

HAYETTE MAHTOUT

**INTERACTIONS DES BACTÉRIES
PARODONTOPATHOGÈNES
AVEC LES PROTÉINES RÉGULATRICES
DU COMPLÉMENT**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en microbiologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE, DE MICROBIOLOGIE ET DE
BIO-INFORMATIQUE
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2012

Résumé

Les parodontites sont des maladies inflammatoires de nature infectieuse affectant les tissus de soutien de la dent. La présence de bactéries parodontopathogènes dans le sillon gingival représente le facteur étiologique primaire responsable du déclenchement de la parodontite. La réponse immunitaire de l'hôte face à l'agression par ces parodontopathogènes détermine l'évolution de la maladie vers la destruction tissulaire ou la guérison. En effet, la stimulation des cellules immunitaires et mucoales par les bactéries et leurs facteurs de virulence engendre une forte production de médiateurs inflammatoires et de métalloprotéinases matricielles. Ce phénomène a pour conséquence d'activer diverses voies de dégradation tissulaire et osseuse.

Le système du complément est l'un des éléments importants de la réaction immunitaire puisqu'il permet l'élimination de microorganismes pathogènes. Pour éviter un effet néfaste du système du complément, les cellules de mammifères expriment à leur surface des protéines régulatrices du complément (CRPs) qui neutralisent les composantes du complément. Le but de cette étude était d'investiguer la capacité des bactéries parodontopathogènes à déjouer le système de défense de l'hôte et/ou de contribuer à l'inflammation et à la destruction tissulaire, en interagissant avec les CRPs.

D'une part, nous avons démontré que *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie anaérobie stricte à Gram négatif fortement associée à la parodontite chronique, peut induire le largage de la protéine CD46 de la surface des cellules épithéliales buccales. Une fois détachée des cellules, cette protéine est dégradée par les enzymes protéolytiques sécrétées par *P. gingivalis*. D'autre part, *Fusobacterium nucleatum*, une bactérie cohabitant avec *P. gingivalis*, a montré une capacité à lier à sa surface la protéine CD46 soluble. *F. nucleatum* couvert de la protéine CD46 s'est avéré capable d'induire une sécrétion de cytokines proinflammatoires par les cellules épithéliales. Enfin, une stimulation des cellules épithéliales par le lipopolysaccharide des parodontopathogènes a révélé une surexpression des gènes codant pour les CRPs, dont CD46, CD55 et CD59. L'ensemble de ces résultats ont mené à une meilleure compréhension des interactions des

bactéries parodontopathogènes avec le système du complément et des mécanismes contribuant à l'inflammation et à la destruction tissulaire.

Abstract

Periodontitis is a chronic inflammatory disease affecting the tooth-supporting tissues. The presence of periodontopathogens in the gingival sulcus is the primary etiologic factor responsible for the initiation of periodontitis. The host response to these bacteria is a critical determinant in the progression of disease to tissue destruction or healing. Indeed, the mucosal and immune cells secrete various inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs) in response to bacteria which activate periodontal tissue destruction.

The complement system is an important host response against invading pathogenic microorganisms. To avoid autologous complement mediated tissue injury, mammalian cells express membrane-bound complement regulatory proteins (CRPs) which neutralize the components of complement. The aim of this study was to investigate the capacity of periodontopathogens to avoid the host defense system and to contribute to tissue destruction by interacting with CRPs.

We have shown that *P. gingivalis*, a Gram-negative bacterium associated with chronic periodontitis, can induce the shedding of membrane-anchored CD46 in oral epithelial cells. Shed CD46 is degraded by proteolytic enzymes secreted by *P. gingivalis*. On the other hand, *F. nucleatum*, which is found in association with *P. gingivalis*, can bind recombinant human CD46. This interaction with CD46 is associated with the secretion of pro-inflammatory cytokines by oral epithelial cells. Finally, we have shown that CRPs expressed by oral epithelial cells can be upregulated by periodontopathogen LPS and pro-inflammatory cytokines. These results lead to a better understanding of the interactions between periodontopathogens and CRPs.

Avant-propos

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Dr Daniel Grenier de m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour l'encadrement qu'il m'a prodigué. J'aimerais particulièrement souligner ses qualités humaines, son savoir-faire, son appui moral et sa disponibilité. Mr Daniel Grenier, merci d'être ce que vous êtes.

Je remercie également ma co-directrice de thèse Dre Fatiha Chandad pour ses conseils précieux tant sur l'aspect scientifique qu'à d'autres niveaux.

Merci à Dr André Darveau d'avoir suivi l'évolution de ce projet en tant que membre de mon comité avisé.

Je tiens aussi à remercier Dre Caroline Duchaine pour avoir accepté de faire partie de mon comité d'évaluation, de même que Dre Martine Bonnaure-Mallet pour son rôle d'examinatrice externe.

Un grand merci à Dre Louise Brisson d'être une aussi merveilleuse directrice à l'écoute des étudiants.

Je souhaite dire un merci spécial aux membres du laboratoire et du GREB.

Je serai toujours redevable à Dre Florence Garnier et Dr Marc Nadal pour avoir été ceux qui ont initié mes premiers pas dans la recherche scientifique. Je leur témoigne affection et reconnaissance et je conserverai toujours le souvenir des longues discussions.

Je tiens à témoigner toute mon affection et ma reconnaissance à mes parents Mezhoura et Belaid. Que ce travail soit le témoignage de mon amour et de mon attachement.

A toute ma famille particulièrement la petite Dalila.

A mon compagnon de vie, Latif. Chéri tu es tout ce que j'ai pu souhaiter, tu m'apportes tellement, je t'aime.

A mes amis, particulièrement Hafida, merci pour le soutien moral que tu m'as apporté en 2007.

Contribution des auteurs

Chapitre 2

Ce chapitre a été publié dans la revue « Oral Microbiology and Immunology » sous la référence : Hayette Mahtout, Fatiha Chandad, Jose M. Rojo and Daniel Grenier, *Porphyromonas gingivalis* mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells, Oral Microbiol Immunol 2009;24:1-5. La protéine CD46 a été préparée par Dr Rojo. Les expériences ont été réalisées par le premier auteur. La rédaction de cet article a été effectuée par le directeur de recherche, Dr Daniel Grenier.

Chapitre 3

Ce chapitre a été publié dans la revue « Journal of Periodontology » sous la référence : Hayette Mahtout, Fatiha Chandad, Jose M. Rojo and Daniel Grenier, *Fusobacterium nucleatum* binding to complement regulatory protein CD46 modulates the expression and secretion of cytokines and matrix metalloproteinases by oral epithelial cells, J Periodontol 2011;82:311-319. La protéine CD46 a été préparée par Dr Rojo. Les expérimentations et la rédaction de cet article ont été effectuées par le premier auteur sous la supervision du directeur de recherche, Dr Daniel Grenier, et de la co-directrice, Dre Fatiha Chandad.

Chapitre 4

Ce chapitre a été publié dans la revue « FEMS Immunology and Medical Microbiology » sous la référence : Hayette Mahtout, Sèverine Curt, Fatiha Chandad, Mahmoud Rouabhia and Daniel Grenier, Effect of periodontopathogen lipopolysaccharides and pro-inflammatory cytokines on CD46, CD55, and CD59 gene/protein expression by oral epithelial cells, FEMS Immunol Med Microbiol 2011; 62 :295-303. Les analyses RT-PCR ont été réalisées avec l'aide de Sèverine Curt. Les autres expérimentations et la rédaction de cet article ont été effectuées par le premier auteur sous la supervision du directeur de recherche, Dr Daniel Grenier, et de la co-directrice, Dre Fatiha Chandad.

Chapitre 5

Ce chapitre a été soumis pour publication à la revue «Inflammation Research» sous la référence : Hayette Mahtout, Fatiha Chandad and Daniel Grenier, Expression of membrane-bound complement regulatory proteins by oral epithelial cells and upregulation of their levels by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide. Les expérimentations et la rédaction de cet article ont été effectuées par le premier auteur sous la supervision du directeur de recherche, Dr Daniel Grenier, et de la co-directrice, Dre Fatiha Chandad.

*A la mémoire de ma petite sœur Latifa (1983-2007),
A mes parents,
A Latif,*

« La science n'a pas de patrie, parce que le savoir est le patrimoine de l'humanité,
le flambeau qui éclaire le monde »
Louis Pasteur

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	ii
Abstract	iv
Avant-propos	v
Contribution des auteurs	vi
Dédicaces	viii
Tables des matières	ix
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xvii
Liste des abréviations	xviii

CHAPITRE 1 INTRODUCTION 1

1.1	ÉCOSYSTÈME BUCCAL	1
1.2	PARODONTE	2
1.3	MALADIES PARODONTALES	2
1.3.1	Définition et classification	2
1.3.1.1	Parodontite chronique	4
1.3.1.2	Parodontite agressive	4
1.3.1.3	Parodontite associée à des maladies systémiques	5
1.3.2	Facteurs de risque, conséquences systémiques et traitement des maladies parodontales	5
1.3.3	Étiologie des maladies parodontales	7
1.3.3.1	Composante bactérienne	7
1.3.3.1.1	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	8
1.3.3.1.2	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9
1.3.3.2	Réponse de l'hôte	10
1.3.3.2.1	Médiateurs inflammatoires	12
1.3.3.2.2	Métalloprotéinases matricielles	13
1.3.4	Interactions bactéries-cellules épithéliales	14
1.4	FACTEURS BACTÉRIENS DE VIRULENCE	16
1.4.1	Facteurs de colonisation	18
1.4.1.1	Adhésion	18
1.4.1.2	Formation du biofilm	19
1.4.2	Facteurs impliqués dans l'évasion du système immunitaire	20
1.4.2.1	Internalisation dans les cellules de l'hôte	20
1.4.2.2	Capsule bactérienne	21
1.4.2.3	Récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines	21
1.4.2.4	Dégradation de protéines de l'hôte	22
1.4.2.5	Induction du phénomène d'apoptose	22
1.4.3	Facteurs impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire	23

1.4.4	Facteurs impliqués dans la destruction tissulaire	23
1.5	SYSTÈME DU COMPLÈMENT	25
1.5.1	Activation du complément	25
1.5.1.1	Anaphylatoxines	28
1.5.1.2	Opsonines	28
1.5.1.3	Complexe d'attaque membranaire (MAC)	29
1.5.2	Régulation du système du complément	30
1.5.2.1	Protéines régulatrices du système du complément	30
1.5.2.1.1	CD46	33
1.5.2.1.2	CD55	37
1.5.2.1.3	CD59	37
1.5.2.2	Interactions des protéines régulatrices du complément avec les microorganismes pathogènes	38
1.6	HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	38

CHAPITRE 2 *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* MEDIATES THE SHEDDING AND PROTEOLYSIS OF COMPLEMENT REGULATORY PROTEIN CD46 EXPRESSED BY ORAL EPITHELIAL CELLS **40**

2.1	RÉSUMÉ	40
2.2	ABSTRACT	41
2.3	INTRODUCTION	42
2.4	MATERIALS AND METHODS	43
2.4.1	Bacteria and growth conditions	43
2.4.2	Recombinant CD46 protein and antibodies	43
2.4.3	Cultivation of human oral epithelial cells and identification of CD46	44
2.4.4	Treatment of human oral epithelial cells with <i>P. gingivalis</i>	45
2.4.5	Determination of residual membrane-anchored CD46 and shed CD46	45
2.4.6	Treatment of epithelial cells with recombinant CD46 and interleukin-8 determination	45
2.4.7	Purification of Lys-gingipain	46
2.4.8	Susceptibility of recombinant CD46 to degradation by <i>P. gingivalis</i> cells and purified Lys-gingipain	46
2.5	RESULTS	46
2.6	DISCUSSION	48
2.7	ACKNOWLEDGMENTS	50
2.8	REFERENCES	50

CHAPITRE 3 *FUSOBACTERIUM NUCLEATUM* BINDING TO COMPLEMENT REGULATORY PROTEIN CD46 MODULATES THE EXPRESSION AND SECRETION OF CYTOKINES AND MATRIX METALLOPROTEINASES BY ORAL EPITHELIAL CELLS **59**

3.1	RÉSUMÉ	59
3.2	ABSTRACT	60
3.3	INTRODUCTION	61
3.4	MATERIALS AND METHODS	63
3.4.1	Bacteria and growth conditions	63
3.4.2	Preparation of recombinant CD46	63
3.4.3	Functional activity of soluble recombinant CD46	64
3.4.4	Immuno-dot blot assay of CD46 binding	64
3.4.5	Cell-based enzyme-linked immunosorbent assay for CD46 binding	64
3.4.6	C3b cleavage assay	65
3.4.7	Cultivation of human oral epithelial cells	66
3.4.8	Treatment of epithelial cells	67
3.4.9	Quantitative RT-PCR analysis of the expression of genes coding for IL-6, IL-8, and MMP-9	67
3.4.10	Determination of IL-6, IL-8 and MMP-9 production	68
3.4.11	Statistical analysis	68
3.5	RESULTS	68
3.6	DISCUSSION	71
3.7	FOOTNOTES	73
3.8	ACKNOWLEDGMENTS	74
3.9	REFERENCES	74

CHAPITRE 4 EFFECT OF PERIODONTOGEN
LIPOPOLYSACCHARIDES AND PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES ON
CD46, CD55, AND CD59 GENE/PROTEIN EXPRESSION BY ORAL
EPITHELIAL CELLS **88**

