3. Concentration sérique et salivaire de sRAGE, esRAGE et HMGB1 par Test ELISA

III.3.1 Principe

Des techniques immuno-enzymatiques de dosage d'immuno-absorption par enzyme liée ou Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay (ELISA) de type « sandwich » ont été réalisées pour détecter les différents analytes et déterminer leur concentration (Shah and Maghsoudlou 2016). sRAGE, esRAGE, HMGB1 ont été évalués dans des échantillons sériques et salivaires. Les protocoles des différents fournisseurs ont été suivis, seules les recommandations de dilutions ont été modifiées, en se basant sur la littérature. Les kits utilisés sont les suivants : SRAGE (R&D Systems, Minneapolis), esRAGE / (B-Bridge international, Cupertino, CA), HMGB1 / (cloud-clone corp, Texas), sCD163 /(R&D Systems, Minneapolis). (Voir tableau 6).

	sRAGE	esRAGE	HMGB1
Facteur de dilution	-Pas de dilution	-Pas de dilution	500X recommandé 50X réalisé au vu de la littérature
Spécificité	cRAGE et esRAGE	Human esRAGE	HMGB1
Réaction croisée	< 0.5% de réactivité croisée avec d'autres molécules en relation. < 50% de réactivité inter-espèces	Non significatif	Non significatif
Sensibilité	16.14 pg/mL	0.025 ng/ml	5.1pg/mL
Limite de détection	78 - 5,000 pg/mL	0.05 - 3.2 ng/ml	12.5-800pg/mL
Interférence	Pas d'interférences significatives	Pas d'interférences significatives	Pas d'interférences significatives
Précision	Intra-Assay:CV= 6.2% Inter-Assay:CV< 8.2%	Non renseigné	Intra-Assay: CV<10% Inter-Assay:CV<12%
Lien	http://www.rndsystems.com/pdf/drg00.pdf	http://cdn.b-bridge.com/products/K1009-1_Protocol.pdf	http://www.cloud-clone.us/manual/ELISA-Kit-for-High-Mobility-Group-Protein-1-(HMG1)-E90399Hu.pdf

Table 6 : Caractéristiques des différents tests ELISA

III.3.2. protocole

III.3.2.1 Fixation de l'analyte

Une microplaque coatée de l'anticorps de capture spécifique de l'analyte d'intérêt est fournie par le fabriquant. Les échantillons sont préparés et dilués (tableau 5). Une gamme de référence est réalisée en diluant en cascade un échantillon dont la concentration est connue. Le rapport de dilution entre chaque contrôle positif est de 2. Nous obtenons une gamme dont les limites de concentrations maximale et minimale détectables sont connues. Les échantillons et contrôles sont disposés sur la plaque. Tous les analytes présents dans les échantillons se lient à l'anticorps de capture après un temps d'incubation variable. Par la suite, des lavages sont réalisés et le substrat non lié, donc non spécifique, est évacué. (figure13)

III.3.2.2. Fixation de l'anticorps de détection

Un anticorps dit de détection couplé à la peroxydase de Raifort (HPR) est ajouté et se lie à un autre épitope de l'analyte capturé après un temps d'incubation. De multiples lavages sont réalisés, les anticorps de détection en excès sont éliminés (figure 14).

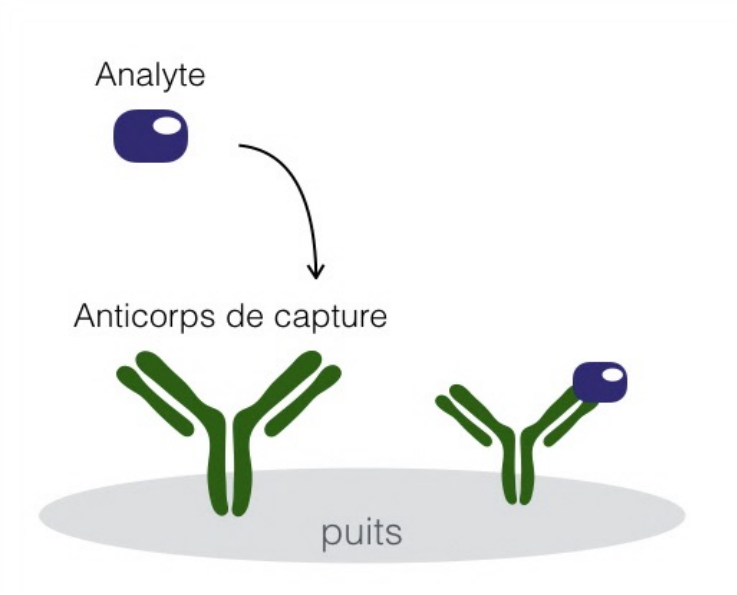

Figure 13: capture des analytes par l'anticorps primaire

III.3.2.3 Révélation

Enfin, le substrat de l'enzyme HRP, le Tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté dans les puits. La peroxydase oxyde la TMB incolore en substrat chromatique, une couleur bleue, se développe proportionnellement à la quantité d'anticorps couplée à la HRP présente dans le puits. La concentration colorimétrique reflète la quantité d'analyte présente dans l'échantillon. La réaction est arrêtée avec une solution stop (acide sulfurique) provoquant la transformation de la couleur bleue en jaune (figures 15,16). Un spectrophotomètre, lecteur de microplaque (Spectramaxplus 384, molecular device Sunnyvale, CA), mesure l'absorbance des puits à une longueur d'onde de 450 nm selon la loi de Beer-Lambert. Le degré d'absorbance est corrélé à la saturation colorimétrique du milieu. Il est donc proportionnel à la quantité d'analyte lié. La concentration exacte est enfin calculée grâce à la courbe de référence définie par la gamme de référence.

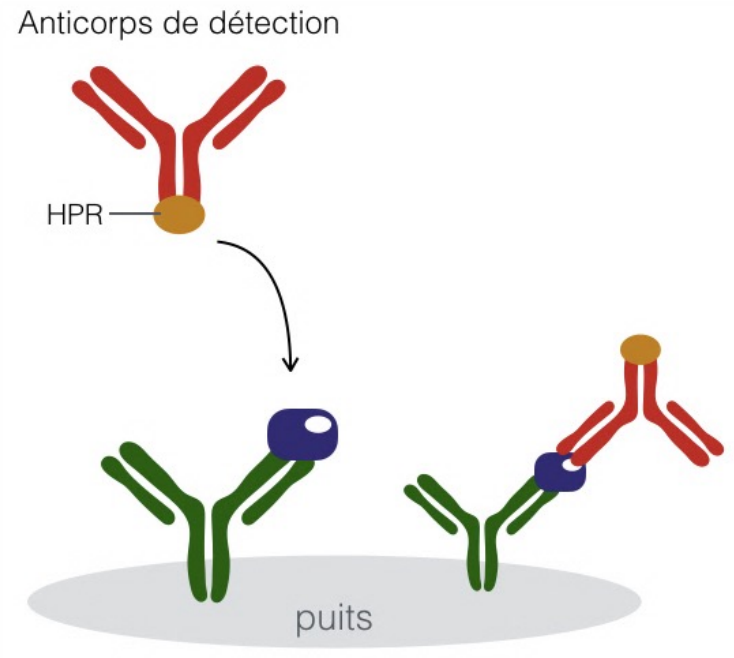

figure 14: Etape de fixation de l'anticorps de détection

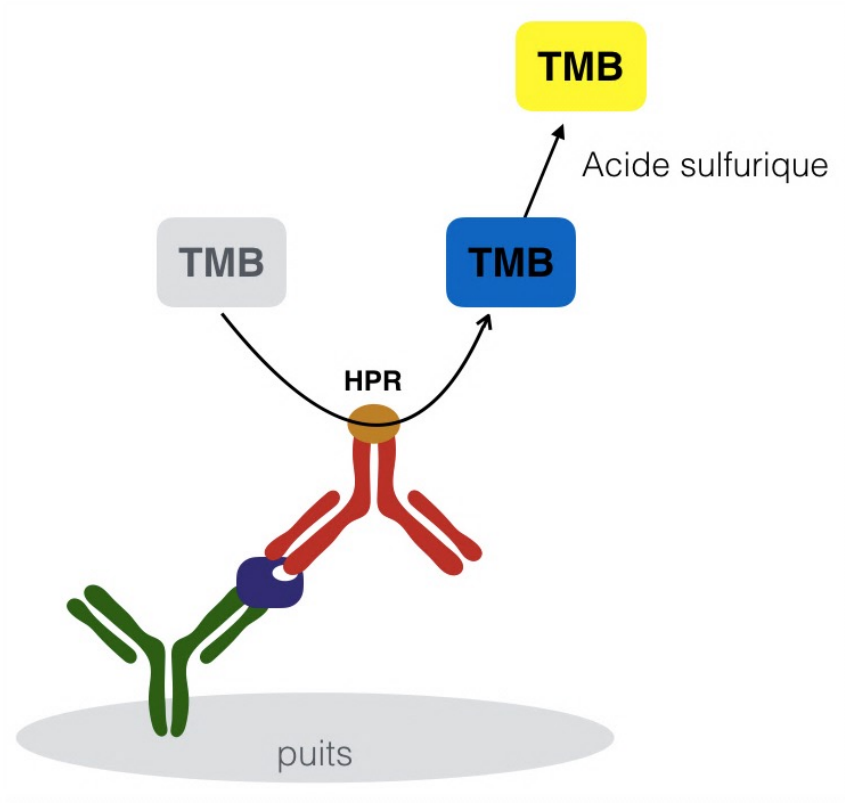

Figure 15 : Représentation de l'étape de révélation

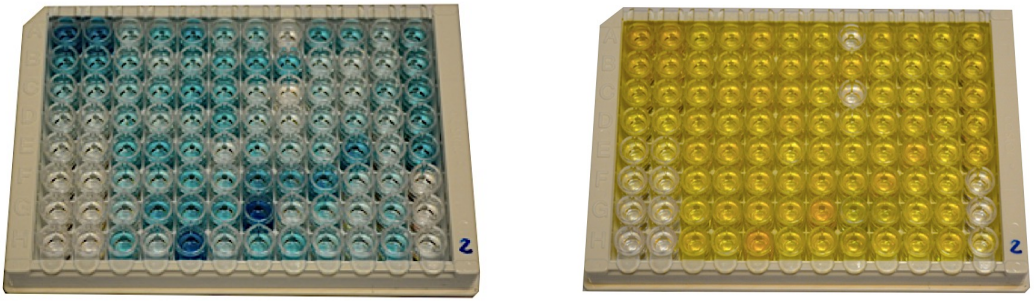

Figure 16: Test ELISA, après incubation du substrat de révélation (TMB) et mise en place de la solution stop.

III.4. Quantification de l'expression génique relative de RAGE et AGER1 par transcriptase inverse et qPCR.

III.4.1. Principe

La technique quantitative, réaction en chaine de la polymérase (qPCR), permet la quantification ciblée de l'ARN de RAGE et AGER1 contenus dans les biopsies gingivales provenant de sites atteints par la parodontite chronique par rapport à des sites non atteints. Elle permet d'évaluer l'implication de l'expression de ces gènes dans la physiopathologie de la parodontite chronique, d'obtenir et de quantifier à partir d'échantillons complexes et peu abondants d'importantes quantités d'un fragment d'ADNc spécifique grâce à une amplification exponentielle (millions de copies en quelques heures) (Santos, Sakai et al. 2004).

III.4.2. Protocole

III.4.2.1. Extraction de L'ARN

Pour évaluer l'expression de gènes dans nos biopsies, l'utilisation de L'ARN et sa quantification sont une solution d'intérêt. L'ARN de ces tissus doit être extrait. Les 40 biopsies sont homogénéisées dans un buffer (Trizol; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Après leur incubation dans du chloroforme et centrifugation à 12000g, la phase aqueuse supérieure est récupérée. L'ARN est précipité par un mélange isopropylique, une seconde centrifugation, associée à un lavage à l'éthanol, est réalisée. L'ARN total extrait est purifié et isolé (RNeasy; Qiagen, Valencia, CA, USA). Il est enfin quantifié par spectrophotométrie et sa concentration est standardisée.

III.4.2.2. La transcription inverse

La transcriptase inverse permet la synthèse du brin complémentaire des ARN. Cette synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée en utilisant un kit (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems, USA). La transcriptase inverse est une ADN polymérase ARN dépendante, naturellement présente chez les rétrovirus, catalysant à partir d'un brin d'ARN matrice un brin d'ADNc. (Mullis and Faloona 1987). Pour chaque échantillon, 10 µl de notre solution d'ARN total sont mélangés à une solution de 10 µl constituée de RT buffer, dNTP MIX (100 mM), RT Random Primers MultiScribe™, Reverse

Transcriptase, RNase Inhibitor. Un cycle thermique est réalisé grâce à un thermocycleur permettant la réaction. Les échantillons sont chauffés à 25°C pendant 10 minutes puis à 37°C pendant 120 minutes. Enfin, les échantillons sont inactivés à 85°C pendant 5 mn et refroidis à 4°C. Les échantillons sont stockés à -15°C pour leur utilisation ultérieure. Les ADNc produits ont été utilisés pour la réaction de PCR quantitative.

III.4.2.3. La PCR quantitative

La technique de PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) consiste en une succession de réplications grâce à une amorce ou primer de séquences d'ADNc spécifiques. Chaque cycle s'effectue en trois étapes : la dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin. Il s'ensuit l'hybridation des amorces de la séquence à amplifier. Enfin la polymérisation du brin complémentaire est réalisée. Les brins ADNc correspondant aux primers sont amplifiés de manière exponentielle. La concentration relative est évaluée par l'intensité de la fluorescence (SYBR green) émise de chaque puit. L'intensité du signal fluorescent est directement corrélée à la quantité d'amplicons générée durant la réaction de PCR. La quantité relative d'ARN est déterminée grâce à la méthode $2^{-\Delta\Delta ct}$. La Beta-actin a été choisie comme gène de référence permettant le contrôle interne durant la qPCR. Les primers de RAGE et AGER1 ont été sélectionnés sur Primerbank (tableaux 7-8).

Les échantillons à amplifier sont préparés : les 2 µl d'ADNc sont ajoutés à une solution composée d'un mélange de 5 µL de SYBR Green (Power SYBR green Pcr Mastermix , Applied Biosystems, USA), d'ADN polymerase, de nucléotides , 0.6 µL de l'amorse sens et antisens à 10uM spécifique de RAGE ou AGER1. Les réactifs sont placés dans des puits. Chaque échantillon est évalué en duplicata associé à un contrôle négatif. Les solutions sont soumises à des cycles thermiques grâce à un thermocycleur Step One Plus RT-PCR system (Applied Biosystems, USA) permettant la réaction (Kubista, Andrade et al. 2006, Schefe, Lehmann et al. 2006).

PrimerBank ID	332800984c1			
Taille de l'amplicon	76			
	Séquence (5' -> 3')	Longeur	Tm	Localisation
Amorse sens	GTGTCCTTCCCAACGGCTC	19	62.6	230-248
Amorse antisens	ATTGCCTGGCACCGGAAA	19	62.5	305-287

Table 7 : Amorce pour RAGE

PrimerBank ID	112382210c1			
Taille de l'amplicon	189			
	Séquence (5' -> 3')	Longeur	Tm	Localisation
Amorse sens	GAGACTCATTCGCTTTTCTTCCG	23	61.5	172-194
Amorse antisens	CTCCAAAATCTTCTACCGAAGGG	23	60.4	325-303

Table 8: Primer pour AGER-1

III.5. Histologie

Deux biopsies gingivales de sites atteints par la parodontite chronique ont été utilisées pour évaluer qualitativement la présence de RAGE et AGER1 par immunomarquage.

Les pièces sont fixées dans du formaldéhyde à 10 % permettant la conservation des structures immédiatement après l'exérèse de la biopsie. Déshydratés dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, les échantillons sont ensuite placés dans des bains de xylène remplaçant l'éthanol et miscibles avec la paraffine. L'inclusion des biopsies dans la paraffine est ensuite effectuée. Les blocs de paraffine sont sectionnés à 6 microns d'épaisseur grâce à un microtome. Les sections sont montées sur lames.

III.5.1. Coloration à l'Hématoxyline -Éosine

Une coloration standard à l'hématoxyline-éosine a été réalisée permettant d'étudier la structure tissulaire. Elle consiste en une coloration bi-chromique alliant une coloration nucléaire par hématoxyline et une coloration cytoplasmique grâce à l'éosine.

III.5.2. Immunomarquage

III.5.2.1. Principe

L'immunomarquage est une technique utilisée pour localiser une protéine dans une coupe de tissu par une réaction immuno-histochimique d'antigène-anticorps. L'objectif est d'évaluer qualitativement la distribution et la localisation des protéines RAGE et AGER1 au niveau cellulaire de nos biopsies de papilles gingivales (Maity, Sheff et al. 2013). La technique de l'immuno-peroxidase utilise deux anticorps. L'anticorps primaire cible spécifiquement une protéine. Ces anticorps fixés sont détectés grâce à un anticorps secondaire se liant spécifiquement à la portion invariante de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire a la particularité d'être couplé à une peroxydase de Raifort permettant de détecter optiquement le complexe immun localement formé (figure 17).

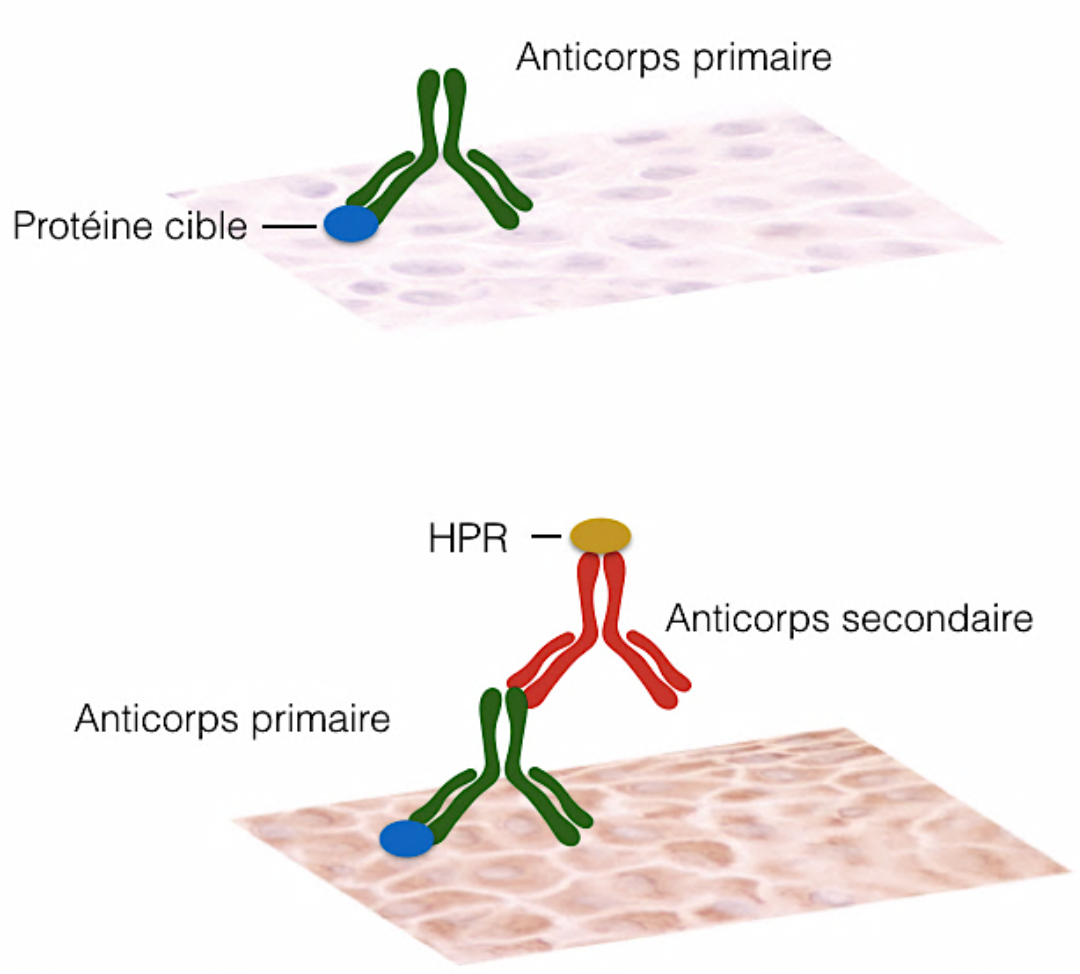

Figure 17 : Principe de l'immunomarquage

III.5.2.2. Technique

Les sections préalablement déparaffinées et réhydratées sont incubées dans une solution permettant la meilleure exposition des antigènes (RAGE :Vector H-3301 pH 9 ; AGER1 : Vector H-3300 citrate pH 6). Le blocage de la peroxydase endogène est ensuite réalisé évitant ainsi tout faux positif. Pour réduire les réactions aspécifiques une incubation des lames dans du sérum bovin est réalisée pendant 20 minutes. Puis, sans rinçage, les lames sont incubées avec les anticorps primaires monoclonaux de chèvre anti-RAGE (Chemicon International, Inc., Tamecula, CA, USA) ou des anticorps monoclonaux de lapin anti-AGER-1 (Abcam, Cambridge, MA, USA) pendant 4 heures à température ambiante pour l'immuno-marquage respectif de RAGE et AGER1. Après rinçage dans du PBS, les sections ont été incubées avec les anticorps secondaires Anti-chèvre et anti-lapin (vector Burlingame, CA, USA) respectivement pour RAGE et AGER1. Enfin du substrat 3,30-diaminobenzidine (DAB) est appliqué pendant la même période de temps permettant la production d'une coloration brune. Les sections sont contre-colorées avec de l'hématoxyline de Mayer (Sigma, St. Louis, MO, USA) pendant 30 secondes. Les contrôles négatifs sont réalisés en omettant l'inclusion de l'anticorps primaire.

III.6. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS, version 9.4. Une valeur de $p<0.05$ est considérée comme statistiquement significative. Les variables continues ont été comparées entre les sujets sains et atteints de parodontite chronique en utilisant two-sample t-tests. Les variables dichotomiques ont été comparées en utilisant un test de Chi-square. L'association entre la concentration sérique de sRAGE, esRAGE et cRAGE et les paramètres parodontaux, l'âge et l'IMC a été réalisée grâce à la corrélation de Pearson. La concentration sérique de sRAGE, esRAGE et cRAGE a été enfin corrélée au statut parodontal et contrôlée pour l'âge, l'IMC et le sexe grâce à l'utilisation de régressions linéaires multiples.

IV. RESULTATS

IV.1. Population

IV.1.1. Résultats démographiques

La Tableau 9 décrit les caractéristiques démographiques, l'indice de masse corporelle (IMC) et le statut parodontal des participants. Nous observons que l'IMC est statistiquement supérieur dans le groupe atteint de parodontite chronique (27.9 ±5.4kg/m2) par rapport au groupe contrôle (25.3 ±4.3/m2 p=0.008). De par la conception de l'étude, les variables relatives aux paramètres parodontaux diffèrent significativement entre les deux groupes.

Variables	Groupe parodontite	Groupe contrôle	*p* value
Age (Année)	42.9 ± 9.9	42.9 ± 9.8	0.620
Genre (femme)	33 (47%)	28 (40%)	0.394
IMC (kg/m^2)	27.9 ± 5.4	25.3 ±4.3	0.008
# dent présente	25.8 ± 2.4	26.4 ± 2.2	0.006
% sites avec plaque	66 ± 16	0.22 ± 0.13	< 0.001
% sites avec SS	60 ± 17	15 ± 9	< 0.001
PP moyen (mm)	3.84 ± 0.79	2.18 ±0.31	< 0.001
% sites avec PP ≥5mm	32.40 ± 17	0.001 ± 0.004	< 0.001
PA moyenne (mm)	3.61 ± 1.1	0.92 ± 0.4	< 0.001

Table 9. Démographie de la population et variables parodontales cliniques par groupe. Les données sont présentées avec la moyenne **± SD ou n (%). Les valeurs p proviennent de tests statistiques : two-samples t-tests ou Chi-square tests, comparant les deux groupes.**

IV.2. Concentration de sRAGE et esRAGE

IV.2.1. Concentration sérique de sRAGE et esRAGE

La concentration sérique de RAGE soluble (sRAGE) est significativement (p=0 .0077) inférieure chez les patients atteints de parodontite chronique (0.947 ng/mL±0.12) par rapport au groupe contrôle (1.171 ng/mL±0.1) (figure 18 A). La concentration sérique de esRAGE ne montre aucune différence significative entre les deux groupes (groupe parodontite chronique : 0.287 ng/mL±0.04; groupe contrôle 0.295 ng/mL ±0.03; p=0.775) (figure 18 B). La concentration de cRAGE (partie clivée de sRAGE), qui résulte de la différence entre sRAGE et esRAGE comme vu précédemment (cRAGE=sRAGE-esRAGE), est significativement inférieure (p=0.0008) dans le groupe de patients atteints de parodontite chronique (0.658 ng/mL ±0.08 vs 0.875 ng/mL±0.08 pour le groupe contrôle) (figure 18 C).

Les concentrations de esRAGE et de sRAGE sont corrélées positivement, de même que sRAGE et cRAGE et esRAGE et cRAGE dans chaque groupe et dans la population totale (respectivement : 0.78 ; 0.95 ; 0.59 ; p<0.0001). esRAGE représente 27.83 % de la partie soluble totale de RAGE dans le sérum de la population totale et respectivement 25.6 % et 30.5% dans les groupes contrôle et parodontite chronique (figure 18 DEF).

Une régression linéaire multiple permettant d'ajuster les variables exogènes (IMC, âge, genre) a été réalisée. La différence de concentration sérique de sRAGE entre les deux groupes après régression n'est plus significative p=0.08. La différence de concentration sérique de cRAGE reste significative entre les deux groupes (p=0.01). Dans ces deux analyses la covariable IMC est statistiquement différente de 0 et de son coefficient de signe négatif.

IV.2.2. Concentration salivaire de sRAGE et esRAGE

Les concentrations salivaires de sRAGE et d'esRAGE sont en-dessous du seuil de détection des ELISA respectifs. Les courbes de références pour ces tests étaient valides.

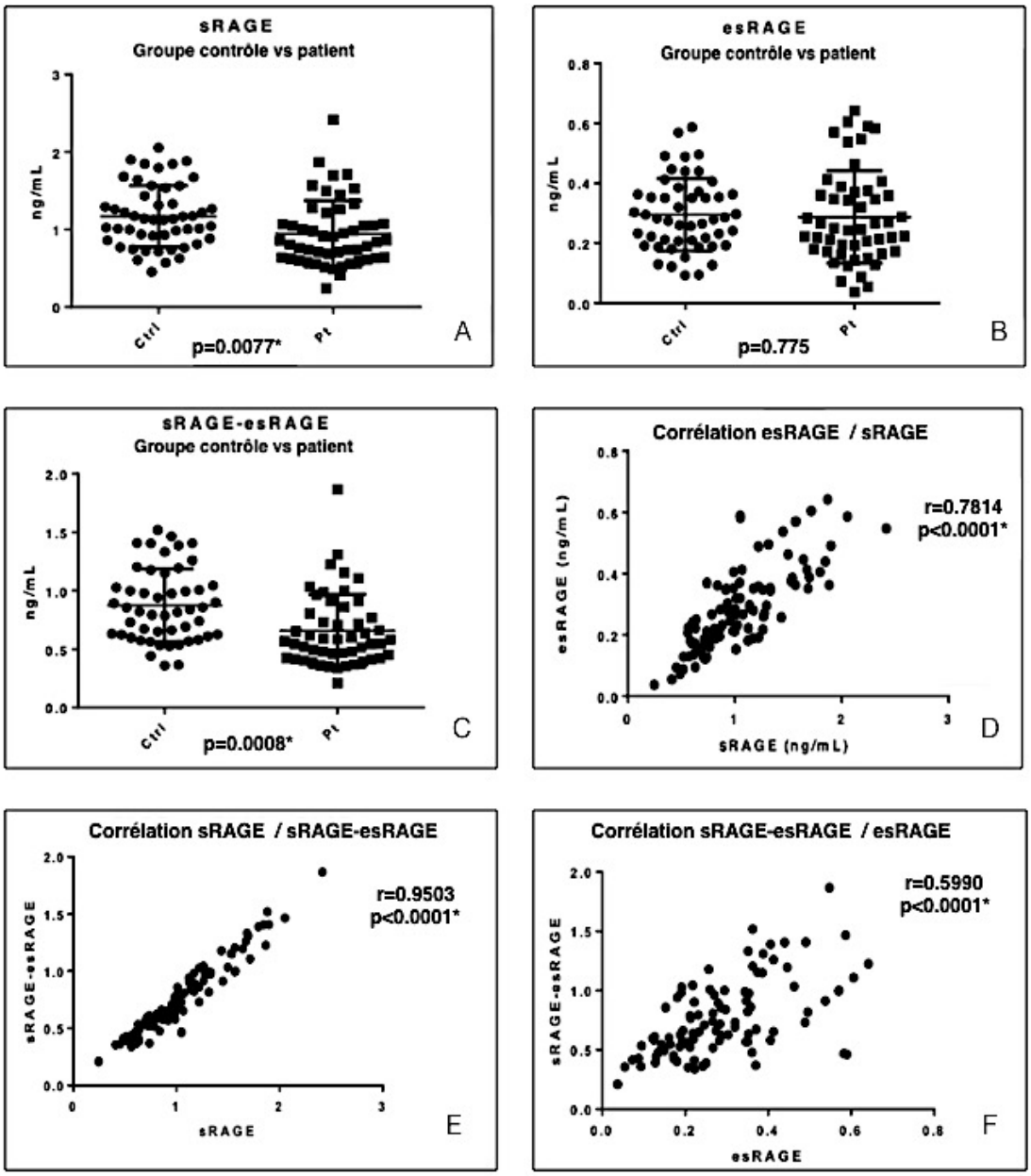

Figure 18 Concentrations et corrélations des formes de RAGE

A ; B ; C : Graphiques respectifs comparant la concentration moyenne des échantillons dans le groupe patient et contrôle pour sRAGE, esRAGE, sRAGE-esRAGE.

D ; E ; F : Graphiques présentant respectivement la corrélation entre la concentration sérique de esRAGE/sRAGE ; sRAGE/sRAGE-esRAGE et sRAGE-esRAGE/esRAGE

IV.3. Concentration de HMGB1

Nous n'observons pas de différence significative des concentrations sériques de HMGB1 entre les groupes parodontite chronique et contrôle (respectivement 20,78 ng/mL±3.90 vs 18.802ng/mL ±2.20; p= 0.374 (figure19).

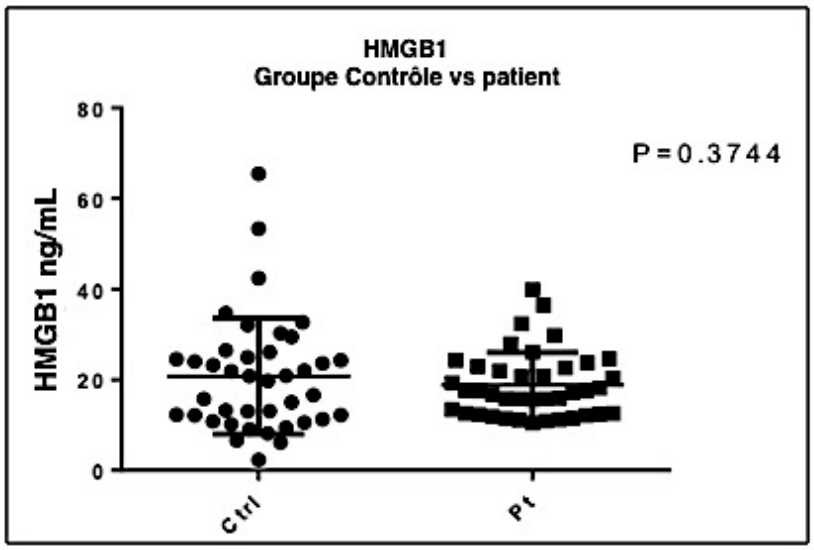

Figure 19 : Graphique comparant la concentration moyenne de HMGB1 dans le groupe patient et contrôle

IV.4. Corrélation des paramètres cliniques et parodontaux

IV.4.1. Corrélation entre les paramètres parodontaux et les RAGE solubles

L'analyse de corrélation de Pearson révèle que l'indice de masse corporel (IMC) est corrélé négativement à la concentration de RAGE soluble totale (sRAGE), esRAGE et cRAGE (figure 20). L'analyse ne révèle pas de corrélation avec l'âge. Tous les paramètres parodontaux (le pourcentage de plaque, la profondeur moyenne de poche, la perte moyenne d'attache et le pourcentage de saignement au sondage) sont corrélés négativement et de manière significative avec sRAGE et cRAGE contrairement à la concentration de esRAGE. Les résultats des analyses de corrélation sont résumés dans le tableau 10 (figure 21).