4.1	RÉSUMÉ	88
4.2	ABSTRACT	89
4.3	INTRODUCTION	90
4.4	MATERIALS AND METHODS	92
4.4.1	LPS preparation	92
4.4.2	Cultivation of human oral epithelial cells	92
4.4.3	Treatment of epithelial cells	93
4.4.4	Real-time PCR analysis of the expression of the CD46, CD55, and CD59 genes	93
4.4.5	Immunofluorescence analysis for cell surface CD46, CD55, and CD59 proteins	94
4.4.6	Determination of cytokine secretion	95
4.4.7	Statistical analysis	95
4.5	RESULTS	95
4.6	DISCUSSION	98
4.7	ACKNOWLEDGMENTS	100
4.8	REFERENCES	101

CHAPITRE 5	EXPRESSION OF MEMBRANE-BOUND COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS BY ORAL EPITHELIAL CELLS AND UPREGULATION OF THEIR LEVELS BY <i>AGGREGATIBACTER ACTINOMYCETEMCOMITANS</i> LIPOPOLYSACCHARIDE	113
5.1	RÉSUMÉ	113
5.2	ABSTRACT	114
5.3	INTRODUCTION	115
5.4	MATERIALS AND METHODS	116
5.4.1	LPS preparation	116
5.4.2	Cultivation and treatments of human oral epithelial cells	117
5.4.3	Real-time RT-PCR analysis for expression of CD46, CD55 and CD59 genes	118
5.4.4	Immunofluorescence analysis for cell surface CD46, CD55 and CD59	118
5.4.5	Statistical analysis	119
5.5	RESULTS	119
5.6	DISCUSSION	121
5.7	ACKNOWLEDGMENTS	122
5.8	REFERENCES	123
CHAPITRE 6	DISCUSSION	133
BIBLIOGRAPHIE		142

Liste des figures

Figure 1.1. Représentation schématique d'un site sain et d'un site atteint de parodontite.	3
Figure 1.2. Infiltration des cellules immunitaires à travers le tissu gingival.	11
Figure 1.3. Principaux facteurs de virulence de <i>P. gingivalis</i> et <i>F. nucleatum</i> .	17
Figure 1.4. Voies d'activation du complément.	27
Figure 1.5. Rôle des composantes du système du complément.	29
Figure 1.6. Structure des protéines régulatrices du complément (CRP).	34
Figure 1.7. Mode d'action de CD46 (Membrane Cofactor Protein).	36
Figure 2.1. Identification of CD46 in lysate of oral epithelial cells GSMK-K by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis.	54
Figure 2.2. Determination of residual membrane-anchored CD46 on oral epithelial cells treated or not with an overnight culture of <i>P. gingivalis</i> .	55
Figure 2.3. Determination of shed CD46 in the cell free culture supernatant (10-fold concentrated) of oral epithelial cells treated or not with an overnight culture of <i>P. gingivalis</i> .	56

Figure 2.4. Secretion of IL-8 by epithelial cells stimulated with various amounts of soluble recombinant CD46. 57

Figure 2.5. Degradation of recombinant human CD46 by cells (A) and purified Lys-gingipain (B) of *P. gingivalis*, as determined by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis. 58

Figure 3.1. Analysis of the recombinant CD46 protein. Panel A: Electrophoretic separation by SDS-10% PAGE under non-reducing conditions of recombinant CD46 folded from inclusion bodies (lane 1) and molecular weight markers (lane 2). Panel B: Binding of recombinant CD46 (10 µg/ml) to plates coated with human C3b or ovalbumin (10 µg/ml), as detected using rabbit anti-CD46 antibodies, HRP-coupled goat anti-rabbit antibodies, and HRP substrate. 81

Figure 3.2. Binding of CD46 by *F. nucleatum* ATCC 49256 cells, as determined by an immuno-dot blot assay. 82

Figure 3.3. Quantitative determination of CD46 binding to *F. nucleatum* ATCC 49256 using a cell-based ELISA. 83

Figure 3.4. Capacity of *F. nucleatum*-bound CD46 to serve as a cofactor in the factor I-mediated cleavage of C3b. 84

Figure 3.5. IL-6 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). 85

Figure 3.6. IL-8 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). 86

Figure 3.7. MMP-9 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). **87**

Figure 4.1. Basal levels of CD46, CD55, and CD59 gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. **108**

Figure 4.2. Effect of *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, or *A. actinomycetemcomitans* LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) on CRP gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. Panel A: CD46, Panel B: CD55, Panel C: CD59. **109**

Figure 4.3. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 following treatments (48 h) with either periodontopathogen LPS (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, or *A. actinomycetemcomitans*) or recombinant cytokines (IL-6, IL-8, IL-1 β , or TNF- α). **110**

Figure 4.4. Effect of recombinant IL-6, IL-8, IL-1 β , or TNF- α (50 ng mL^{-1}) on CRP gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. **111**

Figure 4.5. Immunofluorescence staining of epithelial cell surface CD46. Epithelial cells were treated (Panels D, E, and F) or not (Panels A, B, and C) with TNF- α (50 ng mL^{-1}). **112**

Figure 5.1. Effect of *A. actinomycetemcomitans* LPS on CRP gene expression by oral epithelial cells. Epithelial cells were treated with LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) were incubated for various periods of times (0, 12, 24 and 48 h). Gene expression was quantified by real-time RT-PCR. **128**

Figure 5.2. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 in oral epithelial cells treated or not with *A. actinomycetemcomitans* LPS (1 µg/ml) for 0, 12, 24, and 48 h. **129**

Figure 5.3. Effect of *A. actinomycetemcomitans* LPS on CRP gene expression by oral epithelial cells. Epithelial cells were treated with LPS (0, 0.25, 1, 4 and 8 µg/ml) for 0 and 24 h. Gene expression was quantified by real-time RT-PCR. **130**

Figure 5.4. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 in oral epithelial cells treated with *A. actinomycetemcomitans* LPS (0, 0.25, 1, 4 and 8 µg/ml) for 0 and 24 h. **131**

Figure 5.5. Immunofluorescence staining of epithelial cell surface CD46. Epithelial cells were treated (Panels D, E, and F) or not (Panels A, B, and C) with *A. actinomycetemcomitans* LPS (4 µg/ml). **132**

Figure 6.1. Implication des CRPs dans la modulation de la réponse cellulaire épithéliale par les bactéries parodontopathogènes. **140**

Figure 6.2. Modèle de la modulation d'expression des CRPs par le LPS des parodontopathogènes et les cytokines pro-inflammatoires. **141**

Liste des tableaux

Tableau 1.1. Protéines régulatrices du complément.	32
Tableau 3.1. Primers used for the quantitative RT-PCR analysis.	80
Tableau 4.1. Primers used in the real-time PCR analysis.	106
Tableau 4.2. Secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α by oral epithelial cells stimulated with <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i> , <i>T. forsythia</i> or <i>A. actinomycetemcomitans</i> LPS (1 μ g/mL) for 24 h. Cytokine secretion was assessed by ELISA.	107
Tableau 5.1. Primers used in the real-time PCR analysis.	127

Liste des abréviations

µg	Microgramme
µl	Microlitre
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American type culture collection
BSA	Bovine serum albumin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Acide éthylènediaminotétracétique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Fetal bovine serum
IL	Interleukine
kDa	Kilodalton
mg	Milligramme
ml	Millilitre
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrix metalloproteinase
PBS	Phosphate buffer saline
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
SD	Standard deviation
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
THB	Todd Hewitt broth
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TNF	Tumor necrosis factor

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 Écosystème buccal

La cavité buccale représente un écosystème complexe constitué de mycètes, de virus, de parasites eucaryotes et de plus de 700 espèces bactériennes (Darveau et al., 1997; Dewhirst et al., 2010; Moore et Moore, 1994). La microflore buccale se constitue progressivement avec l'âge et varie suivant les déterminants écologiques et les facteurs immunologiques de l'hôte. En effet, les bactéries de l'environnement immédiat colonisent la cavité buccale dans les heures suivant la naissance. La plupart de ces bactéries pionnières colonisant la cavité buccale sont des aérobies et des anaérobies facultatives (*Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, etc). Lorsque les premières dents apparaissent, les bactéries anaérobies strictes, incluant *Porphyromonas sp*, *Prevotella sp* et *Fusobacterium sp*, s'installent en raison de la nature anaérobie du sillon gingival. La communauté microbienne buccale entretient des relations stables avec l'hôte sans conséquence pathologique. La stabilité de cette microflore est due à l'équilibre des interactions entre les bactéries et à celles entre les bactéries et l'hôte. La rupture de cet équilibre peut cependant entraîner des pathologies buccales puisque

certaines espèces bactériennes possédant un potentiel pathogène deviennent alors prédominantes (Grenier et al., 2000). La carie dentaire et la maladie parodontale constituent les deux infections buccales les plus courantes dans la population.

1.2 Parodonte

Le parodonte regroupe l'ensemble des tissus de soutien de la dent. Il est constitué de quatre tissus : la gencive, le cément, le ligament parodontal et l'os alvéolaire. La gencive, également appelée parodonte superficiel, est formée de l'épithélium gingival, incluant l'épithélium sulculaire et l'épithélium de jonction, et d'un tissu conjonctif. Les cellules épithéliales kératinisées recouvrent la face externe de la gencive et secrètent des molécules d'adhésion, des cytokines et des peptides antimicrobiens. L'épithélium sulculaire représente la partie interne de l'épithélium gingival, alors que l'épithélium de jonction est interposé entre la gencive et la dent formant un espace appelé sillon gingival. Ce dernier est de 0.5 à 3 mm de profondeur chez un sujet sain et contient un fluide appelé fluide créviculaire, un exsudat sérique ayant traversé l'épithélium de jonction. Les cellules de cet épithélium sont squameuses non kératinisées et produisent des molécules impliquées dans l'adhésion cellule-cellule. Elles secrètent également des molécules impliquées dans l'inflammation et le chimiotactisme (IL-6, IL-8), des protéases (métalloprotéinases matricielles [MMPs]) et des peptides antimicrobiens. Enfin, le tissu conjonctif est le tissu prédominant de la gencive. Il est constitué de fibres de collagène, de fibroblastes, de vaisseaux sanguins et de nerfs insérés dans une matrice extracellulaire.

1.3 Maladies parodontales

1.3.1 Définition et classification

Les maladies parodontales résultent d'une réponse immunitaire exagérée de l'hôte face à une infection bactérienne de type mixte. Ces infections se manifestent à la suite de

l'accumulation d'une plaque bactérienne spécifique dans l'espace gingivo-dentaire, et entraînent une inflammation chronique du parodonte pouvant mener à une destruction irréversible de l'ensemble des tissus de soutien de la dent (figure 1.1) (Listgarten, 1972). Ces maladies sont la principale cause de la perte des dents chez l'adulte. Les maladies parodontales sont divisées en deux grandes classes : la gingivite et la parodontite (Wiebe et Putnins, 2000). La gingivite représente un état inflammatoire réversible qui n'affecte que la gencive libre et constitue l'affection parodontale la plus répandue dans la population (Flemmig, 1999; Listgarten, 1986). La parodontite est quant à elle une infection polymicrobienne qui affecte, en plus du parodonte superficiel, les tissus parodontaux profonds, dont le ligament parodontal et l'os alvéolaire. Des études épidémiologiques ont révélé qu'environ 10 à 15% de la population des pays industrialisés est atteinte de la forme sévère et généralisée de la parodontite (Albandar, 2005).

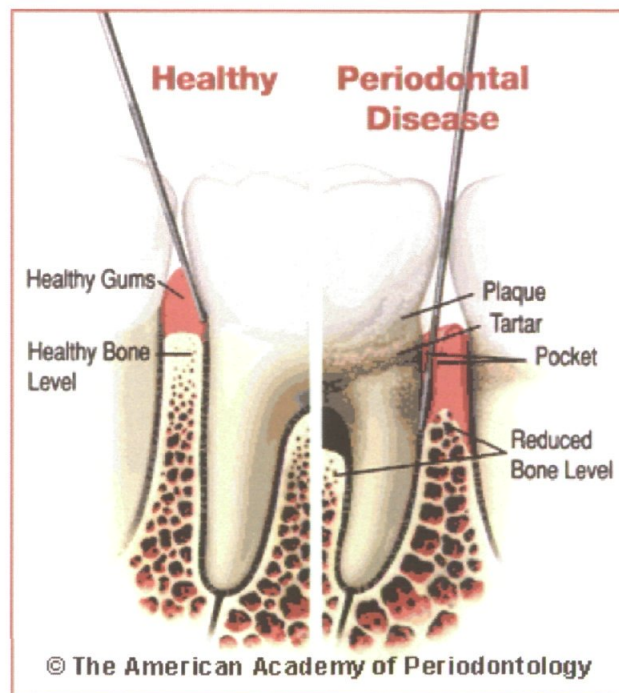


Figure 1.1. Représentation schématique d'un site sain et d'un site atteint de parodontite (The American Academy of Periodontology 1999).

Selon la classification de l'Académie Américaine de Parodontologie proposée en 1999, trois principaux groupes de parodontites sont reconnus : les parodontites chroniques, les parodontites agressives et les parodontites associées aux maladies systémiques.

1.3.1.1 Parodontite chronique

La parodontite chronique est la forme la plus courante des parodontites. Elle débute en général à l'âge adulte, mais peut être initiée dès l'adolescence chez certains sujets. La parodontite chronique est caractérisée par des phases d'activité destructive et des phases de stabilité. Dans ce type de parodontites, la perte d'attache et la résorption osseuse sont progressives et très lentes. La parodontite chronique sera qualifiée de localisée si moins de 30% des sites parodontaux sont atteints, alors qu'elle sera considérée généralisée si plus de 30% des sites sont affectés. La résorption osseuse est qualifiée de légère, modérée ou sévère selon le degré de perte osseuse déterminé par radiographie. En général, une corrélation existe entre le degré d'accumulation de la plaque sous-gingivale et la sévérité de la parodontite.

1.3.1.2 Parodontite agressive

La parodontite agressive est caractérisée par une évolution rapide; la perte d'attache et la résorption osseuse sont aggravées par les facteurs de risque locaux et environnementaux. Il n'existe pas de corrélation directe entre la quantité de plaque présente et l'étendue des destructions parodontales. Elles sont classées en fonction de l'étendue (localisée ou généralisée) et de la gravité de la maladie (légère, modérée ou sévère) (Tonetti et Mombelli, 1999).

1.3.1.3 Parodontite associée à des maladies systémiques

Les parodontites associées à des maladies systémiques se développent suite à certains troubles généraux qui vont affaiblir les capacités de défense de l'hôte. En effet, de nombreuses maladies perturbent le métabolisme tissulaire et le fonctionnement du système immunitaire. Ceci peut rendre les sujets atteints plus vulnérables aux agressions bactériennes parodontales. Ainsi les parodontites peuvent être une manifestation de certaines maladies systémiques hématologiques (leucémie) ou génétiques (syndrome de Down) (Wiebe et Putnins, 2000).

1.3.2 Facteurs de risque, conséquences systémiques et traitement des maladies parodontales

Bien que les facteurs de risque soient considérés comme secondaires dans l'étiologie des maladies parodontales, ils jouent néanmoins un rôle important dans la vitesse de progression et la sévérité de la gingivite et de la parodontite. En effet, tout facteur capable d'altérer la réponse immunitaire et ainsi l'équilibre entre l'hôte et les bactéries, peut influencer la santé parodontale. Plusieurs études scientifiques ont permis d'identifier ces principaux facteurs de risque : l'hygiène buccale inadéquate, les changements hormonaux (grossesse, ostéoporose) (Harrell et Stein, 1995; Sooriyamoorthy et Gower, 1989), l'hérédité (Michalowicz et al., 1991), la nutrition (catégorie socio-économique), le tabagisme (Bergstrom, 1989; Haber et Kent, 1992), le stress et certaines infections systémiques (Genco et Loe, 1993).

Au cours de la dernière décennie, plusieurs études épidémiologiques ont montré l'existence d'une association entre les parodontites et certaines maladies ou conditions (diabète, maladies cardiovasculaires, infections pulmonaires, naissances prématurées) (de Pablo et al., 2009; Gendron et al., 2000; Paju et Scannapieco, 2007). En effet, les microorganismes buccaux peuvent causer des infections ou dommages à distance selon

les mécanismes suivants : i) la translocation des microorganismes au niveau d'autres tissus ou organes via la circulation sanguine, ii) la mise en circulation systémique de toxines microbiennes et de médiateurs inflammatoires et iii) la formation de complexes immuns dans la circulation. Il a été observé que les maladies parodontales sévères pouvaient augmenter le taux de glycémie et entraîner des complications liées au diabète (Choi et al., 2011).

Le traitement a pour objectif de rétablir la santé parodontale et maintenir cet état de santé à long terme. Le détartrage et le surfaçage radiculaire sont utilisés pour éliminer le tartre et la plaque dentaire, en particulier dans la poche parodontale. Ce traitement mécanique réduit l'inflammation et le saignement des gencives et prévient un approfondissement des poches parodontales. Il est habituellement suffisant pour contrôler et stabiliser l'état parodontal dans les formes précoces ou modérées de la maladie. Cependant, ce type de traitement peut ne pas s'avérer efficace. En effet, certains microorganismes gingivaux ne sont pas éliminés en raison de leur localisation dans des zones inaccessibles aux instruments du détartrage (Umeda et al., 2004). Des études ont rapporté que certaines bactéries comme *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sont très résistantes à l'élimination mécanique, en raison de leur grande capacité à s'attacher aux tissus gingivaux et à les envahir (Renvert et al., 1990; Tinoco et al., 1998). Ainsi, la nature infectieuse des maladies parodontales et les résultats limités obtenus avec la thérapie mécanique imposent, pour certaines formes de parodontites, le recours à une antibiothérapie (Umeda et al., 2004).

Les antibiotiques peuvent être administrés de façon systémique ou locale. Les antibiotiques systémiques parviennent aux tissus parodontaux et dans la poche parodontale par le sérum. Ils peuvent ainsi efficacement atteindre les microorganismes inaccessibles au traitement mécanique. Par ailleurs, cette approche systémique présente le risque d'entraîner des effets secondaires et de mener à l'apparition de résistances bactériennes. Ainsi, l'utilisation d'une antibiothérapie localisée réduit les effets secondaires des antibiotiques et permet d'obtenir de fortes concentrations d'antibiotiques dans les sites ciblés. L'inconvénient de cette thérapie est qu'elle est limitée au site

d'application. De ce fait, le risque de réinfection par les parodontopathogènes présents dans d'autres sites est possible.

L'antibiothérapie systémique s'avère souvent nécessaire pour les cas de parodontites agressives et sévères, alors que l'antibiothérapie locale est plutôt adaptée aux patients présentant une atteinte localisée. Les principaux antibiotiques utilisés sont les β -lactamines, le métronidazole, les tétracyclines et la clindamycine. Les β -lactamines sont des antibiotiques à large spectre d'activité et fréquemment utilisés pour traiter l'abcès parodontal. Le métronidazole cible particulièrement les bactéries anaérobies strictes; il s'avère très efficace pour traiter les parodontites réfractaires. Les tétracyclines sont principalement indiquées pour les formes agressives de parodontite à prédominance d'*A. actinomycetemcomitans*.

1.3.3 Étiologie des maladies parodontales

Des facteurs microbiologiques et immunologiques sont les agents étiologiques responsables des maladies parodontales. D'une part, les bactéries parodontopathogènes présentes dans la flore microbienne buccale constituent le facteur étiologique primaire responsable du déclenchement de la maladie (Holt et Ebersole, 2005; O'Brien-Simpson et al., 2004). D'autre part, la réponse immunitaire de l'hôte face à l'agression par ces parodontopathogènes détermine l'évolution de la maladie vers la destruction tissulaire ou la guérison (Kinane, 2001).

1.3.3.1 Composante bactérienne

Les analyses microbiologiques ont permis de démontrer que les gingivites sont des infections polymicrobiennes non spécifiques. Le déclenchement de cette inflammation gingivale est lié à une augmentation de la charge bactérienne (Mariotti, 1999). Contrairement à la gingivite, une quinzaine d'espèces bactériennes ont pu être associées

aux différentes formes de parodontites. Ce sont des bactéries anaérobies strictes, pour la plupart à Gram-négatif, incluant *Porphyromonas gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus* et *Eikenella corrodens* (Ezzo et Cutler, 2003). Un complexe bactérien nommé « complexe de Socransky » ou « complexe rouge », composé de *P. gingivalis*, *T. denticola* et *T. forsythia*, a été fortement associé à la parodontite chronique (Socransky et al., 1998). *A. actinomycetemcomitans* est associé pour sa part à la parodontite agressive localisée (Haffajee et Socransky, 1994; Henderson et al., 2002). *F. nucleatum* et *P. gingivalis*, deux espèces bactériennes qui ont été particulièrement étudiées dans le présent projet, seront décrites plus en détail dans les sections qui suivent.

1.3.3.1.1 *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum est une bactérie à Gram-négatif dont la croissance n'est pas affectée par la présence de faibles concentrations d'oxygène (6%). La bactérie se présente sous la forme de bâtonnet dont la longueur varie entre 5 à 10 µm (Henderson et al., 2002). *F. nucleatum* est considéré comme une bactérie commensale opportuniste et est retrouvée au niveau des tissus gingivaux sains et malades. Au niveau des tissus sains, *F. nucleatum* joue un rôle dans la stimulation de la réponse immunitaire basale de l'hôte (Huang et al., 2004; Kimball et al., 2006, Vankeerberghen, 2005). Cette bactérie a cependant été impliquée dans la pathogénèse des gingivites et de certaines formes de parodontites (Socransky et Haffajee, 2005). *F. nucleatum* a été retrouvée en association avec d'autres espèces pathogènes notamment *T. forsythia*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* et *S. intermedius* dans les sites parodontaux montrant des poches profondes et une perte d'attache importante (Socransky et al., 1998; Tatakis et Kumar, 2005). Cette bactérie a également été isolée de cas d'infections extra-buccales (infections pulmonaires, infections de l'os, infections hépatiques, etc) (Bartlett, 1993; Bennett et Eley, 1993; Brook, ; Marina et al., 1993).

F. nucleatum produit un grand nombre de facteurs de virulence (lipopolysaccharide [LPS], leucotoxine, hémolysine, etc) qui participent à l'adhésion, la colonisation, la perturbation de la réponse de l'hôte et la destruction tissulaire (Bolstad et al., 1996; Han et al., 2000), ce qui explique son rôle potentiel dans la pathologie parodontale. Un traitement mécanique est habituellement suffisant pour réduire l'incidence de *F. nucleatum* dans les sites parodontaux atteints. Néanmoins, une antibiothérapie au métronidazole associée au débridement mécanique s'avère nécessaire dans le cas de parodontites sévères impliquant cette bactérie.

1.3.3.1.2 *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis est un coccobacille non motile, anaérobie strict à Gram-négatif. C'est un microorganisme asaccharolytique qui utilise comme source d'énergie pour sa croissance des acides aminés et peptides au lieu de glucides. *P. gingivalis* obtient les nutriments nécessaires à sa multiplication via la dégradation des protéines de l'hôte. *P. gingivalis* est considéré comme un agent étiologique majeur de la parodontite chronique (Andrian et al., 2006a). Toutefois, il peut être retrouvé également dans les cas de gingivites et de parodontites nécrotiques. Il est retrouvé de façon importante dans les sites sous-gingivaux profonds et les sites en phase active de destruction (Papapanou et al., 1997; Tatakis et Kumar, 2005). Il est aussi présent sur la langue et dans les amygdales et la salive de patients atteints de parodontite (Loos et al., 1993).

P. gingivalis exprime de nombreux facteurs de virulence, notamment des protéases, appelées gingipaines, qui sont considérées comme les principaux facteurs impliqués dans le pouvoir pathogénique de la bactérie (Hajishengallis et al., 2006; Huang et al., 2001; Potempa et al., 1995). Elles sont responsables d'environ 85% de son activité protéolytique totale. Leur fonction majeure est l'acquisition de nutriments via la dégradation des protéines de l'hôte. *P. gingivalis* a un potentiel pathogène qui s'exprime en synergie avec certaines espèces bactériennes, notamment *T. denticola* et *T. forsythia*. En effet, des infections expérimentales réalisées dans un modèle animal ont montré

qu'une infection mixte causée par *P. gingivalis*, *T. denticola* et *T. forsythia* provoque une réponse inflammatoire excessive et un taux de mortalité élevé chez la souris en comparaison avec une infection impliquant une seule bactérie (Kimizuka et al., 2003).

Des études ont rapporté que *P. gingivalis* est associé à des désordres systémiques, incluant les maladies cardiovasculaires (Teng et al., 2002). En effet, cette bactérie possède la capacité d'envahir les cellules endothéliales, ce qui pourrait être un mécanisme critique pour son rôle étiologique dans certaines formes de maladies cardiovasculaires (Dorn et al., 2000; Kuramitsu et al., 2001). Par ailleurs, d'autres études ont montré la capacité de *P. gingivalis* à coaggréger avec les plaquettes sanguines. Ce phénomène pourrait avoir comme conséquence de favoriser une thrombose coronaire (Herzberg et Meyer, 1996).

Un traitement mécanique est souvent inefficace pour éradiquer *P. gingivalis* des sites parodontaux malades (Mombelli et al., 2000; Petersilka et al., 2002). L'utilisation d'une antibiothérapie systémique au métronidazole associée au débridement mécanique est nécessaire pour éliminer *P. gingivalis* de ces sites (Loesche et al., 1992).

1.3.3.2 Réponse de l'hôte

L'accumulation des bactéries dans le sillon gingival provoque un début d'inflammation. Ceci se traduit par une dilatation des vaisseaux sanguins et une légère exsudation de fluide crévicaire suivie par une migration à travers le tissu conjonctif de neutrophiles et de macrophages. Les leucocytes s'accumulent ensuite au niveau de l'épithélium qu'ils traversent pour gagner le sillon gingival ou la poche parodontale (Wennstrom et al., 1980) (figure 1.2). Ils sont attirés par des facteurs chimioattractants de l'hôte (interleukines) et des bactéries (LPS) (Kornman et al., 1997). Au niveau du ligament parodontal, certains fibroblastes dégénèrent et les fibres de collagène sont détruites. L'inflammation s'intensifie provoquant une invagination de l'épithélium en profondeur pour former ainsi une poche parodontale de plus en plus profonde (Kornman

et al., 1997). Les bactéries parodontopathogènes trouvent dans la poche parodontale un environnement idéal à leur multiplication. En effet, le milieu est exempt d'oxygène et riche en nutriments utilisables par les bactéries. La perméabilité épithéliale augmente et permet ainsi le passage de facteurs de virulence bactériens dans le tissu conjonctif et la migration des leucocytes vers ce tissu. Les enzymes protéolytiques bactériens, les cytokines et les protéases de l'hôte agissent de concert pour entraîner la destruction tissulaire. Le parodonte profond est donc atteint menant à l'alvéolyse et la résorption osseuse (Schenkein, 2006).