Corrélation	sRAGE	esRAGE	cRAGE (sRAGE-esRAGE)
Facteurs généraux			
IMC	r=-0.7814 p<0.0001 *	r=-0.4109 p<0.0001 *	r=-0.3869 p=0.0001 *
AGE (nombre d'années)	r=0.005 p=0.9606	r=0.4160 p=0.416	r=-0.0269 p=0.7904
Variables parodontales			
PP moyenne	r=-0.3014 p=0.0023 *	r=-0.1109 p=0.272	r=-0.3541 p=0.0003 *
PA moyenne	r=-0.263 p=0.0082 *	r=-0.0637 p=0.5289	r=-0.3219 p=0.0011 *
SS %	r=-0.3562 p=0.0003 *	r=-0.192 p=0.0556	r=-03894 p<0.0001 *
Plaque %	r=-0.3599 p=0.0002 *	r=-0.1902 p=0.058	r=-0.39 p<0.0001 *

Table 10 : Résultats des analyses de corrélation, avec r coefficient de corrélation et p-value significativité. * valeur statistiquement significative

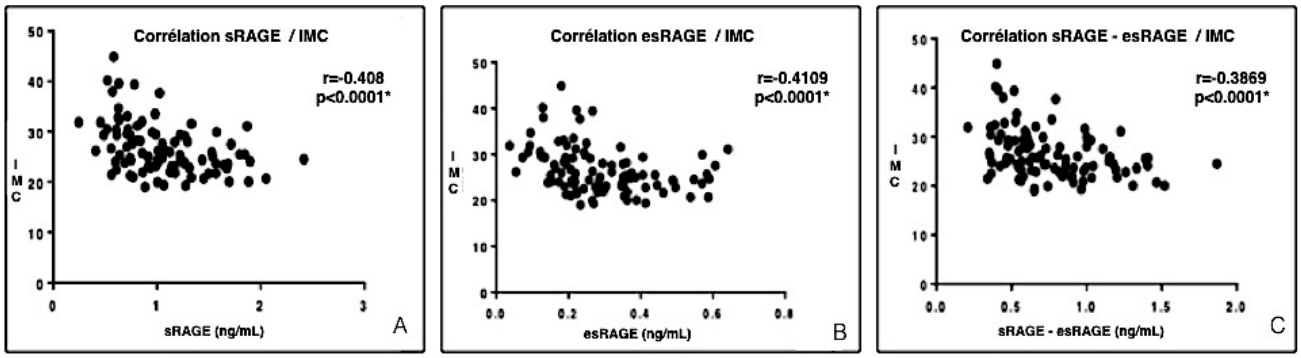

Figure 20 : A,B,C : Graphiques représentant respectivement la corrélation entre l'IMC et sRAGE , esRAGE, sRAGE-esRAGE

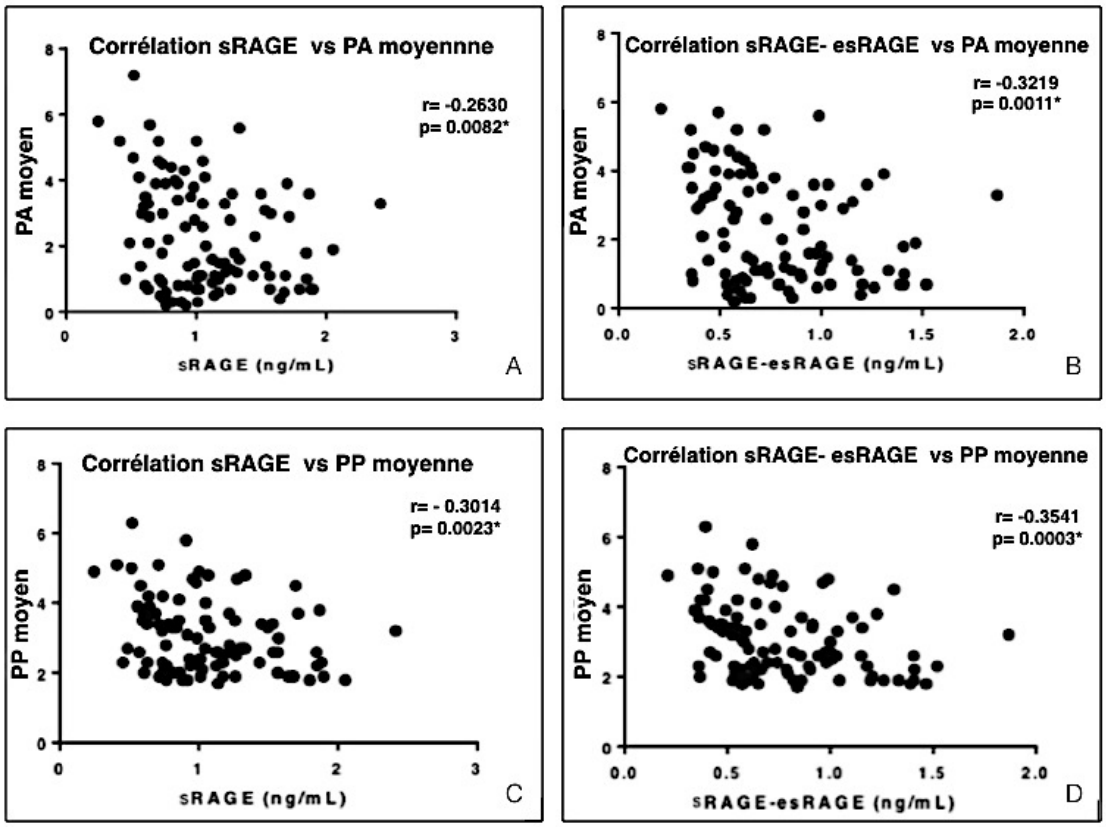

Figure 21 : Corrélation entre PA , PP et les formes solubles de RAGE

A, B : Corrélation entre la perte d'attache moyenne (mm) et sRAGE et , sRAGE-esRAGE respectivement

C, D : Corrélation entre la profondeur de poche moyenne (mm) et sRAGE et sRAGE-esRAGE respectivement

IV.4.2. Corrélation entre les paramètres parodontaux et HMGB1

Concernant les paramètres généraux, la concentration sérique de HMGB1 est positivement corrélée avec l'âge (r=0.3274 ; p=0.04) (figure 22). HMGB1 ne présente aucune corrélation avec sRAGE, esRAGE, et cRAGE.

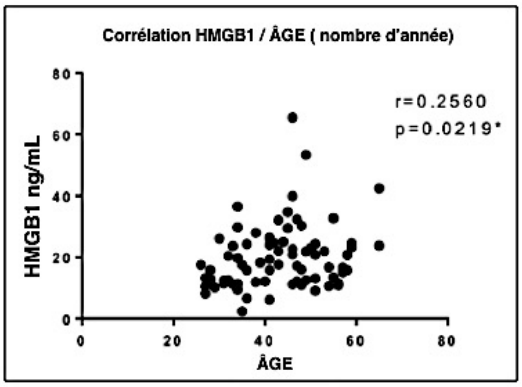

Figure 22 : Corrélation entre le taux sérique de HMGB1 et l'âge en nombre d'années.

IV.5. Expression relative des ARNm de RAGE et AGER1 dans les tissus gingivaux de patients parodontaux

Dans le sous-groupe de patients parodontaux, l'expression génique de l'ARNm de RAGE dans les tissus gingivaux provenant de sites atteints par la parodontite chronique est significativement augmentée de 4.53±7.11 fois par rapport aux sites non atteints (p=0.01). L'expression relative de l'ARN de AGER1 dans les tissus gingivaux provenant de sites atteints par la parodontite chronique est significativement augmentée de 2.26±3.54 par rapport aux sites non atteints. (figure 23)

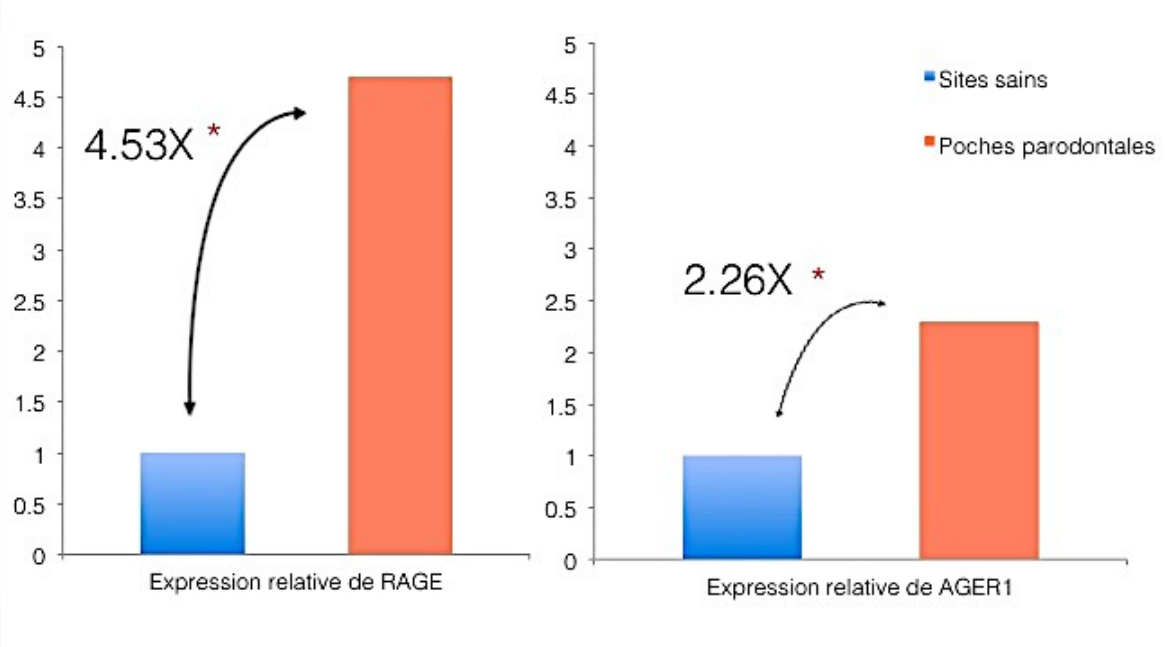

Figure 23 : Expression relative de RAGE et AGER1 dans des biopsies papillaires provenant de sites atteints ou non par la parodontite chronique.

IV.6. Evaluation qualitative de RAGE et AGER1 par immunomarquage

Les coupes de biopsies gingivales de sites atteints ont été analysées au microscope optique. Les coupes colorées à l'hématoxyline-éosine ont montré un infiltrat inflammatoire conséquent au niveau du tissu conjonctif (figure 24). RAGE et AGER1 ont été décelés par immunohistochimie. RAGE et AGER1 sont exprimés de manière concomitante au niveau de l'épithélium dont les cellules de la couche basale, de la couche épineuse, et de la couche granuleuse. Une diminution de leur marquage est à noter au niveau de la couche cornée de l'épithélium. Dans le tissu conjonctif RAGE et AGER1 sont localisés dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules de l'inflammation. (figures 25 et 26)

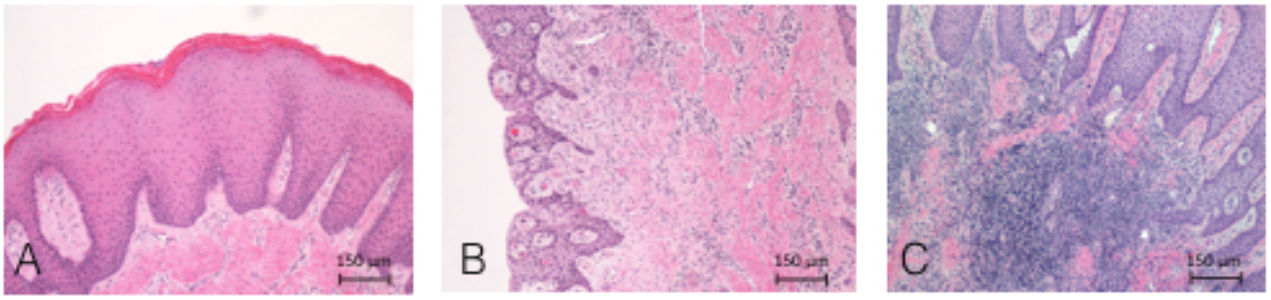

Figure 24: Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après coloration à l'hématoxylines-éosines et observées en lumière transmise. A : zénith papillaire B : épithélium de poche et tissu conjonctif sous jacent C : Infiltrat inflammatoire conséquent au niveau du tissu conjonctif.

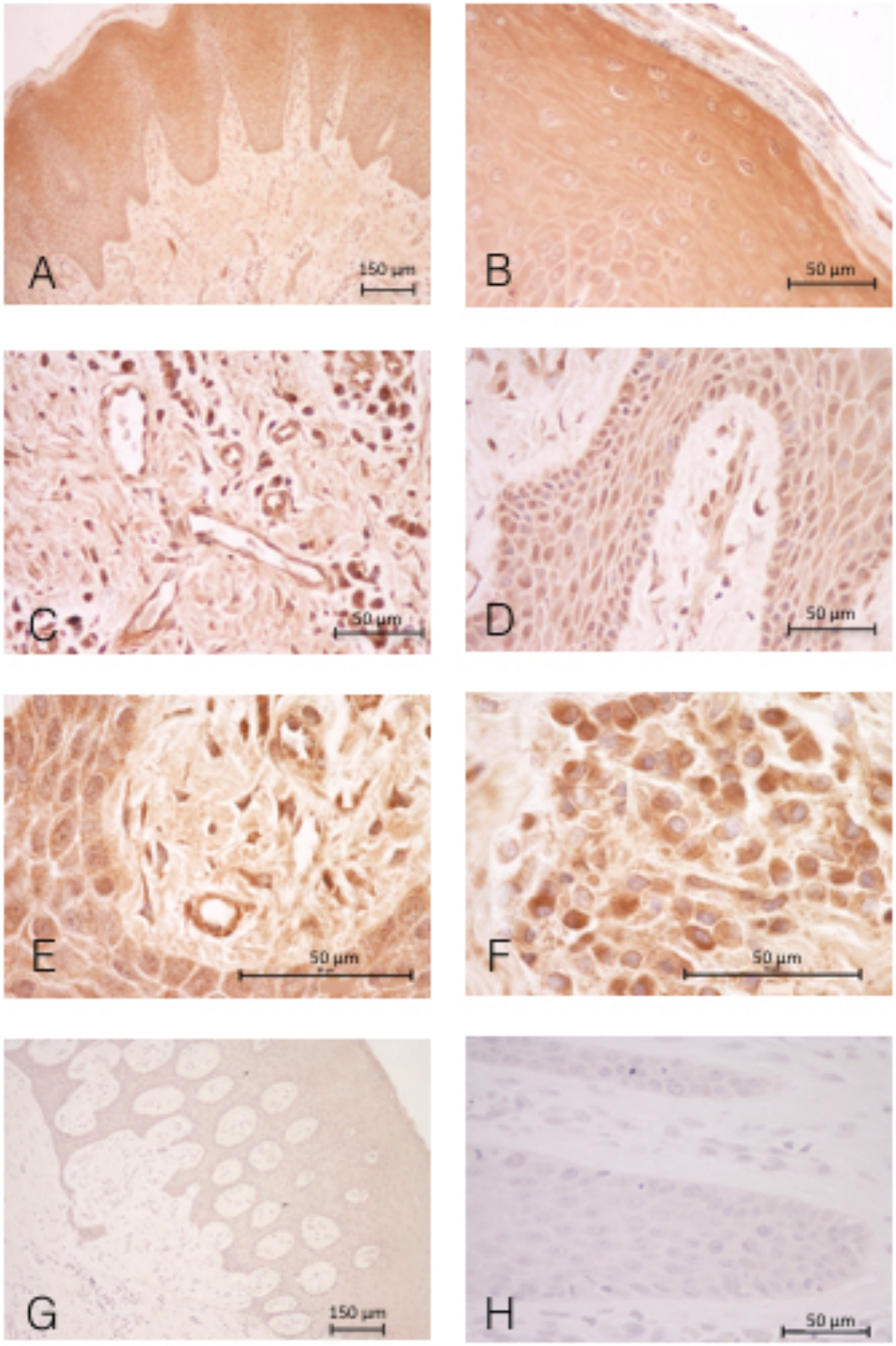

Figure 25 : Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après immunomarquage pour RAGE A : Zénith papillaire mettant en évidence l'immunomarquage de l'épithélium et du tissu conjonctif sous-jacent. B : épithélium gingival à fort grossissement. C : tissu conjonctif fibroblastes et endothélium marqué. D : E : limite entre l'épithélium et le tissu conjonctif. F : Immunomarquage des cellules de l'inflammation. G,et H : Contrôle négatif.