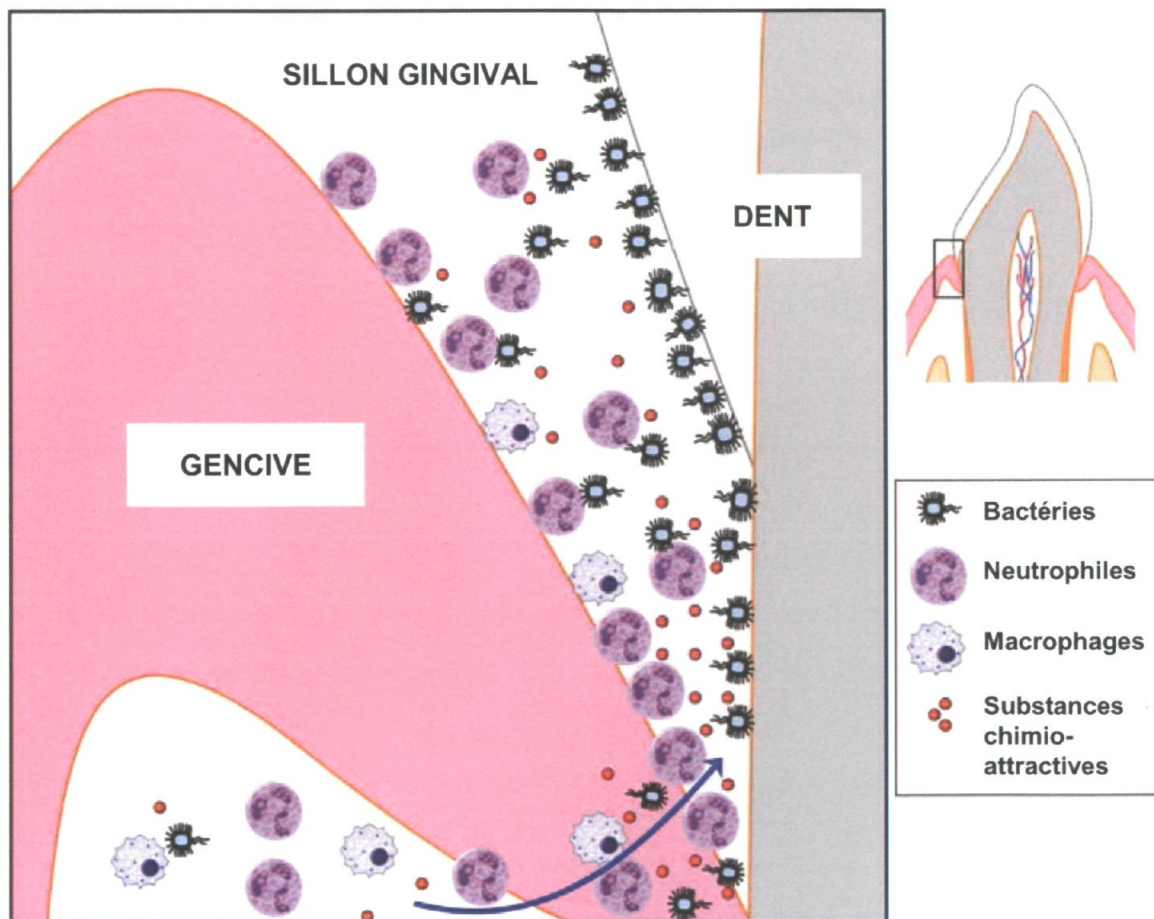


Figure 1.2. Infiltration des cellules immunitaires à travers le tissu gingival (Figure adaptée de Hajishengallis, 2010).

1.3.3.2.1 Médiateurs inflammatoires

La sécrétion d'enzymes protéolytiques par les bactéries parodontopathogènes provoque la dégradation des structures cellulaires. Toutefois, la destruction tissulaire observée au cours des parodontites semblerait plutôt liée à la réponse exagérée des systèmes de défense de l'hôte caractérisée par une forte production de cytokines pro-inflammatoires et de prostaglandines en réaction à la stimulation continue par les parodontopathogènes (Okada et Murakami, 1998; Schenkein, 2006).

De nombreuses études ont montré que certaines bactéries parodontopathogènes, notamment *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* et *A. actinomycetemcomitans*, sont capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et le facteur tumoral de nécrose [TNF- α]) par les cellules immunes et muco-sales de l'hôte (Bodet et al., 2006; Holt et Ebersole, 2005; Kornman et al., 1997; Sela, 2001). Ces bactéries pourraient ainsi favoriser la réponse immunodestructrice de l'hôte (Graves, 2008). L'IL-1 β est une interleukine produite principalement par les macrophages ayant été stimulés avec un produit bactérien. Elle induit l'expression de récepteurs cellulaires, de cytokines, de MMPs, de prostaglandine E₂ et d'activateurs de plasminogène, favorisant ainsi le processus inflammatoire et la résorption osseuse (Graves et Cochran, 2003; Preiss et Meyle, 1994). L'IL-6 est sécrétée par les cellules épithéliales, les fibroblastes et les macrophages. Elle stimule la prolifération des lymphocytes B et la formation des ostéoclastes. L'IL-8 est une chimokine produite principalement par les mêmes cellules que l'IL-6 et a comme rôle l'attraction des neutrophiles aux sites malades (Darveau et al., 1998; Jin et al., 2002). De plus, elle stimule la libération de MMPs et contribue à la destruction du collagène (Irwin et Myrillas, 1998; Luster, 1998). Enfin, le TNF- α qui est produit par les macrophages joue un rôle important dans la sécrétion des MMPs et la résorption osseuse (Graves et Cochran, 2003). Il a été montré que ces cytokines inflammatoires sont présentes en grande quantité dans le fluide crévicalaire et dans les tissus parodontaux des patients souffrant de parodontites (Okada et Murakami,

1998). Cependant, leur concentration diminue après une thérapie parodontale (Masada et al., 1990).

La prostaglandine E₂ est un puissant inducteur de la résorption osseuse (Choi et al., 2005). Les premières cellules responsables de la production de prostaglandine E₂ au niveau du parodonte sont les fibroblastes et les macrophages (Offenbacher, 1996). Elle est retrouvée en importante quantité dans le fluide crévulaire de la poche parodontale (Jin et al., 1999). Elle stimule l'expression de MMPs par les monocytes et les fibroblastes ce qui déclenche la destruction de tissu conjonctif (Choi et al., 2005).

1.3.3.2.2 Métalloprotéinases matricielles

La destruction des tissus parodontaux est le résultat de la dégradation des composantes tissulaires médiée par de nombreuses enzymes de l'hôte, notamment les MMPs (Birkedal-Hansen, 1993). Les MMPs sont synthétisées par plusieurs types cellulaires, incluant les fibroblastes, les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Ces protéinases appartiennent à la famille des endopeptidases à zinc qui dégradent les molécules de la matrice extracellulaire, incluant le collagène, la laminine et la fibronectine (Reynolds et Meikle, 1997). Les MMPs sont secrétées sous forme de pro-enzymes inactives et deviennent actives suite à un clivage protéolytique par la plasmine ou d'autres enzymes (Van Lint et Libert, 2006). Leurs activités sont par ailleurs sous le contrôle d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs; Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) (Andrian et al., 2007). Chez le sujet sain, les MMPs participent à l'homéostasie du tissu parodontal qui est en constant remaniement. Cependant, dans les conditions pathologiques, la quantité des MMPs activées sous l'effet de la production excessive de médiateurs inflammatoires augmente dans les sites gingivaux et la concentration des TIMPs diminue (Soell et al., 2002). Les principales MMPs produites lors de parodontites sont les collagénases (MMP-1, 8 et 13), les gélatinases (MMP-2 et 9) et les stromelysines (MMP-3, 10 et 11) (Birkedal-Hansen, 1993; Overall et al., 1991).

Les produits bactériens tels que le LPS des bactéries à Gram-négatif peuvent stimuler directement les cellules immunes et mucosales et induire à la production de MMPs. Par ailleurs, des études ont montré que la sécrétion et l'activation de MMPs par les cellules gingivales sont stimulées *in vitro* par la présence de *F. nucleatum* et *P. gingivalis* (Gendron et al., 2004). De plus, il a été montré que *F. nucleatum* induit la sécrétion de collagénase (MMP-8), après interaction avec les leucocytes polymorphonucléaires (PMNs). Cette collagénase est capable de dégrader le collagène de type I, II et III (Uitto et al., 2005). Les protéases produites par certains parodontopathogènes peuvent activer les formes latentes des MMPs secrétées par les PMNs, les fibroblastes et les cellules épithéliales gingivales (Sorsa et al., 1992; Zhou et Windsor, 2006). Il est important de souligner que les MMPs sont retrouvées en forte quantité dans les sites enflammés indiquant une destruction accrue du tissu conjonctif gingival. En effet, les taux de MMP-2, MMP-8 et MMP-9 sont plus élevés dans les sites atteints de parodontites (Birkedal-Hansen, 1993). Ces MMPs sont associées à une destruction tissulaire irréversible. Les MMP-2 et MMP-9 ont la capacité de dégrader le collagène de type IV et d'autres protéines matricielles, notamment la fibronectine, la laminine et l'élastine qui jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité des tissus parodontaux (Andrian et al., 2007; Birkedal-Hansen, 1993; Reynolds et Meikle, 1997).

1.3.4 Interactions bactéries-cellules épithéliales

L'épithélium gingival est constitué en majorité (90%) de kératinocytes qui se multiplient et se différencient dans les couches les plus profondes de l'épithélium. Ces cellules migrent ensuite vers la surface pour remplacer celles qui s'éliminent au fur et mesure du renouvellement des populations cellulaires. L'épithélium gingival se renouvelle en permanence par un équilibre entre la multiplication cellulaire et la desquamation des cellules mortes. Le potentiel de régénération continu du tissu épithélial constitue un élément important pour le maintien de l'intégrité tissulaire. Par ailleurs, l'épithélium gingival contient des cellules de type non-kératinocytes qui constituent 10% de la population des cellules de l'épithélium buccal. Ces cellules sont les

mélanocytes qui synthétisent le pigment de mélanine, les cellules de Merkel qui expriment des structures de type synaptique et les cellules dendritiques (cellules de Langerhans).

Les cellules épithéliales constituent une barrière physique entre les microorganismes et les tissus internes de l'hôte. La desquamation régulière des couches superficielles du tissu épithélial assure l'élimination mécanique des bactéries adhérentes (Presland et Dale, 2000). De plus, elles expriment à leur surface des récepteurs PRRs (Pattern-Recognition Receptors) qui ont un rôle dans la reconnaissance et potentiellement la distinction entre les microorganismes commensaux et pathogènes (Philpott et Girardin, 2004). En effet, des études récentes ont montré que l'expression des PRRs de type TLR (Toll like Receptor) par les cellules épithéliales gingivales leur permet de faire une distinction entre une bactérie pathogène comme *P. gingivalis*, une bactérie commensale opportuniste comme *F. nucleatum* et une bactérie commensale vraie comme *Streptococcus sanguinis*. Cette discrimination permet d'activer des voies de réponse cellulaire adaptée soit à une colonisation pathogénique ou à une situation d'équilibre entre la flore buccale et l'hôte (Delneste et al., 2007; Peyret-Lacombe et al., 2009).

La barrière épithéliale joue également un rôle primordial dans l'immunité innée. En effet, les cellules épithéliales synthétisent des peptides antimicrobiens comme les β -défensines à large spectre d'activité. Ces molécules exercent un effet bactéricide ou bactériostatique sur les parodontopathogènes. De plus, elles sont impliquées dans le chimiotactisme et dans l'activation des lymphocytes et des macrophages (Dale et Fredericks, 2005; Yang et al., 2004).

Par ailleurs, plusieurs auteurs ont montré que l'épithélium buccal est impliqué dans le processus pro-inflammatoire via la production de cytokines (IL-6 et IL-8), de prostaglandines et de protéases (MMPs) en réponse à la stimulation continue par les parodontopathogènes (Andrian et al., 2006a; Andrian et al., 2007; Gemmell et al., 2001; Madianos et al., 2005). De plus, l'épithélium gingival permet l'infiltration de fluide et de cellules immunitaires via les jonctions intercellulaires. Le passage de cellules de

l'immunité, notamment les macrophages et les neutrophiles, permet de lutter contre la dissémination des microorganismes. Ces propriétés immunologiques de l'épithélium buccal et sa position comme première ligne de défense contre l'infection microbienne font que ce tissu soit un élément important dans le processus de l'homéostasie tissulaire.

1.4 Facteurs bactériens de virulence

Les mécanismes de pathogénicité des bactéries parodontopathogènes peuvent être répartis en trois catégories : i) les mécanismes qui interviennent dans la colonisation bactérienne, ii) les mécanismes qui participent à l'évasion et la neutralisation du système de défense de l'hôte, et iii) les mécanismes qui interviennent dans la réponse inflammatoire et la destruction tissulaire. Dans les sections qui suivent, les facteurs de virulence de *P. gingivalis* et *F. nucleatum* seront présentés plus en détail (figure 1.3).

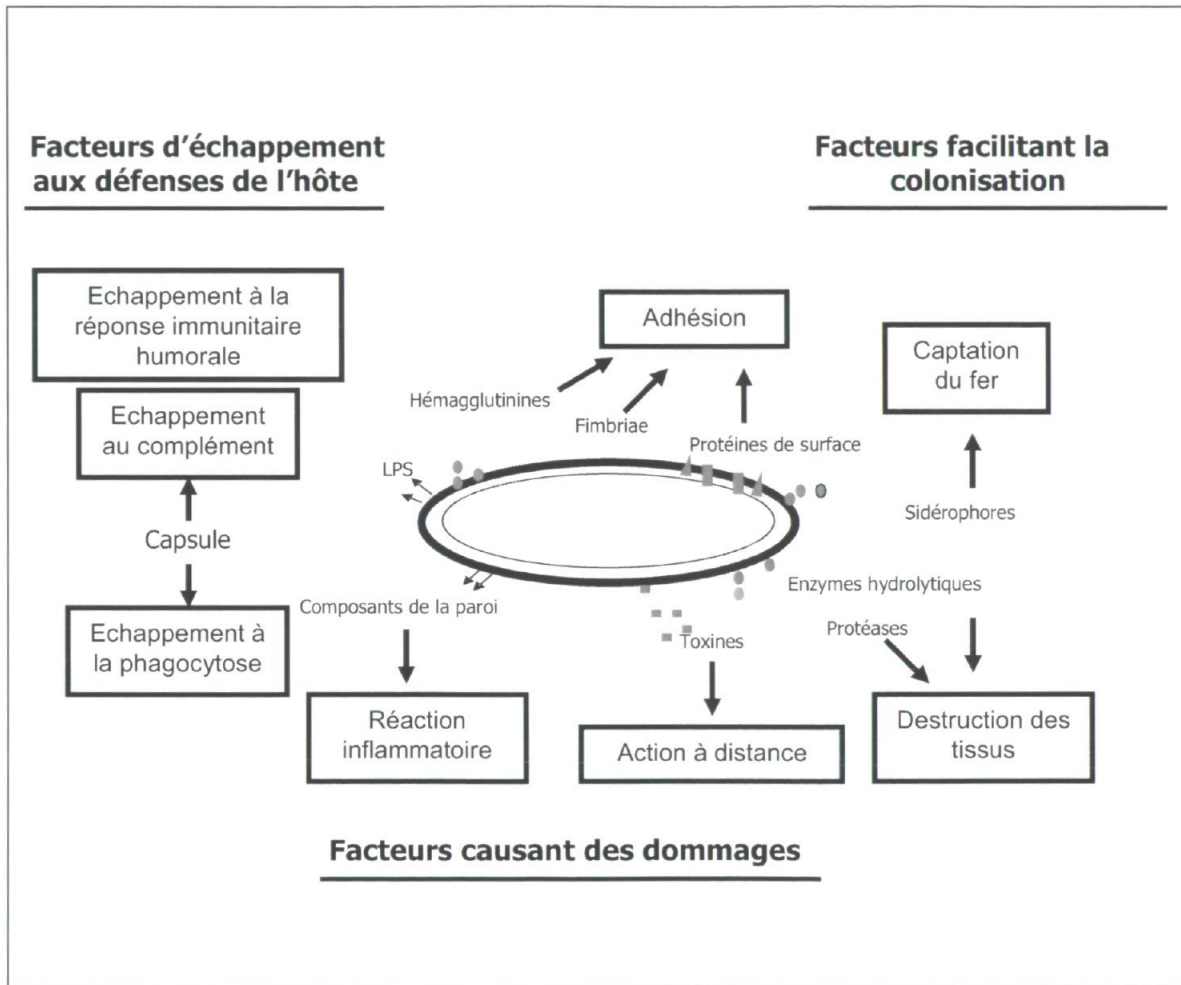


Figure 1.3. Principaux facteurs de virulence de *P. gingivalis* et *F. nucleatum*.

1.4.1 Facteurs de colonisation

Les bactéries parodontopathogènes peuvent coloniser les zones sous-gingivales et subséquemment produire des facteurs néfastes pour les tissus gingivaux. Pour coloniser l'espace sous-gingival, les bactéries doivent adhérer aux surfaces libres, puis se multiplier pour survivre dans un environnement constamment soumis aux flux de la salive et du fluide crévulaire.

1.4.1.1 Adhésion

Le phénomène d'adhésion bactérienne aux diverses surfaces buccales de l'hôte est une étape obligatoire et constitue le début du processus de colonisation pour les bactéries. Pour s'établir dans un site de la cavité buccale, les bactéries doivent être en mesure de s'attacher à une ou plusieurs surfaces; soit à la surface des dents, aux cellules de l'hôte (épithélium) ou à d'autres bactéries fixées à ces surfaces (adhérence interbactérienne). Cette adhérence est possible grâce à des molécules de surface des bactéries (adhésines, fimbriae) qui interagissent avec des récepteurs spécifiques (Budu et al., 2003). Cette adhérence bactérienne est à l'origine d'une communication moléculaire entre les bactéries et les cellules eucaryotes. Des études ont rapporté que les bactéries du complexe rouge (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) possèdent des structures (fimbriae, hémagglutinines) leur permettant de s'attacher aux cellules du parodonte et aux surfaces dentaires (Edwards et al., 2005; Ikegami et al., 2004; Lamont et Jenkinson, 1998; Munemasa et al., 2000; Whittaker et al., 1996). Il a été montré que *P. gingivalis* possède des fimbriae répartis de façon pérित्रiche. L'étude de la séquence constitutive du gène *fimA* codant pour la fimbriine a permis de mettre en évidence six types de fimbriae (I à V et Ib (Amano et al., 2004; Kuboniwa et al., 2009). Les protéases Lys- et Arg- gingipaines de *P. gingivalis* contiennent jusqu'à quatre domaines hémagglutinines fortement impliqués dans l'adhésion de cette bactérie aux cellules mucosales (Imamura, 2003). D'autre part, ces protéases sont capables de dégager des cryptitopes de la surface

des cellules épithéliales. L'exposition de ces récepteurs permet de rendre possible l'adhésion des fimbriae aux cellules de l'hôte (Gibbons, 1989). De plus, *P. gingivalis* sécrète une enzyme de type neuraminidase qui dégrade l'acide sialique à la surface des cellules épithéliales, exposant ainsi des résidus galactosyls qui sont des récepteurs favorables pour la liaison de cette bactérie (Aruni et al., 2001; Childs et Gibbons, 1988). Par ailleurs, *T. denticola* exprime des protéines Lrr A (leucines-rich repeat protein) et Msp (major sheath protein) qui sont impliquées dans la liaison de ce pathogène aux protéines de la matrice extracellulaire et aux cellules de l'hôte (Edwards et al., 2005; Ikegami et al., 2004). Il a été rapporté que le pouvoir pathogène de la bactérie *F. nucleatum* est lié en grande partie à sa capacité d'adhésion aux cellules eucaryotes. En effet *F. nucleatum* a une activité d'hémagglutination (Dehazya et Coles, 1980; Falkler et al., 1983) et adhère également aux cellules épithéliales, aux fibroblastes, aux neutrophiles polynucléaires ainsi qu'au collagène grâce à son LPS et aux protéines de sa membrane externe (lectines), en particulier la protéine FomA (Han et al., 2000; Ozaki et al., 1990; Xie et al., 1991).

Certaines espèces bactériennes s'attachent directement aux surfaces de l'hôte et permettent par la suite à d'autres espèces de s'y fixer. Ce phénomène est appelé la coaggrégation et permet à certaines bactéries d'agir comme pont entre les surfaces dentaires et des espèces non adhérentes. Plus spécifiquement, *F. nucleatum* participe à la coaggrégation entre divers parodontopathogènes incluant *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* et *T. denticola* (Bolstad et al., 1996; Han et al., 2000). Il a été démontré qu'une protéine de 39.5 kDa de la membrane externe de *F. nucleatum* est impliquée dans la coaggrégation (Kaufman et DiRienzo, 1989).

1.4.1.2 Formation du biofilm

L'adhérence des bactéries aux surfaces dentaires est à l'origine de la formation d'un biofilm. Ce biofilm est constitué de polysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques provenant des microorganismes qui le constituent. C'est une structure

dynamique dont l'évolution varie selon les conditions physicochimiques et le métabolisme bactérien. Il assure notamment une protection contre les mécanismes de défenses de l'hôte et les agents antimicrobiens et permet des interactions nutritionnelles efficaces entre les bactéries. Par exemple, les bactéries du genre *Veillonella* utilisent l'acide lactique excrété par les streptocoques comme source de carbone, ce qui mène à une production de vitamine K nécessaire à la croissance de certaines bactéries tel que *P. gingivalis*. Par ailleurs, d'autres types d'interactions bénéfiques sont favorisées à l'intérieur du biofilm. En effet, les bactéries anaérobies facultatives utilisent la faible quantité d'oxygène présente ce qui permet le développement de bactéries anaérobies strictes.

F. nucleatum joue un rôle majeur dans la formation du biofilm, il sert notamment de lien entre les colonisateurs précoces comme *S. sanguinis* et les colonisateurs tardifs pathogènes comme *P. gingivalis* et *A. actinomycetemcomitans* (Kolenbrander et al., 2006; Rosen et al., 2003). D'après les modèles de biofilm décrit dans la littérature, *P. gingivalis* est associé à *T. denticola* et *T. forsythia* formant ainsi le complexe rouge. Il est à souligner que ces espèces bactériennes étant regroupées sont plus virulentes que lorsqu'elles sont prises individuellement (Jenkinson et Lamont, 2005).

1.4.2 Facteurs impliqués dans l'évasion du système immunitaire

1.4.2.1 Internalisation dans les cellules de l'hôte

Suite à leur adhésion aux cellules épithéliales, les bactéries parodontopathogènes peuvent être internalisées. Cette internalisation leur permet de survivre à l'intérieur des cellules hôtes, de se multiplier et d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (Houalet-Jeanne et al., 2001). Des études récentes ont montré que *P. gingivalis* pouvait se propager d'une cellule épithéliale à une autre sans passer par l'espace extracellulaire (Yilmaz et al., 2006). Ce phénomène assurerait la dissémination de la bactérie dans le tissu conjonctif tout en lui permettant de se protéger de la réponse de l'hôte. Par ailleurs,

F. nucleatum a un pouvoir invasif aussi important que *P. gingivalis* (Han et al., 2000). L'internalisation de cette bactérie dans les cellules épithéliales nécessite des réarrangements des microfilaments d'actine. Il a également été montré que cette bactérie permet à des souches non invasives, telles que *Streptococcus cristatus*, de pénétrer dans les cellules épithéliales gingivales (Edwards et al., 2006).

1.4.2.2 Capsule bactérienne

La capsule polysaccharidique est reconnue comme un important facteur de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes. De nombreuses bactéries buccales ont une paroi recouverte d'une capsule, dont sa synthèse est modulée par des facteurs environnementaux. Elle constitue un facteur de virulence en permettant à la bactérie de résister à l'action de lysozyme présent dans la salive. Elle perturbe également la phagocytose en bloquant la fixation d'anticorps sur la bactérie, empêchant ainsi la reconnaissance par les macrophages (Brunner et al., 2010).

1.4.2.3 Récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines

Les récepteurs Fc des immunoglobulines jouent un rôle important dans l'immunité en fixant les composantes du complément et les neutrophiles polymorphonucléaires, qui vont être activés en libérant des radicaux libres afin de neutraliser les bactéries. De nombreuses espèces bactériennes, notamment *F. nucleatum*, fixent les fragments Fc des IgG, résultant en une inhibition de l'opsonisation par les neutrophiles polymorphonucléaires réduisant ainsi la phagocytose (Grenier et Michaud, 1994; Guo et al., 2000).

1.4.2.4 Dégradation de protéines de l'hôte

Plusieurs bactéries parodontopathogènes ont un fort pouvoir protéolytique qui participe à la perturbation des mécanismes de défense de l'hôte. L'activité protéolytique de *P. gingivalis* est reliée à trois cystéines protéases, appelées gingipaines RgpA, Rgp B et Kgp, qui sont selon plusieurs auteurs fortement associées à la virulence de cette bactérie (Imamura, 2003). Ces protéases ont la capacité de dégrader certains récepteurs membranaires, des cytokines proinflammatoires et des immunoglobulines (Imamura, 2003). Il a déjà été rapporté que des récepteurs cellulaires, comme le CD14 (récepteur de LPS) à la surface des macrophages, sont clivés sous l'action des gingipaines, altérant ainsi les réactions inflammatoires induites par le LPS (Duncan et al., 2004; Oleksy et al., 2002). La dégradation des immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) par les gingipaines de *P. gingivalis* permet aux bactéries d'échapper à l'opsonisation par les cellules phagocytaires et à l'action du système du complément (Grenier, 1992). De plus, les protéases de *P. gingivalis* dégradent certaines composantes de la cascade du complément, dont les protéines C3, C4, C5 et C5a (Grenier, 1992; Jagels et al., 1996). En dégradant ces dernières, *P. gingivalis* a la capacité de résister à l'effet bactéricide du complément. *P. gingivalis* a également le pouvoir de cliver les cytokines, dont l'IL-8 (Bodet et al., 2005). Cette dégradation a notamment pour conséquence d'inhiber le chimiotactisme des leucocytes au site d'infection.