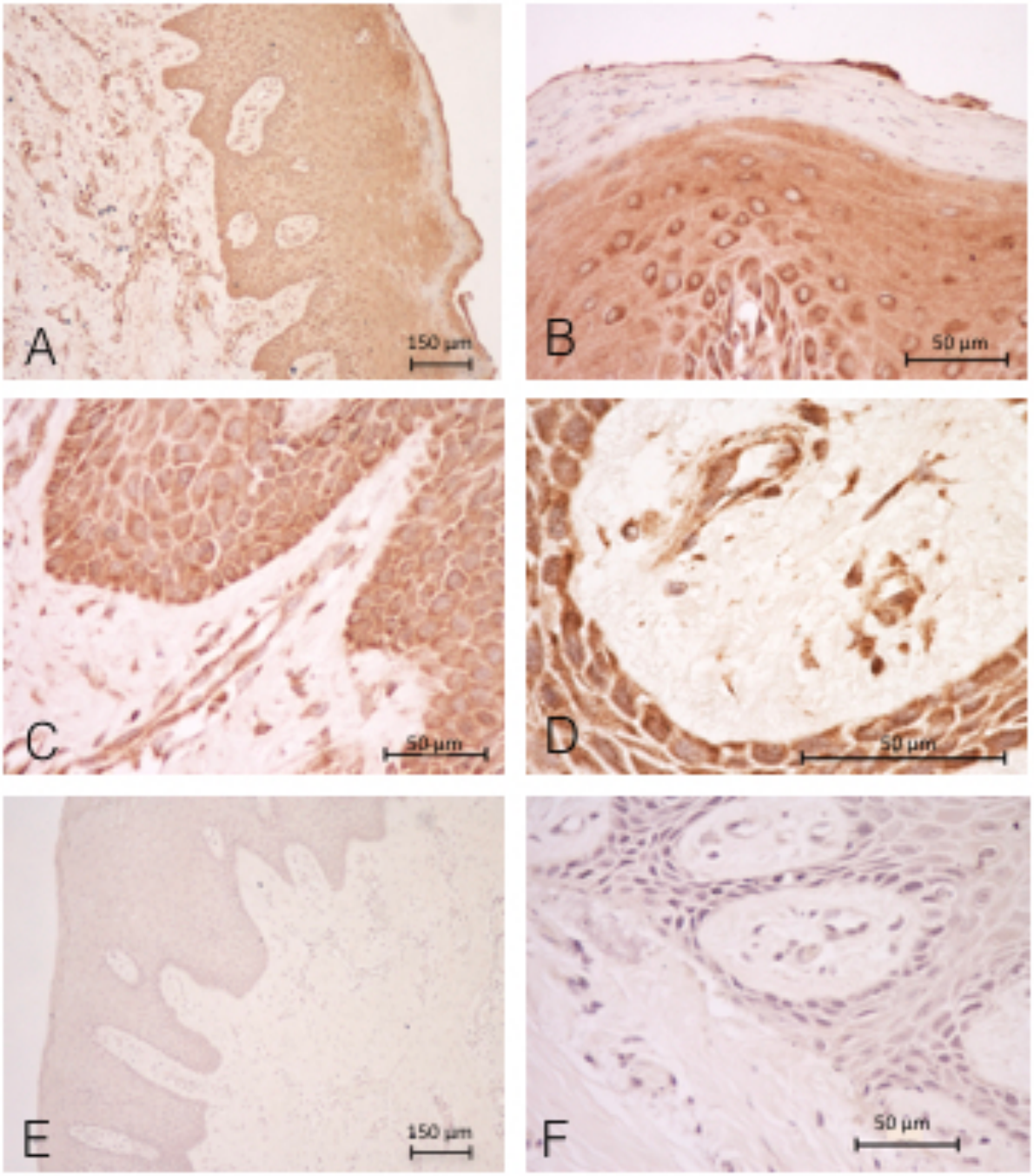

Figure 26 : Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après immunomarquage pour AGER1 A : épithélium gingival et tissu conjonctif marqué ; B : épithélium gingival ; C, et D: épitéliumgingival et tissu conjonctif. E,et F: Contrôle négatif.

V. DISCUSSION

V.1. Implication de sRAGE dans la parodontite chronique

V.1.1. Concentrations sériques

Les concentrations sériques de sRAGE et de cRAGE sont statistiquement inférieures dans la population atteinte de parodontite chronique par rapport à la population contrôle tandis que les concentrations sériques de esRAGE ne montrent pas de différence significative entre les deux groupes. Aucun test ELISA n'existe pour calculer directement la concentration de cRAGE dans les fluides biologiques (Hudson, Carter et al. 2008). L'étude montre que la concentration sérique de cRAGE est significativement inférieure dans le groupe parodontite chronique par rapport au groupe contrôle même après régression linéaire multiple. Au contraire, concernant sRAGE, cette différence n'est plus significative après régression linéaire multiple en raison d'un facteur confondant : l'indice de masse corporelle. En effet, dans notre étude, toutes les formes solubles sont associées à l'indice de masse corporelle. cRAGE présente une plus forte corrélation avec les paramètres parodontaux. **Dans la parodontite chronique, cRAGE semble être la forme soluble d'intérêt par rapport à sRAGE et esRAGE.**

Dans la littérature esRAGE compose 20% de sRAGE (Maillard-Lefebvre, Boulanger et al. 2009). Dans notre étude esRAGE compose 25.6% de sRAGE. La détermination de ces formes solubles a été réalisée grâce à deux kits ELISA provenant de deux fabricants indépendants. Une corrélation entre cRAGE et esRAGE est à noter.

sRAGE est une protéine anti-oxydante. Sa réduction au niveau sérique est observée dans notre étude et est également retrouvée dans d'autres pathologies inflammatoires, auto-immunes ou infectieuses (Yan, Ramasamy et al. 2010, Lee and Park 2013). Il existe une variation inter-individuelle de sRAGE. En effet sRAGE a été mesurée dans 3 populations : des centenaires sains, des patients ayant eu un infarctus aigu du myocarde (IAM) et des patients sains âgés de moins de 40 ans sans antécédent. Les centenaires sains ont une concentration sérique de sRAGE significativement

supérieure à celle des patients sains <40 ans, elle-même supérieure à celle des patients ayant eu un IAM (Maillard-Lefebvre, Boulanger et al. 2009). **Par sa caractéristique anti-inflammatoire et antagoniste de RAGE, la forme soluble de RAGE peut être considérée comme un marqueur de protection face à l'inflammation et au stress oxydant.**

cRAGE est un biomarqueur corrélé négativement avec les différents paramètres de la parodontite chronique. **cRAGE n'est ni spécifique ni pathognomonique de la parodontite chronique.** Néanmoins la parodontite chronique peut être un facteur confondant lors de l'évaluation des concentrations sériques de cRAGE dans d'autres pathologies.

V.1.2. Analyse salivaire

Les tests ELISA n'ont pas permis de quantifier les taux de sRAGE et esRAGE salivaires en comparaison avec la quantité détectée dans le sérum. La présence de sRAGE et esRAGE dans la salive n'est pas remise en cause. En effet, la salive a pour origine une ultrafiltration plasmatique par les glandes salivaires primaires et secondaires. Mais elle a aussi une origine sulculaire à travers la sécrétion du fluide gingival qui est, lui aussi, issu du sérum. En cas de parodontite chronique, une augmentation de la quantité de fluide gingival secrétée, due à la vasodilatation locale et à une extrusion accrue de protéines, se produit. L'absence de détection de sRAGE et esRAGE est due à une concentration inférieure au seuil de détection des kits ELISA. Enfin des protéases sont présentes dans la salive et peuvent cliver ces récepteurs solubles. Dans cette situation, l'utilisation d'inhibiteur de protéases est une solution à envisager lors de la collecte des échantillons. La salive est cependant un fluide biologique d'intérêt en raison de la facilité de son prélèvement pour l'évaluation des biomarqueurs.

V.2. Les ligands de RAGE

L'axe AGE/RAGE a été étudié notamment dans la physiopathologie entre le diabète et la parodontite chronique. Selon la nature du ligand, sa liaison avec RAGE entraîne

des réponses cellulaires différentes (Valencia, Mone et al. 2004). Dans la parodontite chronique non associée au diabète, AGE n'est pas le ligand d'intérêt. Nous avons donc étudié HMGB1. Dans notre étude, l'analyse de la concentration sérique de HMGB1 ne montre pas de différence significative entre les deux groupes. Pourtant, Xie *et al* ont montré une augmentation significative de HMGB1 dans le fluide gingival, la gencive de patients ayant une parodontite chronique ou une parodontite agressive généralisée et dans les cas de périmplantite par rapport au groupe contrôle (Xie, Deng et al. 2011). HMGB1 est exprimé au niveau extracellulaire lors de la nécrose tissulaire et en réponse à la stimulation bactérienne, événements présents caractéristiques de la physiopathologie de la parodontite chronique (Morimoto-Yamashita, Ito et al. 2012). Malheureusement cette différence locale ne se traduit pas au niveau systémique. D'autres ligands de RAGE sont à explorer notamment S100A12. La concentration de S100A12 est significativement augmentée dans le FG de patients présentant une parodontite chronique par rapport à des patients parodontalement sains (Pradeep, Martande et al. 2014). L'axe S100A12/RAGE active une cascade de signalisations amplifiant les réponses inflammatoires et augmente l'expression de RAGE (Schmidt, Yan et al. 2001)

V.3.RAGE et AGER-1 au niveau tissulaire

Les surexpressions du récepteur RAGE, mais aussi pour la première fois de son antagoniste AGER1, ont été observées. Ces deux protéines sont exprimées par les mêmes types cellulaires. Pour évaluer localement l'implication de RAGE et d'AGER1 dans la parodontite chronique, nous avons montré une augmentation significative des ARNm par qPCR, technique d'une grande sensibilité, de RAGE et AGER1 dans des biopsies gingivales de sites atteints par la parodontite chronique en comparaison à des sites non atteints provenant des mêmes patients. Cette observation est inhérente à l'atteinte parodontale et extrinsèque à la population étudiée.

Dans le diabète, l'action de RAGE est exacerbée probablement en raison de l'inhibition de l'expression d'AGER1 sous un stress oxydant important et de longue durée (Vlassara and Striker 2011). Dans le contexte parodontal, les AGER1 semblent, au contraire, surexprimés, inhibant en partie l'action de RAGE et diminuant ainsi le stress oxydant.

V.4. Limites

Les limites de notre étude sont sa nature transversale et la taille de l'échantillon relativement réduit. Nos capacités à détecter les formes solubles de RAGE, notamment dans la salive, sont imputables à la sensibilité des kits utilisés. Enfin nos résultats sont spécifiques à la population correspondant au nord de Manhattan à New York, Etats-Unis d'Amérique.

V.5. Validité externe des sRAGE et des parodontites

Au cours de l'élaboration de cette étude Wu *et al* ont évalué, dans une population taiwanaise, le polymorphisme de RAGE et la concentration sérique de sRAGE dans quatre groupes. Les 494 patients présentaient ou non un diabète de type 2 (T2DM) et/ou non une parodontite chronique (PC). Chez les patients non T2DM, le polymorphisme G82S de RAGE est significativement prépondérant dans le groupe parodontite chronique (Wu, Tsai et al. 2015). sRAGE ne montre pas de différence significative entre les différents groupes. Une augmentation de sRAGE est cependant associée au polymorphisme G82G. Le polymorphisme G82S de Rage représente 20% (Yoshioka, Yoshida et al. 2005, Wu, Tsai et al. 2015) des populations asiatiques. En comparaison, dans les populations européennes ou nord américaines, ce polymorphisme s'élève de 1,5 à 5 % selon les études (Hofmann, Drury et al. 2002, Wu, Tsai et al. 2015). Dans les populations caucasiennes le polymorphisme G82S n'est pas associé aux maladies parodontales (Holla, Kankova et al. 2001).

Sandeep et al évaluent dans le sérum et le FG la concentration de TNF-α et de sRAGE avec un échantillon faible de 70 patients, répartis en 4 groupes (+/-T2DM +/-PC). La différence de concentration dans le sérum et dans le FG de sRAGE est significative entre chaque groupe. La concentration de sRAGE est supérieure dans le groupe de patients PC sans T2DM et ce, de manière décroissante chez les patients présentant une PC sans T2DM, chez les patients T2DM sans PC et enfin chez les patients présentant une PC et un T2DM. Il est intéressant de noter la corrélation

négative entre la concentration sérique d'une part dans le FG de TNF-α cytokine pro-inflammatoire et d'autre part dans sRAGE protéine anti-oxydante.
Ces deux études n'ont en aucun cas évalué les différentes formes de sRAGE. La concentration de cRAGE et esRAGE n'est pas régulée de manière identique. Rappelons que la première est guidée par un clivage enzymatique tandis que esRAGE est soumise à l'épissage alternatif. Il est impératif de discerner ces deux formes solubles dans l'évaluation de leur rôle de biomarqueur.

V.6. Perspectives à moyen terme

Une évaluation quantitative des immunomarquages de RAGE et AGER1 de biopsies gingivales de sites atteints ou non par la parodontite chronique serait nécessaire pour corroborer les résultats obtenus par qPCR. Des études longitudinales et interventionnelles seraient nécessaires pour évaluer l'évolution de la concentration sérique des formes solubles de RAGE.

CONCLUSION

RAGE a été historiquement étudié dans la parodontite liée au diabète. L'activation de RAGE génère des signaux pro-inflammatoires par son interaction avec les molécules glyquées présentes dans le sérum et les tissus de patients diabétiques. Ce processus est décrit comme l'axe AGE/RAGE. Un faisceau de preuves tend à montrer l'implication de ce même récepteur dans la physiopathologie de la parodontite seule (non associée au diabète). Au niveau tissulaire, RAGE est surexprimé dans les sites atteints par la parodontite en concomitance de son antagoniste AGER1, limitant son action inflammatoire. Enfin la concentration sérique des formes solubles clivées de RAGE est diminuée chez les patients parodontaux et est corrélée négativement aux paramètres cliniques de la parodontite. La physiopathologie de la parodontite semble avoir un impact sur la concentration de ce biomarqueur anti-oxydant. La variation de la concentration sérique de sRAGE est associée à de nombreuses pathologies systémiques. Cette observation étoffe le lien entre la parodontite et les maladies systémiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abbass, M. M., N. S. Korany, A. H. Salama, J. J. Dmytryk and B. Safiejko-Mroczka (2012). "The relationship between receptor for advanced glycation end products expression and the severity of periodontal disease in the gingiva of diabetic and non diabetic periodontitis patients." Arch Oral Biol **57**(10): 1342-1354.

Amar, S., N. Gokce, S. Morgan, M. Loukideli, T. E. Van Dyke and J. A. Vita (2003). "Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1245-1249.

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

Beck, J. D. and S. Offenbacher (2005). "Systemic effects of periodontitis: epidemiology of periodontal disease and cardiovascular disease." J Periodontol **76**(11 Suppl): 2089-2100.

Bierhaus, A., P. M. Humpert, M. Morcos, T. Wendt, T. Chavakis, B. Arnold, D. M. Stern and P. P. Nawroth (2005). "Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products." J Mol Med (Berl) **83**(11): 876-886.

Borgnakke, W. S., P. V. Ylostalo, G. W. Taylor and R. J. Genco (2013). "Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence." J Clin Periodontol **40 Suppl 14**: S135-152.