1.4.2.5 Induction du phénomène d'apoptose

Certaines bactéries parodontopathogènes pourraient contribuer à l'induction de l'apoptose observée au cours de la parodontite. En effet, *P. gingivalis* et *F. nucleatum* ont la capacité d'induire l'apoptose chez les lymphocytes T (Geatch et al., 1999; Kaplan et al., 2005; Lee et al., 2004). Cette induction peut contribuer à la réduction du nombre de leucocytes dans la poche parodontale, favorisant ainsi la multiplication des bactéries et la progression des parodontites.

1.4.3 Facteurs impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire

Le LPS est une composante majeure de la membrane externe des bactéries à Gram-négatif et représente le principal antigène de surface à fort pouvoir d'immuno-stimulation (Dixon et Darveau, 2005). Cette endotoxine est formée de trois parties : i) le lipide A, enfoui dans la membrane externe et présentant la partie toxique, ii) le polysaccharide central qui est lié au lipide A, et iii) l'antigène O qui est une chaîne polysaccharidique courte s'étendant au-delà du polysaccharide central.

Le LPS joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies parodontales. Ces molécules libérées dans l'environnement par des parodontopathogènes comme *P. gingivalis* et *F. nucleatum* sont capables d'activer certaines cellules mucosales et immunitaires du parodonte (Bodet et al 2007). En effet, il a été montré que le LPS est un puissant inducteur de l'inflammation et de la résorption osseuse. Cette endotoxine a le pouvoir de moduler la réaction immunitaire en stimulant la sécrétion par les cellules de l'hôte (macrophages, fibroblastes, cellules épithéliales, etc...) d'IL-6, IL-8, IL-1 β et TNF- α . Ces cytokines ont un effet proinflammatoire et participent à la résorption osseuse (O'Brien- Simpson et al., 2004; Page, 1991; Wang et Ohura, 2002).

1.4.4 Facteurs impliqués dans la destruction tissulaire

La destruction des tissus parodontaux observée lors de la parodontite résulte d'un processus complexe qui fait intervenir des interactions hôtes-bactéries. Cette destruction s'opère selon deux mécanismes. Un mécanisme direct, impliquant une libération d'enzymes protéolytiques et de substances cytotoxiques par les microorganismes, et un mécanisme indirect, résultant d'une stimulation des cellules hôtes par les facteurs bactériens de virulence. La réponse immunitaire engendrée aboutit à la libération de cytokines pro-inflammatoires, de prostaglandines et de MMPs entraînant des mécanismes de dégradation tissulaire (Bodet et al., 2007; Ozmeric, 2004).

Des études ont démontré que l'Arg-gingipaine de *P. gingivalis* est capable de dégrader les protéines du tissu conjonctif, notamment le collagène de type I (Imamura, 2003). Ces protéases dégradent également les jonctions intercellulaires de cellules épithéliales gingivales affectant la perméabilité de la barrière épithéliale (Katz et al., 2000). Ceci provoque une désorganisation du tissu gingival et favorise la dissémination des bactéries dans les tissus profonds. Les gingipaines peuvent également cliver le syndécan-1 qui est exprimé à la surface des cellules épithéliales gingivales et qui est un récepteur de facteurs de croissance et de molécules impliquées dans l'adhésion de ces cellules à la matrice extracellulaire (Andrian et al., 2006b). De plus, *P. gingivalis* produit des enzymes telles que la phospholipase A et la phosphatase alcaline responsables de la dégradation de molécules non protéiques (Chardin et al., 2006). Cette bactérie excrète également des métabolites toxiques pour les cellules de l'hôte tels que l'ammoniac et les composés sulfurés volatils (Chardin et al., 2006).

Par ailleurs, il a été démontré *in vitro* que *F. nucleatum*, un parodontopathogène non protéolytique, peut acquérir une activité enzymatique protéolytique en liant le plasminogène de l'hôte. A la suite d'une activation du plasminogène par les activateurs de l'hôte ou des produits bactériens, la plasmine ainsi générée à la surface de *F. nucleatum* est capable de dégrader les composantes de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine) et activer les MMPs (Darenfed et al., 1999). De plus, *F. nucleatum* est capable de lier la forme latente de MMP-9 et de la convertir en MMP-9 active (Gendron et al., 2004). D'autres études ont montré que l'adhésion de *F. nucleatum* aux neutrophiles provoque leur agrégation. Cette interaction induit la libération de substances cytotoxiques telles que le lysozyme et les ions superoxydes contribuant ainsi à l'altération des tissus de l'hôte (Tuttle et al., 1992).

Certaines protéases bactériennes dégradent les inhibiteurs plasmatiques de protéinases comme l' α 1-protéinase (Gendron et al., 2004). De plus, *P. gingivalis* dégrade les TIMPs dont la fonction est de réguler l'activité des MMPs suite à leur activation. Cette dégradation pourrait ainsi favoriser une augmentation du niveau de MMPs actives

observées lors de parodontites et avoir un impact sur la destruction du ligament parodontal et la résorption osseuse alvéolaire (Reynolds et Meikle, 1997).

1.5 Système du complément

Le système du complément est l'un des éléments importants de la réaction immunitaire chez les mammifères (Walport, 2001). Trois fonctions essentielles lui ont été attribuées : i) défense contre l'infection, ii) élimination des complexes immuns, et iii) régulation physiologique de la réponse immune (Hajishengallis, 2010 ; Markiewski et Lambris, 2007). Le système du complément est composé d'une trentaine de protéines plasmatiques et membranaires (C1 à C9) synthétisées principalement au niveau du foie. Ces protéines sont présentes dans le plasma sous des formes inactives. En interagissant avec un facteur immunogène et les unes avec les autres, elles s'activent en une cascade de réactions hautement régulée pour accomplir différentes activités physiologiques. Cette activation est rapide et localisée et implique des mécanismes d'amplification efficaces et bien contrôlés. Une grande variété de protéines régulatrices du complément contribue à éviter son activation excessive.

1.5.1 Activation du complément

La majorité des composantes du complément sont des protéases qui deviennent actives à la suite d'un clivage protéolytique via une série de réactions enzymatiques. Trois voies d'activation du système du complément ont été décrites : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne (figure 1.4). Ces voies sont distinctes par leur élément déclencheur, mais elles convergent vers un point commun, soit le clivage de la protéine C3.

La voie classique est la première voie à avoir été découverte (Petersen et al., 2000). Elle est activée par des anticorps liés à leur antigène spécifique, quoique d'autres agents (pathogènes, corps apoptotiques) peuvent également initier la cascade d'activation

(Ehrlich 1999, Hughes-Jones et al 1994). La voie des lectines est la dernière voie à avoir été identifiée. Elle est déclenchée par la liaison de la protéine MBL (Mannose Binding Lectin) au mannose de certaines bactéries (Super et al., 1989). MBL est une protéine de la famille des collectines et est synthétisée en réponse aux cytokines produites par les macrophages activés par des bactéries pathogènes. MBL possède la capacité de reconnaître des facteurs bactériens de virulence, notamment le LPS, l'acide lipoteichoïque et les polysaccharides de la surface des levures. Enfin, la voie alterne constitue un système de défense non spécifique. Elle est activée directement par certains polysaccharides microbiens en absence d'anticorps (Chapitis et Lepow, 1976).

Quelle que soit la voie, l'activation du complément mène à la formation du complexe d'attaque membranaire, à la libération des anaphylatoxines et à la production d'opsonines (figure 1.5). En effet, chacune des voies implique une cascade de réactions enzymatiques, activée à la surface du pathogène, et aboutissant à la formation d'une protéine C3 convertase (Lambris, 1988; Schumaker et al., 1987).

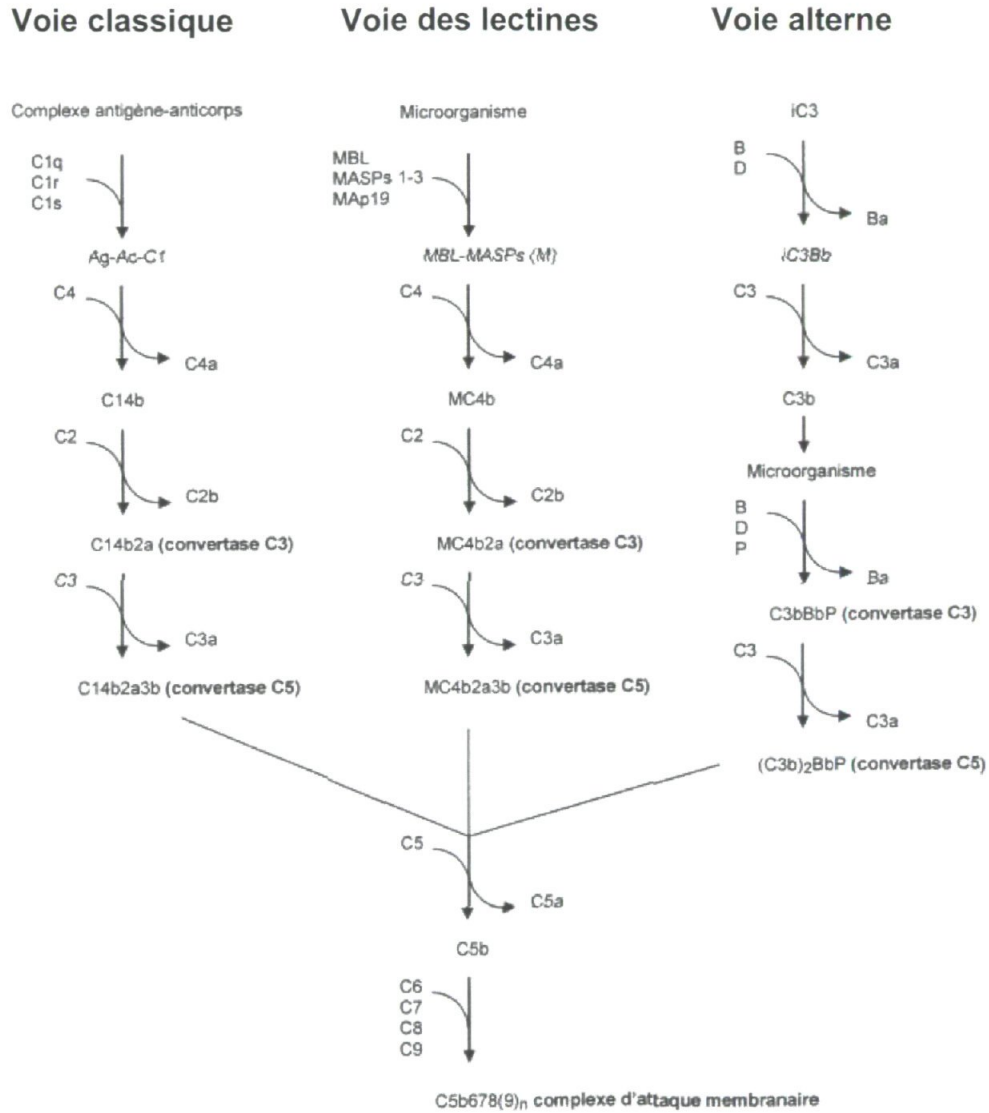


Figure 1.4. Voies d'activation du complément (Figure adaptée d'Eric Wagner., 2006).

Les convertases sont des sérines protéases qui ont pour rôle de convertir des protéines fonctionnellement inactives en protéines actives. Tel qu'illustré dans la figure 1.4, il existe deux types de convertases dans le système du complément : la C3 convertase et la C5 convertase. Leur action mène à la production de fragments actifs, responsables des activités physiologiques du complément. La C3 convertase est responsable du clivage de la composante C3 en C3a et C3b, éléments clés du système du complément. Le fragment C3b participe ensuite à la formation de la C5 convertase, laquelle est responsable du clivage de la protéine C5 en C5a et C5b. Un autre groupe de protéines plasmatiques (C6 à C9) s'assemblent à C5b aboutissant ainsi à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (MAC), responsable de la lyse des cellules cibles sur lesquelles la C3 convertase s'est formée (Kinoshita, 1988; Kinoshita et al., 1988).

1.5.1.1 Anaphylatoxines

Parmi les éléments générés lors de la cascade d'activation enzymatique du complément se retrouvent les anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a) (figure 1.5). Ces anaphylatoxines sont des fragments de petite taille qui servent de facteurs solubles pour maintenir l'état inflammatoire. Elles sont impliquées dans la perméabilité vasculaire, le chimiotactisme des neutrophiles au site d'infection et l'activation des cellules inflammatoires. De plus, elles jouent un rôle immunorégulateur, puisque C3a réduit la réponse immunitaire alors que C5a l'augmente (Vogt, 1986).

1.5.1.2 Opsonines

Lors du clivage de C3 et C4, les opsonines C3b et C4b sont formées et ont comme rôle de favoriser la phagocytose des antigènes liés à elles (Walport, 2001) (figure 1.5). Ces protéines capturent les antigènes, les complexes immuns et les organismes

pathogènes formant des vésicules intracellulaires. Par la suite, les cellules phagocytaires se lient aux opsonines, éliminant ainsi les éléments capturés dans les vésicules.

1.5.1.3 Complexe d'attaque membranaire (MAC)

Une fois le complexe C5b-8 formé, plusieurs protéines C9 viennent s'y fixer lui permettant de s'insérer dans la membrane plasmique de la cellule cible et menant à la formation de pores. Ceci permet le passage de molécules de faible poids moléculaire à travers la membrane. La stabilité osmotique de la cellule est ainsi perturbée et l'entrée d'eau dans la cellule par osmose fait augmenter son volume jusqu'à la lyse (figure 1.5) (Hughes et al., 2000; Rambach et al., 2008a; Rambach et al., 2008b).