Boschetto, P., I. Campo, M. Stendardo, E. Casimirri, C. Tinelli, M. Gorrini, C. Ceconi, A. Fucili, A. Potena, A. Papi, L. Ballerin, L. M. Fabbri and M. Luisetti (2013). "Plasma sRAGE and N-(carboxymethyl) lysine in patients with CHF and/or COPD." Eur J Clin Invest **43**(6): 562-569.

Bouchard, P. (2015). Parodontologie et Dentisterie Implantaire. Paris, Lavoisier Medecine.

Bouchard, P., M. C. Carra, A. Boillot, F. Mora and H. Range (2016). "Risk factors in periodontology: a conceptual framework." J Clin Periodontol.

Brett, J., A. M. Schmidt, S. D. Yan, Y. S. Zou, E. Weidman, D. Pinsky, R. Nowygrod, M. Neeper, C. Przysiecki, A. Shaw and et al. (1993). "Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues." Am J Pathol **143**(6): 1699-1712.

Burt, B. (2005). "Position paper: epidemiology of periodontal diseases." J Periodontol **76**(8): 1406-1419.

Catalano, M., A. Cortelazzo, R. Santi, L. Contino, M. Demicheli, Y. Yilmaz, M. Zorzetto, I. Campo, N.

Lanati and E. Emanuele (2008). "The Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene is associated with plasma levels of soluble RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts) and the presence of peripheral arterial disease." Clin Biochem **41**(12): 981-985.

Challier, M., S. Jacqueminet, O. Benabdesselam, A. Grimaldi and J. L. Beaudeux (2005). "Increased serum concentrations of soluble receptor for advanced glycation endproducts in patients with type 1 diabetes." Clin Chem **51**(9): 1749-1750.

Chang, P. C., L. Y. Chien, L. Y. Chong, Y. P. Kuo and J. K. Hsiao (2013). "Glycated matrix up-regulates inflammatory signaling similarly to Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide." J Periodontal Res **48**(2): 184-193.

Chavakis, T., A. Bierhaus, N. Al-Fakhri, D. Schneider, S. Witte, T. Linn, M. Nagashima, J. Morser, B. Arnold, K. T. Preissner and P. P. Nawroth (2003). "The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment." J Exp Med **198**(10): 1507-1515.

Chen, Y., S. S. Yan, J. Colgan, H. P. Zhang, J. Luban, A. M. Schmidt, D. Stern and K. C. Herold (2004). "Blockade of late stages of autoimmune diabetes by inhibition of the receptor for advanced glycation end products." J Immunol **173**(2): 1399-1405.

Chiu, B. (1999). "Multiple infections in carotid atherosclerotic plaques." Am Heart J **138**(5 Pt 2): S534-536.

Chuah, Y. K., R. Basir, H. Talib, T. H. Tie and N. Nordin (2013). "Receptor for advanced glycation end products and its involvement in inflammatory diseases." Int J Inflam **2013**: 403460.

Cohen, M. M., Jr. (2013). "Perspectives on RAGE signaling and its role in cardiovascular disease." Am J Med Genet A **161a**(11): 2750-2755.

Correa, F. O., D. Goncalves, C. M. Figueredo, A. S. Bastos, A. Gustafsson and S. R. Orrico (2010). "Effect of periodontal treatment on metabolic control, systemic inflammation and cytokines in patients with type 2 diabetes." J Clin Periodontol **37**(1): 53-58.

Costa, F. O., L. O. Miranda Cota, E. J. Pereira Lages, A. M. Soares Dutra Oliveira, P. A. Dutra Oliveira, R. M. Cyrino, T. C. Medeiros Lorentz, S. C. Cortelli and J. R. Cortelli (2013). "Progression of periodontitis and tooth loss associated with glycemic control in individuals undergoing periodontal maintenance therapy: a 5-year follow-up study." J Periodontol **84**(5): 595-605.

D'Aiuto, F., D. Ready and M. S. Tonetti (2004). "Periodontal disease and C-reactive protein-associated cardiovascular risk." J Periodontal Res **39**(4): 236-241.

Daffu, G., C. H. del Pozo, K. M. O'Shea, R. Ananthakrishnan, R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2013). "Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond." Int J Mol Sci **14**(10): 19891-19910.

Dalal, M., R. D. Semba, K. Sun, C. Crasto, R. Varadhan, S. Bandinelli, J. C. Fink, J. M. Guralnik and L. Ferrucci (2011). "Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products and chronic kidney disease in the elderly population." Am J Nephrol **33**(4): 313-318.

Daly, C. G., D. H. Mitchell, J. E. Highfield, D. E. Grossberg and D. Stewart (2001). "Bacteremia due to periodontal probing: a clinical and microbiological investigation." J Periodontol **72**(2): 210-214.

Davenport, R. H., Jr., D. M. Simpson and T. M. Hassell (1982). "Histometric comparison of active and inactive lesions of advanced periodontitis." J Periodontol **53**(5): 285-295.

DeStefano, F., R. F. Anda, H. S. Kahn, D. F. Williamson and C. M. Russell (1993). "Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality." Bmj **306**(6879): 688-691.

Detzen, L., S. C. Y. Chen, B. Cheng, P. N. Papapanou and E. Lalla (2017). "Increased levels of soluble CD163 in periodontitis patients." J Clin Periodontol **44**(6): 585-590.

Donato, R., B. R. Cannon, G. Sorci, F. Riuzzi, K. Hsu, D. J. Weber and C. L. Geczy (2013). "Functions of S100 proteins." Curr Mol Med **13**(1): 24-57.

Ebe, N., M. Hara-Yokoyama, K. Iwasaki, S. Iseki, S. Okuhara, K. A. Podyma-Inoue, K. Terasawa, A. Watanabe, T. Akizuki, H. Watanabe, M. Yanagishita and Y. Izumi (2011). "Pocket epithelium in the pathological setting for HMGB1 release." J Dent Res **90**(2): 235-240.

Eke, P. I., B. A. Dye, L. Wei, G. O. Thornton-Evans and R. J. Genco (2012). "Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010." J Dent Res **91**(10): 914-920.

Eke, P. I., R. C. Page, L. Wei, G. Thornton-Evans and R. J. Genco (2012). "Update of the case definitions for population-based surveillance of periodontitis." J Periodontol **83**(12): 1449-1454.
Emanuele, E., A. D'Angelo, C. Tomaino, G. Binetti, R. Ghidoni, P. Politi, L. Bernardi, R. Maletta, A. C. Bruni and D. Geroldi (2005). "Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia." Arch Neurol **62**(11): 1734-1736.

Engebretson, S., R. Chertog, A. Nichols, J. Hey-Hadavi, R. Celenti and J. Grbic (2007). "Plasma levels of tumour necrosis factor-alpha in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes." J Clin Periodontol **34**(1): 18-24.

Falcone, C., E. Emanuele, A. D'Angelo, M. P. Buzzi, C. Belvito, M. Cuccia and D. Geroldi (2005). "Plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end products and coronary artery disease in nondiabetic men." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(5): 1032-1037.

Feghali, K., K. Iwasaki, K. Tanaka, M. Komaki, M. Machigashira, I. Ishikawa and Y. Izumi (2009). "Human gingival fibroblasts release high-mobility group box-1 protein through active and passive pathways." Oral Microbiol Immunol **24**(4): 292-298.

Fredriksson, M. I., C. M. Figueredo, A. Gustafsson, K. G. Bergstrom and B. E. Asman (1999). "Effect of periodontitis and smoking on blood leukocytes and acute-phase proteins." J Periodontol **70**(11): 1355-1360.

Fuster, V. and R. Vedanthan (2008). "Cardiovascular disease and the UN Millennium Development Goals: time to move forward." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **5**(10): 593.

Genco, R. J. and W. S. Borgnakke (2013). "Risk factors for periodontal disease." Periodontol 2000 **62**(1): 59-94.

Geroldi, D., C. Falcone, E. Emanuele, A. D'Angelo, M. Calcagnino, M. P. Buzzi, G. A. Scioli and R. Fogari (2005). "Decreased plasma levels of soluble receptor for advanced glycation end-products in patients with essential hypertension." J Hypertens **23**(9): 1725-1729.

Giannobile, W. V. (2012). "Salivary diagnostics for periodontal diseases." J Am Dent Assoc **143**(10 Suppl): 6s-11s.

Gonzalez, I., J. Romero, B. L. Rodriguez, R. Perez-Castro and A. Rojas (2013). "The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges." Immunobiology **218**(5): 790-797.

Goova, M. T., J. Li, T. Kislinger, W. Qu, Y. Lu, L. G. Bucciarelli, S. Nowygrod, B. M. Wolf, X. Caliste, S. F. Yan, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2001). "Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice." Am J Pathol **159**(2): 513-525.

Grossin, N., M. P. Wautier, T. Meas, P. J. Guillausseau, P. Massin and J. L. Wautier (2008). "Severity of diabetic microvascular complications is associated with a low soluble RAGE level." Diabetes Metab **34**(4 Pt 1): 392-395.

Group, B. D. W. (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." Clin Pharmacol Ther **69**(3): 89-95.

Hajishengallis, G. (2015). "Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation." Nat Rev Immunol **15**(1): 30-44.

Haraszthy, V. I., J. J. Zambon, M. Trevisan, M. Zeid and R. J. Genco (2000). "Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques." J Periodontol **71**(10): 1554-1560.

Hofmann, M. A., S. Drury, C. Fu, W. Qu, A. Taguchi, Y. Lu, C. Avila, N. Kambham, A. Bierhaus, P. Nawroth, M. F. Neurath, T. Slattery, D. Beach, J. McClary, M. Nagashima, J. Morser, D. Stern and A. M. Schmidt (1999). "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." Cell **97**(7): 889-901.

Hofmann, M. A., S. Drury, B. I. Hudson, M. R. Gleason, W. Qu, Y. Lu, E. Lalla, S. Chitnis, J. Monteiro, M. H. Stickland, L. G. Bucciarelli, B. Moser, G. Moxley, S. Itescu, P. J. Grant, P. K. Gregersen, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2002). "RAGE and arthritis: the G82S polymorphism amplifies the inflammatory response." Genes Immun **3**(3): 123-135.

Holla, L. I., K. Kankova, A. Fassmann, D. Buckova, T. Halabala, V. Znojil and J. Vanek (2001). "Distribution of the receptor for advanced glycation end products gene polymorphisms in patients with chronic periodontitis: a preliminary study." J Periodontol **72**(12): 1742-1746.

Huang, J. S., J. Y. Guh, H. C. Chen, W. C. Hung, Y. H. Lai and L. Y. Chuang (2001). "Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells." J Cell Biochem **81**(1): 102-113.

Hudson, B. I., A. M. Carter, E. Harja, A. Z. Kalea, M. Arriero, H. Yang, P. J. Grant and A. M. Schmidt (2008). "Identification, classification, and expression of RAGE gene splice variants." FASEB J **22**(5): 1572-1580.

Hujoel, P. P., M. Drangsholt, C. Spiekerman and N. S. Weiss (2003). "An exploration of the periodontitis-cancer association." Ann Epidemiol **13**(5): 312-316.

Hujoel, P. P., B. A. White, R. I. Garcia and M. A. Listgarten (2001). "The dentogingival epithelial surface area revisited." J Periodontal Res **36**(1): 48-55.

Humpert, P. M., Z. Djuric, S. Kopf, G. Rudofsky, M. Morcos, P. P. Nawroth and A. Bierhaus (2007). "Soluble RAGE but not endogenous secretory RAGE is associated with albuminuria in patients with type 2 diabetes." Cardiovasc Diabetol **6**: 9.

Ide, M. and P. N. Papapanou (2013). "Epidemiology of association between maternal periodontal disease and adverse pregnancy outcomes--systematic review." J Periodontol **84**(4 Suppl): S181-194.

Iwamoto, Y., F. Nishimura, M. Nakagawa, H. Sugimoto, K. Shikata, H. Makino, T. Fukuda, T. Tsuji, M. Iwamoto and Y. Murayama (2001). "The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes." J Periodontol **72**(6): 774-778.

Jain, A., E. L. Batista, Jr., C. Serhan, G. L. Stahl and T. E. Van Dyke (2003). "Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model." Infect Immun **71**(10): 6012-6018.

Jimenez, M., F. B. Hu, M. Marino, Y. Li and K. J. Joshipura (2012). "Type 2 diabetes mellitus and 20 year incidence of periodontitis and tooth loss." Diabetes Res Clin Pract **98**(3): 494-500.

Kalinina, N., A. Agrotis, Y. Antropova, G. DiVitto, P. Kanellakis, G. Kostolias, O. Ilyinskaya, E. Tararak and A. Bobik (2004). "Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: role of activated macrophages and cytokines." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(12): 2320-2325.

Kalousova, M., M. Hodkova, M. Kazderova, J. Fialova, V. Tesar, S. Dusilova-Sulkova and T. Zima (2006). "Soluble receptor for advanced glycation end products in patients with decreased renal function." Am J Kidney Dis **47**(3): 406-411.

Katakami, N., M. Matsuhisa, H. Kaneto, T. A. Matsuoka, K. Sakamoto, Y. Nakatani, K. Ohtoshi, R. Hayaishi-Okano, K. Kosugi, M. Hori and Y. Yamasaki (2005). "Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications." Diabetes Care **28**(11): 2716-2721.

Kebschull, M., R. T. Demmer and P. N. Papapanou (2010). ""Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis." J Dent Res **89**(9): 879-902.

Koyama, H., T. Shoji, H. Yokoyama, K. Motoyama, K. Mori, S. Fukumoto, M. Emoto, T. Shoji, H. Tamei, H. Matsuki, S. Sakurai, Y. Yamamoto, H. Yonekura, T. Watanabe, H. Yamamoto and Y. Nishizawa (2005). "Plasma level of endogenous secretory RAGE is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(12): 2587-2593.

Kozarov, E. V., B. R. Dorn, C. E. Shelburne, W. A. Dunn, Jr. and A. Progulske-Fox (2005). "Human atherosclerotic plaque contains viable invasive Actinobacillus actinomycetemcomitans and Porphyromonas gingivalis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): e17-18.

Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjoback, B. Sjogreen, L. Strombom, A. Stahlberg and N. Zoric (2006). "The real-time polymerase chain reaction." Mol Aspects Med **27**(2-3): 95-125.

Lalla, E., C. Kunzel, S. Burkett, B. Cheng and I. B. Lamster (2011). "Identification of unrecognized diabetes and pre-diabetes in a dental setting." J Dent Res **90**(7): 855-860.

Lalla, E., I. B. Lamster, M. Feit, L. Huang, A. Spessot, W. Qu, T. Kislinger, Y. Lu, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2000). "Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice." J Clin Invest **105**(8): 1117-1124.

Lalla, E. and P. N. Papapanou (2011). "Diabetes mellitus and periodontitis: a tale of two common interrelated diseases." Nat Rev Endocrinol **7**(12): 738-748.

Lang, N., P. M. Bartold, M. Cullinan, M. Jeffcoat, A. Mombelli, S. Murakami, R. Page, P. Papapanou, M. Tonetti and T. V. Dyke (1999). "Consensus Report: Aggressive Periodontitis." Annals of Periodontology **4**(1): 53-53.

Lappin, D. F., B. Eapen, D. Robertson, J. Young and P. J. Hodge (2009). "Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus." J Clin Periodontol **36**(8): 634-641.

Lee, E. J. and J. H. Park (2013). "Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE), Its Ligands, and Soluble RAGE: Potential Biomarkers for Diagnosis and Therapeutic Targets for Human Renal Diseases." Genomics Inform **11**(4): 224-229.

Lee, Y. L., H. Y. Hu, N. Huang, D. K. Hwang, P. Chou and D. Chu (2013). "Dental prophylaxis and periodontal treatment are protective factors to ischemic stroke." Stroke **44**(4): 1026-1030.

Li, J. and A. M. Schmidt (1997). "Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products." J Biol Chem **272**(26): 16498-16506.

Liew, A. K., N. Punnanithinont, Y. C. Lee and J. Yang (2013). "Effect of non-surgical periodontal treatment on HbA1c: a meta-analysis of randomized controlled trials." Aust Dent J **58**(3): 350-357.

Liliensiek, B., M. A. Weigand, A. Bierhaus, W. Nicklas, M. Kasper, S. Hofer, J. Plachky, H. J. Grone, F. C. Kurschus, A. M. Schmidt, S. D. Yan, E. Martin, E. Schleicher, D. M. Stern, G. G. Hammerling, P. P. Nawroth and B. Arnold (2004). "Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response." J Clin Invest **113**(11): 1641-1650.

Loe, H. (1993). "Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus." Diabetes Care **16**(1): 329-334.

Loos, B. G. (2005). "Systemic markers of inflammation in periodontitis." J Periodontol **76**(11 Suppl): 2106-2115.

Lu, J., R. Kobayashi and S. J. Brill (1996). "Characterization of a high mobility group 1/2 homolog in yeast." J Biol Chem **271**(52): 33678-33685.

Luo, L., P. Xie, P. Gong, X. H. Tang, Y. Ding and L. X. Deng (2011). "Expression of HMGB1 and HMGN2 in gingival tissues, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis." Arch Oral Biol **56**(10): 1106-1111.

Ma, W., V. Rai, B. I. Hudson, F. Song, A. M. Schmidt and G. R. Barile (2012). "RAGE binds C1q and enhances C1q-mediated phagocytosis." Cell Immunol **274**(1-2): 72-82.

Maillard-Lefebvre, H., E. Boulanger, M. Daroux, C. Gaxatte, B. I. Hudson and M. Lambert (2009). "Soluble receptor for advanced glycation end products: a new biomarker in diagnosis and prognosis of chronic inflammatory diseases." Rheumatology (Oxford) **48**(10): 1190-1196.

Maity, B., D. Sheff and R. A. Fisher (2013). "Immunostaining: detection of signaling protein location in tissues, cells and subcellular compartments." Methods Cell Biol **113**: 81-105.

Manouchehr-Pour, M., P. J. Spagnuolo, H. M. Rodman and N. F. Bissada (1981). "Impaired neutrophil chemotaxis in diabetic patients with severe periodontitis." J Dent Res **60**(3): 729-730.

Mattout, C., D. Bourgeois and P. Bouchard (2006). "Type 2 diabetes and periodontal indicators: epidemiology in France 2002-2003." J Periodontal Res **41**(4): 253-258.

Meurman, J. H., M. Sanz and S. J. Janket (2004). "Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease." Crit Rev Oral Biol Med **15**(6): 403-413.

Morimoto, Y., K. I. Kawahara, S. Tancharoen, K. Kikuchi, T. Matsuyama, T. Hashiguchi, Y. Izumi and I. Maruyama (2008). "Tumor necrosis factor-alpha stimulates gingival epithelial cells to release high mobility-group box 1." J Periodontal Res **43**(1): 76-83.

Morimoto-Yamashita, Y., T. Ito, K. Kawahara, K. Kikuchi, S. Tatsuyama-Nagayama, Y. Kawakami-Morizono, M. Fijisawa, K. Miyashita, M. Emoto, M. Torii and M. Tokuda (2012). "Periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: is the HMGB1-RAGE axis the missing link?" Med Hypotheses **79**(4): 452-455.

Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.

Neeper, M., A. M. Schmidt, J. Brett, S. D. Yan, F. Wang, Y. C. Pan, K. Elliston, D. Stern and A. Shaw (1992). "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins." J Biol Chem **267**(21): 14998-15004.

Norata, G. D., K. Garlaschelli, L. Grigore, G. Tibolla, S. Raselli, L. Redaelli, G. Buccianti and A. L. Catapano (2009). "Circulating soluble receptor for advanced glycation end products is inversely associated with body mass index and waist/hip ratio in the general population." Nutr Metab Cardiovasc Dis **19**(2): 129-134.

Page, R. C. (1992). "Host response tests for diagnosing periodontal diseases." J Periodontol **63**(4 Suppl): 356-366.

Page, R. C. and K. S. Kornman (1997). "The pathogenesis of human periodontitis: an introduction." Periodontol 2000 **14**: 9-11.

Pontes Andersen, C. C., A. Flyvbjerg, K. Buschard and P. Holmstrup (2007). "Periodontitis is associated with aggravation of prediabetes in Zucker fatty rats." J Periodontol **78**(3): 559-565.

Pradeep, A. R., S. S. Martande, S. P. Singh, D. K. Suke, A. P. Raju and S. B. Naik (2014). "Correlation of human S100A12 (EN-RAGE) and high-sensitivity C-reactive protein as gingival crevicular fluid and serum markers of inflammation in chronic periodontitis and type 2 diabetes." Inflamm Res **63**(4): 317-323.

Prasad, C., V. Imrhan, F. Marotta, S. Juma and P. Vijayagopal (2014). "Lifestyle and Advanced Glycation End Products (AGEs) Burden: Its Relevance to Healthy Aging." Aging Dis **5**(3): 212-217.

Pullerits, R., M. Bokarewa, L. Dahlberg and A. Tarkowski (2005). "Decreased levels of soluble receptor for advanced glycation end products in patients with rheumatoid arthritis indicating deficient inflammatory control." Arthritis Res Ther **7**(4): R817-824.

Rai, V., F. Toure, S. Chitayat, R. Pei, F. Song, Q. Li, J. Zhang, R. Rosario, R. Ramasamy, W. J. Chazin and A. M. Schmidt (2012). "Lysophosphatidic acid targets vascular and oncogenic pathways via RAGE signaling." J Exp Med **209**(13): 2339-2350.

Ramamurthy, N. S. and L. M. Golub (1983). "Diabetes increases collagenase activity in extracts of rat gingiva and skin." J Periodontal Res **18**(1): 23-30.

Ramasamy, R., S. J. Vannucci, S. S. Yan, K. Herold, S. F. Yan and A. M. Schmidt (2005). "Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation." Glycobiology **15**(7): 16R-28R.

Ramasamy, R., S. F. Yan and A. M. Schmidt (2012). "The diverse ligand repertoire of the receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes." Vascul Pharmacol **57**(5-6): 160-167.

Ribeiro, J., A. Leao and A. B. Novaes (2005). "Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis." J Clin Periodontol **32**(4): 412-416.

Saito, T., Y. Shimazaki, Y. Kiyohara, I. Kato, M. Kubo, M. Iida and T. Koga (2004). "The severity of periodontal disease is associated with the development of glucose intolerance in non-diabetics: the Hisayama study." J Dent Res **83**(6): 485-490.

Sakaguchi, T., S. F. Yan, S. D. Yan, D. Belov, L. L. Rong, M. Sousa, M. Andrassy, S. P. Marso, S. Duda, B. Arnold, B. Liliensiek, P. P. Nawroth, D. M. Stern, A. M. Schmidt and Y. Naka (2003). "Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis." J Clin Invest **111**(7): 959-972.

Santilli, F., L. Bucciarelli, D. Noto, A. B. Cefalu, V. Davi, E. Ferrante, C. Pettinella, M. R. Averna, G. Ciabattoni and G. Davi (2007). "Decreased plasma soluble RAGE in patients with hypercholesterolemia: effects of statins." Free Radic Biol Med **43**(9): 1255-1262.

Santos, C. F., V. T. Sakai, M. A. Machado, D. N. Schippers and A. S. Greene (2004). "Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry." J Appl Oral Sci **12**(1): 1-11.

Santos, V. R., J. A. Lima, T. E. Goncalves, M. F. Bastos, L. C. Figueiredo, J. A. Shibli and P. M. Duarte (2010). "Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in sites of chronic periodontitis of subjects with poorly and well-controlled type 2 diabetes." J Periodontol **81**(10): 1455-1465.

Sasaki, N., M. Takeuchi, H. Chowei, S. Kikuchi, Y. Hayashi, N. Nakano, H. Ikeda, S. Yamagishi, T. Kitamoto, T. Saito and Z. Makita (2002). "Advanced glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques." Neurosci Lett **326**(2): 117-120.

Sasaki, T., N. S. Ramamurthy, Z. Yu and L. M. Golub (1992). "Tetracycline administration increases protein (presumably procollagen) synthesis and secretion in periodontal ligament fibroblasts of streptozotocin-induced diabetic rats." J Periodontal Res **27**(6): 631-639.

Scannapieco, F. A. (1999). "Role of oral bacteria in respiratory infection." J Periodontol **70**(7): 793-802.

Schefe, J. H., K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger and H. Funke-Kaiser (2006). "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula." J Mol Med (Berl) **84**(11): 901-910.

Schlueter, C., S. Hauke, A. M. Flohr, P. Rogalla and J. Bullerdiek (2003). "Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms--a result of regulated alternative splicing?" Biochim Biophys Acta **1630**(1): 1-6.

Schmidt, A. M., M. Vianna, M. Gerlach, J. Brett, J. Ryan, J. Kao, C. Esposito, H. Hegarty, W. Hurley, M. Clauss and et al. (1992). "Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface." J Biol Chem **267**(21): 14987-14997.

Schmidt, A. M., S. D. Yan, S. F. Yan and D. M. Stern (2001). "The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses." J Clin Invest **108**(7): 949-955.

Shah, K. and P. Maghsoudlou (2016). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics." Br J Hosp Med (Lond) **77**(7): C98-101.

Shoelson, S. E., J. Lee and A. B. Goldfine (2006). "Inflammation and insulin resistance." J Clin Invest **116**(7): 1793-1801.

Simpson, T. C., I. Needleman, S. H. Wild, D. R. Moles and E. J. Mills (2010). "Treatment of periodontal disease for glycaemic control in people with diabetes." Cochrane Database Syst Rev(5): Cd004714.

Steel, D. M. and A. S. Whitehead (1994). "The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein." Immunol Today **15**(2): 81-88.

Sugaya, K., T. Fukagawa, K. Matsumoto, K. Mita, E. Takahashi, A. Ando, H. Inoko and T. Ikemura (1994). "Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3." Genomics **23**(2): 408-419.

Sun, W. L., L. L. Chen, S. Z. Zhang, Y. Z. Ren and G. M. Qin (2010). "Changes of adiponectin and inflammatory cytokines after periodontal intervention in type 2 diabetes patients with periodontitis." Arch Oral Biol **55**(12): 970-974.

Taguchi, A., D. C. Blood, G. del Toro, A. Canet, D. C. Lee, W. Qu, N. Tanji, Y. Lu, E. Lalla, C. Fu, M. A. Hofmann, T. Kislinger, M. Ingram, A. Lu, H. Tanaka, O. Hori, S. Ogawa, D. M. Stern and A. M. Schmidt (2000). "Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases." Nature **405**(6784): 354-360.

Taniguchi, N., K. Kawahara, K. Yone, T. Hashiguchi, M. Yamakuchi, M. Goto, K. Inoue, S. Yamada, K. Ijiri, S. Matsunaga, T. Nakajima, S. Komiya and I. Maruyama (2003). "High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine." Arthritis Rheum **48**(4): 971-981.

Taylor, G. W., B. A. Burt, M. P. Becker, R. J. Genco, M. Shlossman, W. C. Knowler and D. J. Pettitt (1996). "Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." J Periodontol **67**(10 Suppl): 1085-1093.

Taylor, G. W., B. A. Burt, M. P. Becker, R. J. Genco, M. Shlossman, W. C. Knowler and D. J. Pettitt (1998). "Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years." J Periodontol **69**(1): 76-83.

Thoden van Velzen, S. K., L. Abraham-Inpijn and W. R. Moorer (1984). "Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept." J Clin Periodontol **11**(4): 209-220.

Valencia, J. V., M. Mone, J. Zhang, M. Weetall, F. P. Buxton and T. E. Hughes (2004). "Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA." Diabetes **53**(3): 743-751.

Vlassara, H. and G. E. Striker (2011). "AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift." Nat Rev Endocrinol **7**(9): 526-539.

Wautier, M. P., O. Chappey, S. Corda, D. M. Stern, A. M. Schmidt and J. L. Wautier (2001). "Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE." Am J Physiol Endocrinol Metab **280**(5): E685-694.

Wendt, T. M., N. Tanji, J. Guo, T. R. Kislinger, W. Qu, Y. Lu, L. G. Bucciarelli, L. L. Rong, B. Moser, G. S. Markowitz, G. Stein, A. Bierhaus, B. Liliensiek, B. Arnold, P. P. Nawroth, D. M. Stern, V. D. D'Agati and A. M. Schmidt (2003). "RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy." Am J Pathol **162**(4): 1123-1137.

Wittkowski, H., K. Hirono, F. Ichida, T. Vogl, F. Ye, X. Yanlin, K. Saito, K. Uese, T. Miyawaki, D. Viemann, J. Roth and D. Foell (2007). "Acute Kawasaki disease is associated with reverse regulation of soluble receptor for advance glycation end products and its proinflammatory ligand S100A12." Arthritis Rheum **56**(12): 4174-4181.

Wu, T. L., C. C. Tsai, Y. Y. Wang, K. Y. Ho, Y. M. Wu, H. C. Hung and Y. C. Lin (2015). "The association between the RAGE G82S polymorphism, sRAGE and chronic periodontitis in Taiwanese individuals with and without diabetes." J Periodontal Res.

Xie, P., L. X. Deng, P. Gong, Y. Ding and X. H. Tang (2011). "Expression of HMGB1 and HMGN2 in gingival tissues, GCF and PICF of periodontitis patients and peri-implantitis." Braz J Microbiol **42**(3): 1213-1219.

Yan, S. D., X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern and A. M. Schmidt (1996). "RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease." Nature **382**(6593): 685-691.

Yan, S. F., R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2010). "The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature." Circ Res **106**(5): 842-853.

Yan, S. F., R. Ramasamy and A. M. Schmidt (2010). "Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging." Biochem Pharmacol **79**(10): 1379-1386.
Yoshioka, K., T. Yoshida, Y. Takakura, T. Umekawa, A. Kogure, H. Toda and T. Yoshikawa (2005). "Association study of G1704T and G82S polymorphisms of RAGE gene for microalbuminuria in Japanese type 2 diabetic patients." Metabolism **54**(4): 488-491.