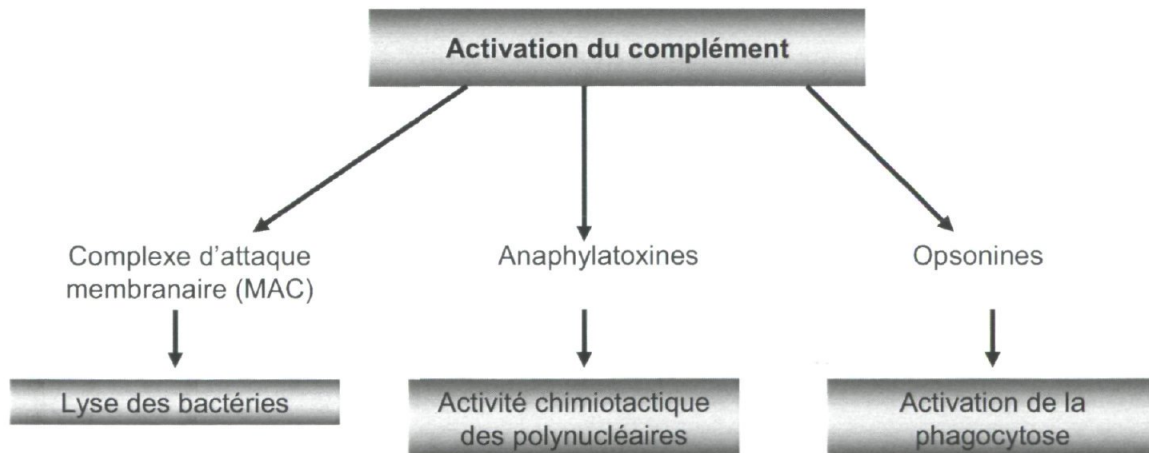


Figure 1.5. Rôle des composantes du système du complément.

1.5.2 Régulation du système du complément

Le système du complément joue de nombreuses fonctions biologiques, dont l'élimination des agents pathogènes, des cellules endommagées et des complexes immuns. Le mauvais fonctionnement ou l'hyperactivation du système du complément peut être à l'origine de diverses maladies inflammatoires et auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde (Okroj et al., 2007). Pour contrer ce phénomène, la régulation physiologique du complément s'avère indispensable et est effectuée selon les mécanismes suivants: i) une spécificité d'interactions protéine-protéine, ii) une courte durée de vie des fragments activés, et iii) l'existence de protéines régulatrices du complément hautement spécifiques (Kawano, 2000) (tableau 1.1).

1.5.2.1 Protéines régulatrices du système du complément

Étant donné la nature destructrice du système du complément, des contrôles stricts sont nécessaires pour éviter des dommages importants aux tissus de l'hôte. La régulation de l'activation du complément s'effectue principalement par des facteurs solubles présents dans le plasma, qui limitent l'activation spontanée de ses composantes. Ces protéines plasmatiques sont principalement la properdine (facteur P), le facteur H (FH), le facteur I et la protéine S (Heinen et al., 2009).

La properdine a pour fonction de stabiliser le complexe C3bBb par la liaison au C3b, ce qui augmente sa durée de vie, amplifiant ainsi l'activité de la convertase (Fearon et Austen, 1975). Le facteur H est un élément clé de la régulation de la C3 convertase de la voie alterne. Il inhibe la formation de la C3 convertase et accélère sa dissociation en agissant comme cofacteur du facteur I pour dégrader le C3b. Enfin, le complexe d'attaque membranaire C5b-9 a pour principal inhibiteur plasmatique la protéine S (vitronectine). Il s'agit d'une glycoprotéine qui se fixe sur le complexe lytique et l'empêche de s'insérer dans la membrane des cellules hôtes.

Par ailleurs, les régulateurs plasmatiques ne peuvent pas à eux seuls empêcher l'activation du complément, une fois que les composantes telles que C3b se sont attachées à la surface des cellules hôtes. Ces composantes activées du complément ont le pouvoir de détruire toutes les cellules sur lesquelles elles se fixent. Cependant, les cellules de l'hôte se protègent contre de pareils dommages en exprimant à leur surface des protéines régulatrices du complément (CRP pour « complement regulatory protein »). Ces protéines sont principalement le CD46, le CD55 et le CD59.

Tableau 1.1. Protéines régulatrices du complément.

Protéines régulatrices	Localisation	Fonction
C4BP (C4 Binding Protein)	Plasmatique	Dissocie la C3 convertase Cofacteur de facteur I
C1 INH (inhibiteur de C1)	Plasmatique	Dissocie le complexe C1
Properdine (facteur P)	Plasmatique	Stabilise les convertases
Facteur I	Plasmatique	Dégrade le C3b et C4b
Facteur H	Plasmatique	Dissocie la C3 convertase Cofacteur du facteur I
Protéine S (vitronectine)	Plasmatique	Empêche le MAC de se lier aux membranes
CR1	Membranaire	Dissocie la C3 convertase Cofacteur du facteur I
CD46 (MCP, Membrane Cofactor Protein)	Membranaire	Cofacteur de facteur I
CD55 (DAF, Decay Accelerating Factor)	Membranaire	Dissocie les convertases
CD59 (Protectine)	Membranaire	Inhibe la formation du MAC

1.5.2.1.1 CD46

CD46, également connu comme « membrane cofactor protein » (MCP), est une glycoprotéine transmembranaire d'environ 60 kDa exprimée à la surface de toutes les cellules humaines à l'exception des globules rouges (Cole et al., 1985; Yu et al., 1986). Elle est codée par un gène situé sur le bras long du chromosome 1 en position 1q3.2 dans un locus appelé RCA (Regulators of Complement Activation). La protéine CD46 présente une région transmembranaire avec un domaine cytoplasmique (figure 1.6). Son domaine extracellulaire est composé de séquences répétitives d'environ 60 acides aminés appelés SCR (Short Concensus Repeat). Ces domaines SCR sont présents en nombre variable chez les membres de la famille RCA. CD46 comprend quatre domaines SCR suivis de régions riches en sérine, thréonine et proline fortement glycosylées (STP A, B, C). Quatre isoformes de CD46 sont majoritairement générées lors de l'épissage alternatif des ARNm. Celles-ci diffèrent par le nombre de régions STP et par la nature de leur queue cytoplasmique (Liszewski et Atkinson, 1996; McNearney et al., 1989; Post et al., 1991).

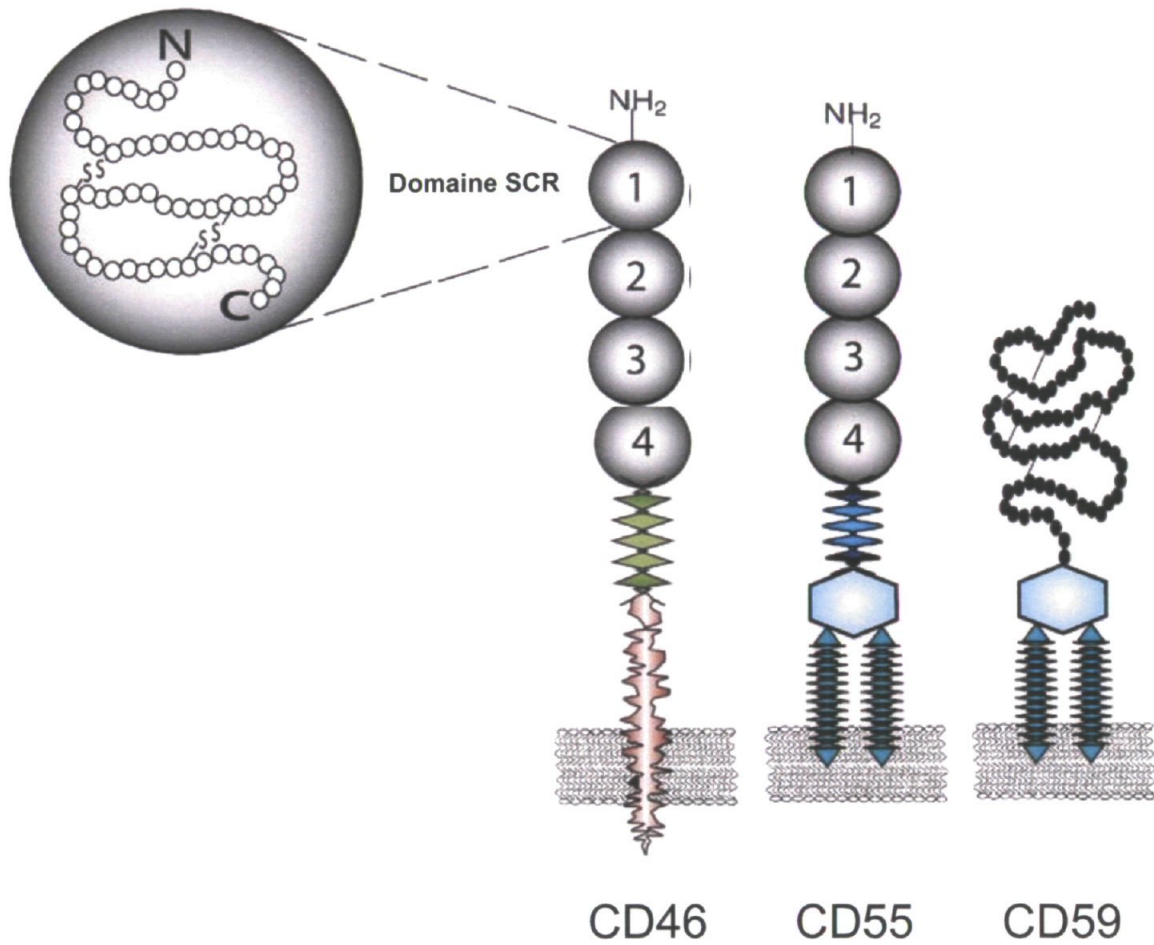


Figure 1.6. Structure des protéines régulatrices du complément (CRPs) (Figure adaptée de Kim et Song, 2006).

Les composantes actives du système du complément se déposent habituellement à la surface du pathogène. Par ailleurs, toute molécule active non liée à une membrane est rapidement dégradée au niveau du plasma par des protéines régulatrices solubles. Ceci prévient la fixation de ces molécules actives sur les cellules hôtes. Ainsi, la formation et l'activation de la C3 convertase sont normalement limitées à la surface du pathogène. Cependant, des composantes telles que C3b et C4b peuvent se déposer au niveau des cellules avoisinantes du pathogène. Les cellules hôtes peuvent donc constituer une cible à une attaque du complément autologue. Pour protéger les cellules hôtes, des protéines membres de la famille RCA interviennent afin d'empêcher l'action lytique du complément. Parmi ces protéines, le facteur I est capable d'interagir avec les molécules C3b et C4b. Il les clive en fragments inactifs, empêchant ainsi la formation de la C3 convertase à la surface des cellules de l'organisme (Barilla-LaBarca et al., 2002; Davis et Harrison, 1982). Cependant, l'inactivation de C3b et C4b par le facteur I nécessite la présence de certains cofacteurs membranaires, notamment la protéine CD46. En effet, le facteur I présente une faible affinité pour les composantes C3b et C4b. La liaison de CD46 aux molécules C3b et C4b augmente l'affinité du facteur I pour ces molécules (figure 1.7) et permet leur clivage en fragments inactifs. L'expression du CD46 à la surface des cellules hôtes assure donc une protection contre l'autolyse par le complément (Barilla-LaBarca et al., 2002).

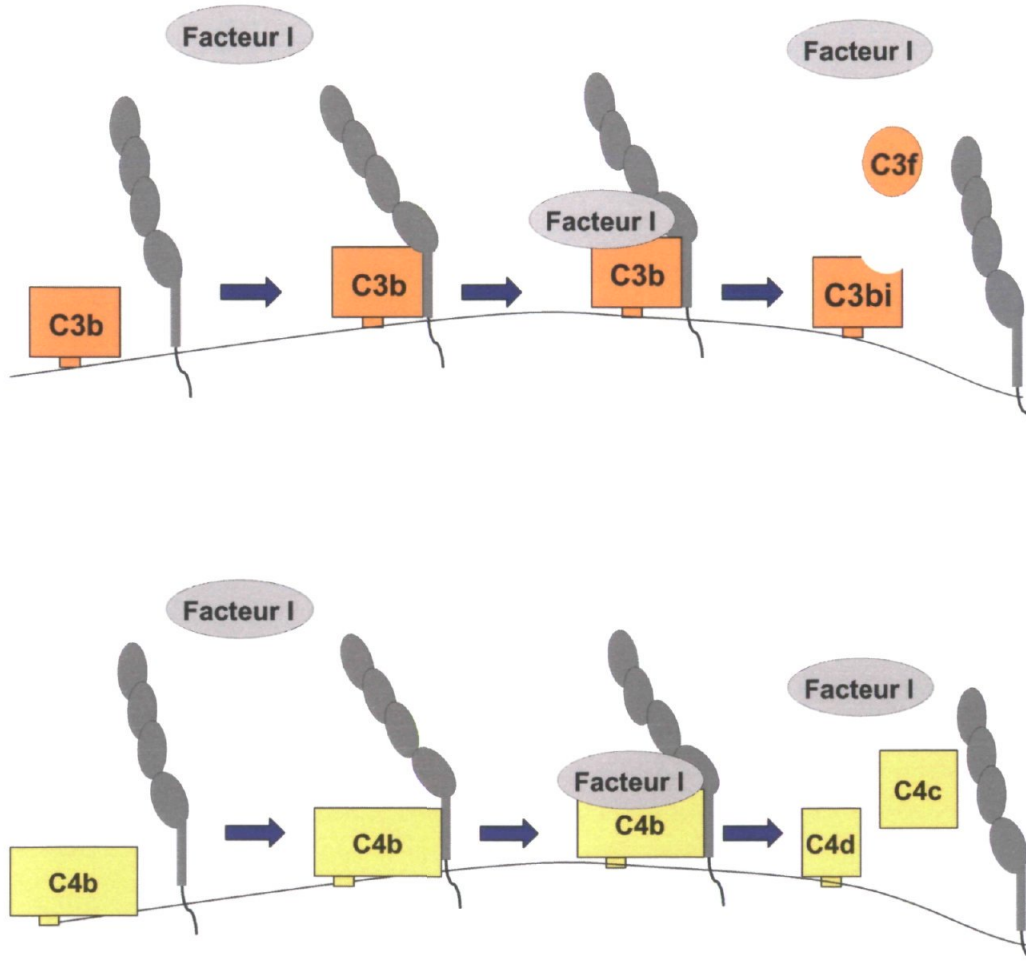


Figure 1.7. Mode d'action de CD46 (Membrane Cofactor Protein) (Figure adaptée de Riley-Vargas et al., 2004).