Yu, S., H. Li, Y. Ma and Y. Fu (2012). "Matrix metalloproteinase-1 of gingival fibroblasts influenced by advanced glycation end products (AGEs) and their association with receptor for AGEs and nuclear factor-kappaB in gingival connective tissue." J Periodontol **83**(1): 119-126.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 Différences entre parodonte sain et parodonte atteint par la parodontite chronique 6
Figure 2 : Pathogénie des parodontites (Page and Kornman 1997) 7
Figure 3: Le récepteur spécifique des produits terminaux de glycosylation avancée 15
Figure 4 : RAGE, ses formes solubles et AGER1 17
Figure 5 Expression de HMGB1 au niveau parodontale (Ebe, et al 2011) 20
Figure 6 : Illustration des voies de signalisation de RAGE 23
Figure 7: Voie de signalisation de AGER1 chez un macrophage 26
Figure 8: Le modèle « Two hit » pour la pathogenèse de la destruction parodontale chez les patients diabétiques 27
Figure 9 Immunolocalisation de RAGE (Abbass, Korany et al. 2012). 28
Figure 10: Interrelation entre RAGE et les parodontites 29
Figure 11 : Schéma d'une coupe sagittale d'une dent pluriradiculée et de son tissu de soutien. 35
Figure 12: Caractéristiques des prélèvements et méthodes réalisées 36
Figure 13: capture des analytes par l'anticorps primaire 38
figure 14: Etape de fixation de l'anticorps de détection 39
Figure 15 : Représentation de l'étape de révélation 40
Figure 16: Test ELISA, après incubation du substrat de révélation (TMB) et mise en place de la solution stop. 40
Figure 17 : Principe de l'immunomarquage 44
Figure 18 Concentrations et corrélations des formes de RAGE 48
Figure 19 : Graphique comparant la concentration moyenne de HMGB1 dans le groupe patient et contrôle 49
Figure 20 : A,B,C : Graphiques représentant respectivement la corrélation entre l'IMC et sRAGE , esRAGE, sRAGE-esRAGE 50
Figure 21 : Corrélation entre PA , PP et les formes solubles de RAGE 51
Figure 22 : Corrélation entre le taux sérique de HMGB1 et l'âge en nombre d'années. 51
Figure 23 : Expression relative de RAGE et AGER1 dans des biopsies papillaires provenant de sites atteints ou non par la parodontite chronique. 52
Figure 24: Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après coloration à l'hématoxylines-éosines et observées en lumière transmise. 53
Figure 25 : Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après immunomarquage pour RAGE 54
Figure 26 : Coupes coronales mésio-distales de papille humaine après immunomarquage pour AGER1. 55

TABLES DES TABLEAUX

Table 1 : Classification des maladies parodontales (Armitage 1999)..... 4
Table 2 : Principaux ligands non-AGE de RAGE 21
Table 3 : Concentration sérique de sRAGE et esRAGE en fonction de différentes pathologies 31
Table 4 : Critères d'inclusion..... 33
Table 5 : Critères d'exclusion 34
Table 6 : Caractéristiques des différents tests ELISA 37
Table 7 : Amorce pour RAGE 43
Table 8: Primer pour AGER-1 43
Table 9. Démographie de la population et variables parodontales cliniques par groupe..... 46
Table 10 : Résultats des analyses de corrélation..... 50

ANNEXE 1 :

Detzen, L., S. C. Y. Chen, B. Cheng, P. N. Papapanou and E. Lalla (2017). "Increased levels of soluble CD163 in periodontitis patients." J Clin Periodontol 44(6): 585-590**.**

Accepted: 9 April 2017
DOI: 10.1111/jcpe.12731

EPIDEMIOLOGY (COHORT STUDY OR CASE–CONTROL STUDY)

WILEY Journal of Clinical Periodontology

Increased levels of soluble CD163 in periodontitis patients

Laurent Detzen[1,2] | Steven C. Y. Chen[1] | Bin Cheng[3] | Panos N. Papapanou[1] | Evanthia Lalla[1]

[1]Division of Periodontics, College of Dental Medicine, Columbia University, New York, NY, USA

[2]Orofacial Pathologies, Imaging and Biotherapies Laboratory, Faculty of Odontology, Paris Descartes University, Montrouge, France

[3]Department of Biostatistics, Mailman School of Public Health, Columbia University, New York, NY, USA

Correspondence
Evanthia Lalla, DDS, MS, Professor of Dental Medicine, Division of Periodontics, Section of Oral, Diagnostic and Rehabilitation Sciences, Columbia University College of Dental Medicine, New York, NY, USA.
Email: EL94@cumc.columbia.edu

Funding information
The study was supported by the research fund of the Division of Periodontics, Columbia University College of Dental Medicine. Laurent Detzen was supported by a fellowship from the French Ministry of Social Affairs and Health. The funders had no role in the study design, data collection and analysis, or preparation of the manuscript

Abstract

Aim: Soluble CD163 (sCD163) has been implicated as a new biomarker in inflammatory conditions. The aim of this cross-sectional study was to assess CD163 levels systemically and locally in patients with chronic periodontitis.

Methods: sCD163 levels were measured by ELISA in serum samples from 70 periodontitis and 70 periodontally healthy subjects, and in saliva samples in a subset of the population. Two gingival biopsies were harvested per subject from 20 periodontitis patients: one from a periodontally affected site, the other from a healthy site, and the relative expression of CD163 mRNA was assessed by real-time PCR.

Results: Serum sCD163 was significantly higher in periodontitis patients compared to periodontally healthy subjects (720.0 ± 330.6 ng/ml *versus* 510.7 ± 219.6 ng/ml, respectively; $p < .001$). Similarly, sCD163 levels in saliva were significantly increased in periodontitis compared to healthy subjects (3.01 ± 5.07 ng/ml *versus* 1.98 ± 4.95 ng/ml, respectively; $p = .009$). Serum and saliva sCD163 levels showed a positive correlation (Kendall's tau .27, $p = .018$). Importantly, CD163 gene expression was significantly higher in affected sites compared to unaffected sites in periodontitis patients, with a mean fold upregulation of 9.9 (STD: 15.3, $p = .010$).

Conclusion: Our findings suggest that CD163 may be involved in the pathogenesis of periodontitis and its link with systemic conditions.

KEYWORDS
CD163, gingival tissue, periodontitis, saliva, serum, systemic effects

1 | INTRODUCTION

CD163 is a 130-kDa glycosylated type 1 transmembrane protein and a member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily (Law et al., 1993; Onofre, Kolackova, Jankovicova, & Krejsek, 2009). CD163 is only expressed by cells of monocytic-macrophage lineage. Almost all mature tissue macrophages are positive for CD163 and express it at a high level (Fabriek, Dijkstra, & van den Berg, 2005). CD163 has been used as a specific marker of the activation of polarized macrophages; these include alternatively activated M2 macrophages and regulatory macrophages mediating wound repair, angiogenesis, scavenging, and tumour progression (Konermann et al., 2012; Mosser & Edwards, 2008). CD163 also acts as an innate immune sensor for bacteria and inducer of inflammation, and it promotes erythroblast and endothelial cell adhesion (Buechler, Eisinger, & Krautbauer, 2013; Etzerodt & Moestrup, 2013; Fabriek et al., 2009; Kowal et al., 2011; Onofre et al., 2009; Van Gorp, Delputte, & Nauwynck, 2010).

A soluble form of CD163 (sCD163) exists; it results from cleavage upon activation of proteinases (MMP9, TACE/ADAM17, neutrophil elastase) (Droste, Sorg, & Hogger, 1999; Hintz et al., 2002; Moller, Peterslund, Graversen, & Moestrup, 2002) following processes such as activation of toll-like receptors (TLR-2, TLR-4, TLR-5) or oxidative stress (Timmermann & Hogger, 2005; Weaver, Pioli, Wardwell, Vogel, & Guyre, 2007). The function of sCD163 is not fully understood, but it

© 2017 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

has been reported to have an anti-inflammatory effect, limiting pathogen access to macrophages and inhibiting proliferation and activation of T-lymphocytes (Van Gorp et al., 2010). Present in normal conditions in serum (Moller, Hald, & Moestrup, 2002) with a low intra-individual variation (Moller, Petersen, Rejnmark, & Moestrup, 2003), sCD163 is increased in pathologies related to inflammation and macrophage activation/proliferation (Etzerodt & Moestrup, 2013; Moller, 2012). Acute inflammatory conditions such as bacteraemia, sepsis, and acute burn cause an increase of sCD163 (Gaini et al., 2008; Piatkowski et al., 2011). In addition, sCD163 is elevated in chronic inflammatory diseases, including rheumatoid arthritis (Matsushita et al., 2002), atherosclerosis (Aristoteli, Moller, Bailey, Moestrup, & Kritharides, 2006; Moreno et al., 2010), and metabolic syndrome-related conditions such as diabetes, obesity (Sorensen et al., 2015), and chronic kidney disease (Axelsson et al., 2006). Importantly, sCD163 has been proposed as a biomarker of interest for its diagnostic, prognostic, and monitoring qualities (Buechler et al., 2013; Etzerodt & Moestrup, 2013; Moller, 2012).

Macrophages, responsible for the release of sCD163, are important immune effector cells directly involved in the pathogenesis of periodontitis (Sima & Glogauer, 2013). In addition, mounting evidence suggests that periodontitis is associated with many diseases where sCD163 has been reported to be increased, such as atherosclerosis (Kebschull, Demmer, & Papapanou, 2010), diabetes (Lalla & Papapanou, 2011), rheumatoid arthritis (Ribeiro, Leao, & Novaes, 2005), and pulmonary disease (Scannapieco, 1999). Yet, the role of sCD163 in periodontitis has not been previously explored. We hypothesized that sCD163 is increased in periodontitis and set out to investigate sCD163 levels (systemically, in serum and locally, in saliva) and to evaluate the relative expression of CD163 mRNA in affected tissues.

Clinical Relevance

Scientific rationale for the study: CD163 is expressed by activated monocytes/macrophages and soluble CD163 (sCD163) has been implicated as a new biomarker in inflammatory conditions. Its role in periodontitis has not been previously explored.

Principal findings: sCD163 levels were significantly elevated in both serum and saliva samples from periodontitis patients compared to periodontally healthy subjects. In addition, CD163 gene expression was significantly higher in periodontally affected sites compared to unaffected sites in patients with periodontitis.

Practical implications: CD163 may be involved in the pathogenesis of periodontitis and its link with systemic conditions.

2 | METHODS

2.1 | Subject recruitment

The study was conducted in accordance with the World Medical Association Declaration of Helsinki, and was approved by the Columbia University Institutional Review Board. Participants were recruited among individuals attending the clinics of the Columbia University College of Dental Medicine in New York, between October 2013 and December 2014, and signed informed consent prior to enrolment. The inclusion criteria were age ≥21 years and at least 20 teeth present. Patients with periodontitis needed to have two or more teeth in each quadrant with a probing depth (PD) ≥5 mm and concomitant clinical attachment loss (AL) ≥3 mm, and bleeding on probing (BOP) at ≥30% of their tooth surfaces. Periodontally healthy participants needed to have no sites with PD >4 mm or interproximal AL >2 mm. Current smokers, individuals who quit smoking less that 6 months prior to recruitment, had used antibiotics, aspirin, or anticoagulants in the preceding 3 months, pregnant woman and individuals with systemic conditions including diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, history of coronary heart disease, or malignancies were excluded from the study.

2.2 | Clinical examination

A full-mouth periodontal examination (six sites per tooth at all teeth present, excluding 3rd molars) was performed, using a manual periodontal probe (UNC-15; Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). PD and AL were measured and rounded to the nearest millimetre. BOP and dental plaque were recorded dichotomously (presence/absence). In a subset of the population (50 subjects per group), height and weight for determination of body mass index (BMI) were also recorded.

2.3 | Blood sampling and processing

A sample of approximately 35 ml of venous blood was collected by venipuncture from each patient using serum gel blood collection tubes (BD Vacutainer, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) at the time of the clinical examination. Blood samples were centrifuged at 1,300 *g* for 10 min, serum was collected, aliquoted, and stored at −80°C until further analysis.

2.4 | Saliva sampling and processing

For 20 periodontitis and 18 periodontally healthy subjects, 5 ml of whole un-stimulated saliva was collected in a 50 ml collection tube. All were instructed not to eat or drink, brush their teeth, or use a mouthwash for at least 1 hr prior to sampling. Saliva samples were aliquoted and stored at −80°C until further analysis. Before use, samples were centrifuged at 10,000 *g* for 2 min.

2.5 | Serum and saliva sCD163 assessment

Serum and saliva levels of sCD163 were assessed by a commercially available ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. The assay sensitivity was 0.61 ng/ml. A 20-fold dilution was used for serum samples. Saliva samples were not diluted.

2.6 | Gingival biopsy sampling

Two gingival biopsies were harvested per subject from a total of 20 patients with periodontitis. The first tissue sample was biopsied from a periodontitis-affected site, characterized by a PD ≥4 mm, AL ≥3 mm and positive for BOP. The second biopsy was collected from a periodontally healthy, control site, with a PD ≤3 mm, AL ≤2 mm and no BOP.

2.7 | CD163 mRNA expression assessment

The gingival tissue samples were placed in an RNA stabilization reagent (RNAlater; Ambion, Austin, TX, USA) and stored in liquid nitrogen. Specimens were later homogenized in Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), followed by incubation with chloroform and centrifugation at 12,000 *g*. The upper aqueous phase was collected and RNA was precipitated by mixing with isopropyl-alcohol, additional centrifugation and wash in 75% ethanol. The extracted RNA was purified using a total RNA isolation kit (RNeasy; Qiagen, Valencia, CA, USA) and quantitated spectrophotometrically. Reverse transcription was performed (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Published (PrimerBank, https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html) CD163 primers (forward 5′ TTTGTCAACTTGAGTCCCTTCAC 3′; reverse 5′ TCCCGCTACACTTGTTTTCAC 3′; PrimerBank ID: 344179109c1) were employed for real-time polymerase chain reaction (RT-PCR); β-actin was used as the housekeeping gene. The β-actin expression was similar in our set of samples and minimal variability was noted, suggesting that it was a suitable internal control. Indeed, we compared the variance of β-actin's expression in periodontitis-affected *versus* healthy samples and found no difference; $p = .197$ by the Pitman-Morgan statistic for paired data. Amplification reactions were prepared with SYBR Green (Power SYBR green PCR Mastermix; Applied Biosystems) and performed using the Step One Plus RT-PCR system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels of the target gene were determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

2.8 | Data and statistical analysis

Continuous variables were compared between periodontitis and healthy subjects using two-sample *t* tests, and dichotomous variables were compared using Chi-square tests. For saliva sCD163, Wilcoxon two-sample test was used due to skewedness of its distribution, followed by median regression controlling for age and gender. For saliva samples with sCD163 levels below the assay sensitivity, a 0 value was imputed. Multiple linear regression was used to assess the impact of periodontal status (periodontitis/healthy) on serum sCD163 levels, controlling for age, gender, and BMI. The correlation between serum and saliva was assessed via Kendall's rank correlation. The association between serum sCD163 and BMI, age, and periodontal parameters was assessed via Pearson's correlation, and the association between saliva sCD163 and age, and periodontal parameters was assessed via Kendall's correlation. All statistical analyses were performed using SAS, version 9.4. A *p*-value <.05 was considered statistically significant.

3 | RESULTS

3.1 | Study participants

Seventy periodontitis patients and 70 periodontally healthy subjects, 21–69 years of age, participated in the study. As shown in Table 1, mean age and gender distribution were similar in the periodontitis and healthy groups ($p = .620$ and $p = .394$, respectively). BMI was significantly higher in the periodontitis group compared to the periodontally healthy group ($p = .008$; $n = 50$ per group). By design, periodontitis-related variables (number of teeth present, % sites with plaque, % sites with BOP, mean PD, % sites with PD ≥5 mm, and mean AL) were all different between the two groups.

3.2 | Levels of sCD163

Serum levels of sCD163 (Figure 1) were found to be significantly higher in the periodontitis group compared to the periodontally healthy group (720.0 ± 330.6 ng/ml *versus* 510.7 ± 219.5 ng/ml

TABLE 1 Study participant demographics and clinical periodontal variables, by group. Data shown as mean ± *SD*, or *n* (%)

	Periodontitis	Healthy
Age (years)	43.2 ± 9.6	42.4 ± 10.2
Gender (female)	33 (47%)	28 (40%)
BMI (kg/m^2)	27.9 ± 5.4	25.3 ± 4.3
# teeth present	25.6 ± 2.6	26.7 ± 2.0
% sites with plaque	66.1 ± 16.5	21.7 ± 12.8
% sites with bleeding on probing	65.1 ± 19.1	14.1 ± 9.1
Mean pocket depth	3.8 ± 0.8	2.2 ± 0.3
% sites with pocket depth ≥5 mm	31.5 ± 18.1	0.1 ± 0.4
Mean attachment loss	4.1 ± 1.5	1.3 ± 1.1

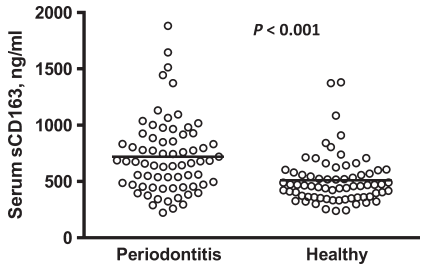

FIGURE 1 Dot blot of serum sCD163 levels in periodontitis patients *versus* periodontally healthy subjects ($n = 70$ per group). Horizontal lines represent mean values. *p*-value is based on a two-sample *t* test

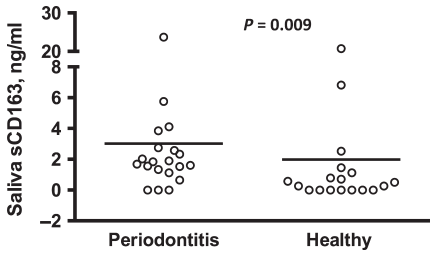

FIGURE 2 Dot blot of saliva sCD163 levels in periodontitis patients (n = 20) *versus* periodontally healthy subjects (n = 18). Horizontal lines represent mean values. p-value is based on a two-sample Wilcoxon test

respectively, n = 70 per group; $p < .001$). This difference in serum sCD163 remained statistically significant in multiple linear regression analysis adjusting for age, gender, and BMI ($p < .001$).

sCD163 levels in saliva were much lower than in serum, and were below the assay sensitivity in a total of 10 saliva samples, 7 (39%) in the periodontally healthy group *versus* 3 (15%) in the periodontitis group. When saliva levels of sCD163 were compared between the two groups (Figure 2), they were found to be significantly higher in periodontitis patients (3.01 ± 5.07 ng/ml, n = 20) than periodontally healthy subjects (1.98 ± 4.95 ng/ml, n = 18); Wilcoxon p = .009. The difference in saliva sCD163 remained statistically significant after adjustment for age and gender (BMI was not available for this subgroup), using median regression (p = .006).

3.3 | Correlations

There was a statistically significant positive correlation between serum and saliva levels of sCD163 (Kendall's tau coefficient τ = .27, p = .018).

Overall, serum levels of sCD163 were positively and significantly correlated with BMI (r = .23, p = .020). sCD163 was also positively and significantly correlated with most periodontal parameters assessed: % plaque (r = .42, $p < .001$), % BOP (r = .32, p = .001), mean PD (r = .22, p = .010), % pockets ≥5 mm (r = .26, p = .002). The correlation was not significant with age (r = .16, p = .064), mean AL (r = .11, p = .23), or number of teeth present (r = −.06, p = .481).

Saliva levels of sCD163 were positively and significantly correlated with subject age (τ = .26, p = .025). Saliva sCD163 was also significantly correlated with all the periodontal parameters assessed: % BOP (τ = .29, p = .012), mean PD (τ = .36, p = .003), % pockets ≥5 mm (τ = .42, $p < .001$), mean AL (τ = .35, p = .047), and number of teeth present (τ = −.30, p = .016).

3.4 | CD163 mRNA expression in gingival tissue of periodontics patients

The expression of CD163 in gingival tissue harvested from periodontitis-affected sites was significantly higher than in periodontally healthy, control gingiva from the same patients (mean fold change: 9.9 ± 15.3; p = .010).

4 | DISCUSSION

Our study demonstrates that sCD163 levels, both systemically in the serum and locally in the saliva, are significantly higher in patients with periodontitis compared to periodontally healthy subjects. These findings suggest for the first time a role of sCD163 in the context of periodontitis.

Further, this is the first demonstration of sCD163 presence in saliva and of a positive and significant correlation between salivary and serum levels. Indeed, although sCD163 has been previously found in certain biological fluids beyond serum, such as cerebrospinal fluid (Galea et al., 2012), synovial fluid (Matsushita et al., 2002), and urine (Su et al., 2012), it has never been reported in saliva. Saliva results from plasma ultra-filtration, mainly through the salivary glands and also through the gingival crevicular fluid, and it possesses significant advantages as a biomarker detection medium and a diagnostic/prognostic/disease monitoring aid. It is a biological sample that can non-invasively and easily be collected and can be especially useful for large-scale population studies. As expected, sCD163′s concentration in saliva was much lower than that in serum. Importantly, in an effort to further understand the role of CD163 in periodontitis, we showed significantly higher mRNA expression of CD163 in gingival biopsies of periodontally affected sites as compared to clinically healthy sites from the same periodontitis patients.

It is important to consider that the increased level of CD163 expression in disease *versus* health is likely related to changes in the cell population. Indeed, macrophages play an important role in the pathogenesis of periodontitis. The most prominent impact is attributed to M1 macrophages, which form part of the host response against the bacterial challenge and contribute to the destruction of periodontal tissues, producing pro-inflammatory cytokines (Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015). The M2 macrophages, involved in resolution of inflammation, and the regulatory macrophages (Mosser & Edwards, 2008) also play an important role in the pathophysiology of periodontitis (Sima & Glogauer, 2013). CD163 is a marker of choice of M2 macrophage polarization, but also of regulatory macrophages (Konermann et al., 2012; Mosser & Edwards, 2008). Macrophage-like cells $CD68^+$/$CD163^+$ have been directly related to IL17-producing T cells (Th17) (Allam et al., 2011). IL17 is a potent pro-inflammatory cytokine that stimulates polymorphonuclear neutrophil recruitment and activation, and Th17 cells have been reported predominantly at sites of severe chronic periodontitis. $CD68^+$/$CD163^+$ macrophage-like cells have also been shown to produce IL-23 in response to TLR2 and TLR4 activation by *P. gingivalis* LPS (Allam et al., 2011). CD163 is also used to study and detect tumour-associated macrophages (TAMs) (Komohara, Jinushi, & Takeya, 2014), which are directly involved in angiogenesis, immunosuppression, and promote tumour cell growth (Komohara et al., 2014). Higher CD163 expression on TAMs is associated with poor overall survival in certain types of cancers (Komohara et al., 2011, 2013, 2014).

An increased expression of CD163 has been reported in oral squamous cell carcinoma (OSCC) compared with that in the normal oral mucosa, suggesting that CD163 may be an important diagnostic and prognostic factor for OSCC (He et al., 2014).

Pertinently, sCD163 (mostly measured in serum) has emerged as a useful biomarker of macrophage activation in many acute and chronic inflammatory conditions. Experimental injection of LPS in healthy human volunteers was associated with an increase in sCD163 levels (Etzerodt, Maniecki, Moller, Moller, & Moestrup, 2010). Of interest, even marginally elevated sCD163 serum levels have been associated with high occurrence of complications and have been shown to have an inverse correlation with survival in chronic diseases (Moller, 2012). Although sCD163 levels are not pathognomonic of periodontal disease, our findings suggest that the presence of periodontitis may confound the association of sCD163 levels with inflammatory systemic diseases.

Limitations of our study include the cross-sectional design and relatively small sample size. Our ability to detect sCD163 levels was dictated by the sensitivity of the assay used. Generalizability is limited, as findings are specific to our study population in Northern Manhattan. Larger, longitudinal studies will shed more light into these novel observations.

Taken together, the data presented here suggest for the first time that CD163 may be involved in the pathogenesis of periodontitis and its association with other systemic conditions, and set the stage for future studies on the use of its soluble form as a valuable biomarker of oral and systemic inflammation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest in this study.

REFERENCES

Allam, J. P., Duan, Y., Heinemann, F., Winter, J., Gotz, W., Deschner, J., … Novak, N. (2011). IL-23-producing CD68(+) macrophage-like cells predominate within an IL-17-polarized infiltrate in chronic periodontitis lesions. *Journal of Clinical Periodontology*, *38*, 879–886.

Aristoteli, L. P., Moller, H. J., Bailey, B., Moestrup, S. K., & Kritharides, L. (2006). The monocytic lineage specific soluble CD163 is a plasma marker of coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis*, *184*, 342–347.

Axelsson, J., Moller, H. J., Witasp, A., Qureshi, A. R., Carrero, J. J., Heimburger, O., … Stenvinkel, P. (2006). Changes in fat mass correlate with changes in soluble sCD163, a marker of mature macrophages, in patients with CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, *48*, 916–925.

Buechler, C., Eisinger, K., & Krautbauer, S. (2013). Diagnostic and prognostic potential of the macrophage specific receptor CD163 in inflammatory diseases. *Inflammation & Allergy: Drug Targets*, *12*, 391–402.

Droste, A., Sorg, C., & Hogger, P. (1999). Shedding of CD163, a novel regulatory mechanism for a member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *256*, 110–113.

Etzerodt, A., Maniecki, M. B., Moller, K., Moller, H. J., & Moestrup, S. K. (2010). Tumor necrosis factor alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *Journal of Leukocyte Biology*, *88*, 1201–1205.

Etzerodt, A., & Moestrup, S. K. (2013). CD163 and inflammation: Biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & Redox Signaling*, *18*, 2352–2363.

Fabriek, B. O., Dijkstra, C. D., & van den Berg, T. K. (2005). The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology*, *210*, 153–160.

Fabriek, B. O., van Bruggen, R., Deng, D. M., Ligtenberg, A. J., Nazmi, K., Schornagel, K., … van den Berg, T. K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood*, *113*, 887–892.

Gaini, S., Pedersen, S. S., Koldkaer, O. G., Pedersen, C., Moestrup, S. K., & Moller, H. J. (2008). New immunological serum markers in bacteraemia: Anti-inflammatory soluble CD163, but not proinflammatory high mobility group-box 1 protein, is related to prognosis. *Clinical and Experimental Immunology*, *151*, 423–431.

Galea, J., Cruickshank, G., Teeling, J. L., Boche, D., Garland, P., Perry, V. H., & Galea, I. (2012). The intrathecal CD163-haptoglobin-hemoglobin scavenging system in subarachnoid hemorrhage. *Journal of Neurochemistry*, *121*, 785–792.

He, K. F., Zhang, L., Huang, C. F., Ma, S. R., Wang, Y. F., Wang, W. M., … Sun, Z. J. (2014). CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. *BioMed Research International*, *2014*, 838632.

Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res*, *2015*, 615486.

Hintz, K. A., Rassias, A. J., Wardwell, K., Moss, M. L., Morganelli, P. M., Pioli, P. A., … Guyre, P. M. (2002). Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *Journal of Leukocyte Biology*, *72*, 711–717.

Kebschull, M., Demmer, R. T., & Papapanou, P. N. (2010). "Gum bug, leave my heart alone!"–epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *Journal of Dental Research*, *89*, 879–902.

Komohara, Y., Hasita, H., Ohnishi, K., Fujiwara, Y., Suzu, S., Eto, M., & Takeya, M. (2011). Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Science*, *102*, 1424–1431.

Komohara, Y., Jinushi, M., & Takeya, M. (2014). Clinical significance of macrophage heterogeneity in human malignant tumors. *Cancer Science*, *105*, 1–8.

Komohara, Y., Niino, D., Saito, Y., Ohnishi, K., Horlad, H., Ohshima, K., & Takeya, M. (2013). Clinical significance of CD163(+) tumor-associated macrophages in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Science*, *104*, 945–951.

Konermann, A., Stabenow, D., Knolle, P. A., Held, S. A., Deschner, J., & Jager, A. (2012). Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun*, *18*, 745–752.

Kowal, K., Silver, R., Slawinska, E., Bielecki, M., Chyczewski, L., & Kowal-Bielecka, O. (2011). CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, *49*, 365–374.

Lalla, E., & Papapanou, P. N. (2011). Diabetes mellitus and periodontitis: A tale of two common interrelated diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, *7*, 738–748.

Law, S. K., Micklem, K. J., Shaw, J. M., Zhang, X. P., Dong, Y., Willis, A. C., & Mason, D. Y. (1993). A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily. *European Journal of Immunology*, *23*, 2320–2325.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*, 402–408.

Matsushita, N., Kashiwagi, M., Wait, R., Nagayoshi, R., Nakamura, M., Matsuda, T., … Matsuyama, T. (2002). Elevated levels of soluble CD163 in sera and fluids from rheumatoid arthritis patients and inhibition of the shedding of CD163 by TIMP-3. *Clinical and Experimental Immunology*, *130*, 156–161.

Moller, H. J. (2012). Soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *72*, 1–13.

Moller, H. J., Hald, K., & Moestrup, S. K. (2002). Characterization of an enzyme-linked immunosorbent assay for soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *62*, 293–299.

Moller, H. J., Petersen, P. H., Rejnmark, L., & Moestrup, S. K. (2003). Biological variation of soluble CD163. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *63*, 15–21.

Moller, H. J., Peterslund, N. A., Graversen, J. H., & Moestrup, S. K. (2002). Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood*, *99*, 378–380.

Moreno, J. A., Dejouvencel, T., Labreuche, J., Smadja, D. M., Dussiot, M., Martin-Ventura, J. L., … Meilhac, O. (2010). Peripheral artery disease is associated with a high CD163/TWEAK plasma ratio. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*, 1253–1262.

Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*, 958–969.

Onofre, G., Kolackova, M., Jankovicova, K., & Krejsek, J. (2009). Scavenger receptor CD163 and its biological functions. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, *52*, 57–61.

Piatkowski, A., Grieb, G., Das, R., Bozkurt, A., Ulrich, D., & Pallua, N. (2011). Soluble CD163: A novel biomarker for the susceptibility to sepsis in severe burn injuries. *Indian Journal of Plastic Surgery*, *44*, 118–124.

Ribeiro, J., Leao, A., & Novaes, A. B. (2005). Periodontal infection as a possible severity factor for rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Periodontology*, *32*, 412–416.

Scannapieco, F. A. (1999). Role of oral bacteria in respiratory infection. *Journal of Periodontology*, *70*, 793–802.

Sima, C., & Glogauer, M. (2013). Macrophage subsets and osteoimmunology: Tuning of the immunological recognition and effector systems that maintain alveolar bone. *Periodontology 2000*, *63*, 80–101.

Sorensen, L. P., Parkner, T., Sondergaard, E., Bibby, B. M., Moller, H. J., & Nielsen, S. (2015). Visceral obesity is associated with increased soluble CD163 concentration in men with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Connection*, *4*, 27–36.

Su, L., Feng, L., Liu, C., Jiang, Z., Li, M., Xiao, K., … Xie, L. (2012). Diagnostic value of urine sCD163 levels for sepsis and relevant acute kidney injury: A prospective study. *BMC Nephrology*, *13*, 123.

Timmermann, M., & Hogger, P. (2005). Oxidative stress and 8-iso-prostaglandin F(2alpha) induce ectodomain shedding of CD163 and release of tumor necrosis factor-alpha from human monocytes. *Free Radical Biology and Medicine*, *39*, 98–107.

Van Gorp, H., Delputte, P. L., & Nauwynck, H. J. (2010). Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Molecular Immunology*, *47*, 1650–1660.

Weaver, L. K., Pioli, P. A., Wardwell, K., Vogel, S. N., & Guyre, P. M. (2007). Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *Journal of Leukocyte Biology*, *81*, 663–671.

How to cite this article: Detzen L, Chen SCY, Cheng B, Papapanou PN, Lalla E. Increased levels of soluble CD163 in periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2017;44:585–590. https://doi.org/10.1111/jcpe.12731

Les opinions émises dans les dissertations présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, sans aucune approbation ni improbation de la Faculté de Chirurgie Dentaire.

DETZEN Laurent. Variations de l'expression des formes de RAGE au cours de la parodontite chronique. 2017 ; 81 pages : ill., graph., tabl. Réf. Biblio. : (61-70).

Sous la direction du Professeur Philippe BOUCHARD

Th : Chir Dent. : Paris 7 : année 2017

Introduction : RAGE est le récepteur Récepteur spécifique des produits finaux de glycosylation avancée. Des formes solubles sont retrouvées dans le sérum chez l'homme. Elles sont produites par clivage de la forme membranaire du récepteur RAGE (cRAGE) ou par une production endogène de cette forme soluble (esRAGE). Les interactions entre RAGE et ses différents ligants engendrent une cascade inflammatoire et la création du stress oxydant. L'activation de ce récepteur, entraine entraîne une destruction des tissus parodontaux. Un antagoniste de RAGE existe, nommé AGER-1.
Objectif : L'objectif de ce travail est d'évaluer l'expression des sRAGE dans le sérum et la salive, d'évaluer l'expression relative de RAGE et AGER1 dans des biopsies gingivales selon l'existence d'une parodontite chronique.
Matériels et méthodes : Les concentrations sériques et salivaires de sRAGE et esRAGE sont évaluées par ELISA chez 140 patients (contrôle = 70 ; parodontite = 70). Chez 20 patients du groupe parodontite, des biopsies d'un site sain et atteints par la maladie parodontale sont prélevées permettant l'évaluation de l'expression relative de AGER-1 et de RAGE.
Résultats : La concentration de sRAGE et cRAGE est significativement inférieure dans le groupe de patients présentant une parodontite (respectivement 0.947 ng/ml ± 0.12 vs 1.171 ng/ml ± 0.1 p=0.0066 ; 0.658 ± 0.08 vs 0.875 ± 0 .08 p=0.0008). Dans le sous-groupe de patients parodontaux, l'expression génique de l'ARNm de RAGE et de AGER1 dans les tissus gingivaux provenant de sites atteints par la parodontite est significativement augmentée de respectivement 4.53 ± 7.11 ; et de 2.26 ± 3.54 p=0.01 par rapport aux sites non atteints.

TITRE en anglais : Increased levels of RAGE in chronic periodontitis patients

---

DISCIPLINE : Parodontologie ; Sciences biologiques

MOTS-CLES Français : Parodontite chronique (FMesh); Marqueurs biologiques (FMesh); Récepteur spécifique des produits finaux de glycosylation avancée (FMesh).

MOTS-CLES Anglais : Cross-Sectional Studies (Mesh) Chronic periodontitis (Mesh) ; esRAGE protein (Mesh) ; Advanced Glycosylation End Product-Specific Receptor (Mesh).