1.5.2.1.2 CD55

CD55, également appelé « decay accelerating factor » (DAF), est une protéine de 70 kDa exprimée par toutes les cellules de l'organisme, incluant les cellules épithéliales et les fibroblastes (Lindahl et al., 2000). La molécule CD55 présente une structure analogue à celle de CD46 (figure 1.6) et a comme rôle de compléter son action. Contrairement à CD46 qui possède un domaine transmembranaire, CD55 est ancrée dans la membrane par un glycosyl phosphatidyl inositol. La protéine CD55 appartient à la famille RCA au même titre que CD46 et joue un rôle important dans la régulation de la cascade d'activation du système du complément. En effet, CD55 est capable de rompre la liaison de la composante C3b avec le facteur B ou avec C4b2a, accélérant ainsi la dissociation de la C3 convertase. En inhibant l'activation de la C3 convertase par le CD55, l'activation de la cascade du complément par la voie alterne et par la voie classique est interrompue.

1.5.2.1.3 CD59

Il est bien connu que le clivage de C5 par une convertase permet la formation d'un complexe moléculaire C5b-9 très stable et capable de créer une désorganisation de la membrane lipidique du pathogène. Le complexe C5b-7, ayant une durée de vie d'environ 30 secondes, peut se fixer sur les membranes des cellules hôtes voisines du pathogène. Cependant, l'activité de ce complexe terminal de la cascade du complément sur les cellules de l'organisme est régulée par une protéine de la surface cellulaire soit CD59 (appelée aussi protectine). Il s'agit d'une glycoprotéine d'environ 20 kDa qui est exprimée par la plupart des cellules de l'organisme, notamment les cellules épithéliales. CD59 présente une structure non apparentée avec CD46 et CD55 et est ancrée dans la membrane par un glycosyl phosphatidyl inositol (figure 1.6). Contrairement à CD46 et CD55, la protéine CD59 est impliquée dans le contrôle des étapes tardives de la cascade d'activation du complément. En effet, elle se lie au complexe C5b-8 et empêche la

fixation et la polymérisation de la composante C9, laquelle est requise pour l'assemblage de complexe d'attaque membranaire et la formation des pores dans la membrane plasmique des cellules cibles (Rautemaa et Meri, 1996).

1.5.2.2 Interactions des protéines régulatrices du complément avec les microorganismes pathogènes

Il a déjà été rapporté que la molécule CD46 présente à la surface des cellules de mammifères sert de récepteur pour plusieurs pathogènes, dont le virus de la rougeole, *Streptococcus pyogenes* et *Neisseria gonorrhoeae* (Kallstrom et al., 2001; Okada et al., 1995; Tobiasson et Seifert, 2001). Les pathogènes ayant la capacité de fixer le CD46 peuvent ainsi échapper à la lyse par le complément. Un phénomène similaire a été rapporté pour la fixation du CD59 par certaines bactéries, notamment *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori* (Rautemaa et al., 1998; Rautemaa et al., 2001). Quelques études récentes ont rapporté que certaines bactéries, incluant *N. gonorrhoeae*, peuvent s'attacher aux cellules épithéliales et induire un largage du récepteur CD46 (Gill et al., 2003; Gill et al., 2005). Il a également été démontré qu'une toxine de *Loxosceles intermedia* est capable d'induire le détachement du CD46 de la surface des cellules hôtes (Van Den Berg *et al.*, 2002). Un phénomène de largage a aussi été observé pour CD55 et CD59, suite à un traitement de cellules épithéliales et des fibroblastes avec *Streptococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Serratia marcescens*. Il a été proposé que ce largage impliquerait certaines enzymes bactériennes, dont des phospholipases et des protéases (Cocuzzi et al., 2000). Le largage des CRP à partir de la surface des cellules hôtes pourrait les rendre susceptibles à l'action du complément.

1.6 Hypothèse et objectifs du projet de recherche

Les interactions entre les bactéries parodontopathogènes et les cellules de l'hôte représentent un facteur déterminant pour le déclenchement et la progression de la parodontite. Notre hypothèse de travail est que les bactéries parodontopathogènes

peuvent déjouer le système de défense de l'hôte et/ou contribuer au processus inflammatoire et à la destruction tissulaire en interagissant avec les protéines régulatrices du complément (CRPs) exprimées à la surface des cellules épithéliales qui les protègent de l'attaque du complément.

Afin de vérifier notre hypothèse, trois objectifs ont été définis :

1. Démontrer la capacité de *P. gingivalis* à induire le largage et la protéolyse de CD46 présente à la surface des cellules épithéliales;
2. Mettre en évidence et caractériser les interactions entre *F. nucleatum* et CD46;
3. Évaluer l'expression au niveau des gènes et des protéines des CRPs chez les cellules épithéliales stimulées par le LPS de parodontopathogènes et des cytokines pro-inflammatoires.

CHAPITRE 2

***Porphyromonas gingivalis* mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells**

2.1 Résumé

Les cellules humaines expriment à leur surface des protéines régulatrices du complément pour prévenir les dommages tissulaires médiés par une autolyse par le complément. L'hypothèse de l'étude est que *Porphyromonas gingivalis*, l'agent étiologique majeur de la parodontite chronique, induit le largage et/ou la protéolyse de CD46, une protéine régulatrice du complément exprimée par les cellules épithéliales. Les cellules épithéliales gingivales ont été traitées par une culture de *P. gingivalis* avant de mesurer la quantité de CD46 associée à ou larguée de la surface cellulaire par une méthode immunoenzymatique (ELISA). L'effet de la protéine soluble CD46 sur la sécrétion d'interleukine-8 (IL-8) par les cellules épithéliales a également été évalué par ELISA. La dégradation de la protéine recombinante CD46 soluble par les cellules et la Lys-gingipaine de *P. gingivalis* a été investiguée par SDS-PAGE/Western immunobuvardage. Les cellules épithéliales traitées par une culture de *P. gingivalis* ont

montré une faible réactivité en surface avec un anticorps anti-CD46. L'ELISA a révélé des taux croissants de CD46 dans le milieu après traitement, suggérant que *P. gingivalis* a causé le largage du CD46 membranaire. La stimulation des cellules épithéliales avec la protéine recombinante CD46 soluble a induit la sécrétion d'IL-8 d'une manière dose dépendante. Les cellules et la Lys-gingipaine purifiée de *P. gingivalis* ont dégradé la protéine recombinante CD46 d'une manière dose dépendante. Cette étude a montré la capacité de *P. gingivalis* à induire le largage et la protéolyse de CD46 présente à la surface des cellules épithéliales. Ceci pourrait rendre les cellules épithéliales susceptibles au système de complément et contribuer aux dommages tissulaires et au processus inflammatoire observés lors de parodontites.

2.2 Abstract

Introduction: Human cells express membrane-bound complement regulatory proteins to prevent complement-mediated autologous tissue damage. In this study, we hypothesized that *Porphyromonas gingivalis*, the major etiologic agent of chronic periodontitis, causes the shedding or proteolysis of the complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells.

Methods: Oral epithelial cells were treated with a culture of *P. gingivalis* prior to measure membrane-bound and shed CD46 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The effect of soluble recombinant CD46 on secretion of interleukin-8 (IL-8) by epithelial cells was evaluated by ELISA. The susceptibility of soluble recombinant CD46 to proteolytic degradation by cells and purified Lys-gingipain of *P. gingivalis* was investigated by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis.

Results: Oral epithelial cells treated with a culture of *P. gingivalis* showed a lower reactivity with antibodies directed to CD46. ELISA analysis revealed that such a treatment resulted in increased amounts of CD46 in the conditioned media suggesting that *P. gingivalis* caused the shedding of membrane-anchored CD46. Stimulation of

epithelial cells with soluble recombinant CD46 induced IL-8 secretion in a dose dependent manner. Whole cells and purified Lys-gingipain of *P. gingivalis* degraded recombinant CD46 in a dose-dependent manner.

Conclusion: This study showed the ability of *P. gingivalis* to induce the shedding/proteolysis of CD46 from the surface of oral epithelial cells. This may render host cells susceptible to the complement system and contribute to tissue damage and the inflammatory process in periodontitis.

2.3 Introduction

Periodontitis is an inflammatory disorder that results in the destruction of the supporting structures of the teeth, including the alveolar bone. It is the most important cause of tooth loss among adults and is initiated by an accumulation of predominantly anaerobic Gram-negative bacteria in subgingival sites. Among the various bacterial species associated with the development of periodontitis, *Porphyromonas gingivalis* is suspected to be one of the most important causative agents of the chronic form of this disease (29). *P. gingivalis* produces a broad spectrum of virulence factors, including outer membrane vesicles, adhesins, lipopolysaccharide (LPS), hemolysin and proteinases (5, 12). Arg- and Lys-gingipain cysteine proteinases are the main endopeptidases produced by *P. gingivalis* and are believed to contribute to host colonization, evasion of host defense mechanisms and destruction of periodontal tissues (14).

Bioactive molecules, which are linked to human cell membrane by anchor structures, can be released from the cell surface to become soluble effectors (3). Matrix metalloproteinases (MMPs) and a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs) are usually involved in the shedding process (3). Surface-bound bioactive molecules can also be shed and/or degraded following contact with microorganisms or their products. More specifically, the shedding of the ectodomain of syndecan-1, a transmembrane coreceptor for various growth factors and matrix macromolecules expressed by epithelial cells (4),

has been reported to be induced by several bacterial pathogens, including *P. gingivalis* (1, 2, 25, 26). The mechanisms involved are related to either activation of signaling pathways through contact with bacteria or direct action of bacterial proteinases.

To avoid autologous complement-mediated tissue injury, human cells express a number of membrane-bound complement regulatory proteins (22). The CD46 (MCP: membrane cofactor protein) complement regulator is highly expressed by epithelial cells (23) and consists of four complement control protein repeats, a serine/threonine/proline-rich region, a transmembrane domain, and two types of cytoplasmic tails (22). It functions early in the complement cascade to dissociate self-cell-bound C3 convertases and promote the cleavage of covalently bound C3b and C4b fragments upon which the convertases assemble (18, 22, 27). In this study, we hypothesized that *P. gingivalis* causes the shedding/proteolysis of the complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Bacteria and growth conditions

P. gingivalis HW24D-1 was grown in Todd Hewitt broth (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) supplemented with hemin (10 µg/ml) and vitamin K (1 µg/ml). Cultures were incubated in an anaerobic chamber (N₂-CO₂-H₂, 80:10:10) at 37°C.

2.4.2 Recombinant CD46 protein and antibodies

Soluble recombinant human CD46 was prepared as described previously (6). Rabbit anti-human CD46 polyclonal antibody (H-294) and mouse anti-human CD46 monoclonal antibody (MEM-258) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa

Cruz, CA, USA). Goat anti-rabbit IgG and goat anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase (HRP) were purchased from Sigma-Aldrich Co (Oakville, ON, Canada).

2.4.3 Cultivation of human oral epithelial cells and identification of CD46

The immortalized human oral epithelial cell line GSM-K, developed by V. Murrah (Department of Diagnostic Sciences and General Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, USA) was used (10). This cell line showed an epithelial phenotype by electron microscopy and immunohistochemistry analyses (10). Cells were maintained and cultured as monolayer in tissue culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4 mM L-glutamine (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (DMEM-FBS), and penicillin (100 µg/ml) - streptomycin (50 µg/ml) in an atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Epithelial cells were harvested by gentle trypsinization (0.05% trypsin-EDTA; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), washed once in DMEM-FBS, and suspended at a density of 4×10^4 cells per ml in DMEM with 10% heat-inactivated FBS, seeded in a 6-well plate (8×10^4 cells/well in 2 ml), and cultured until confluence at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The expression of CD46 by the GSM-K epithelial cell line was confirmed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)/Western immunoblotting analysis. Briefly, equal volumes of epithelial cell suspension (10^6 cells/ml) and denaturing buffer were mixed and boiled (10 min). Samples were loaded on a 12% polyacrylamide gel and subjected to electrophoresis under denaturing conditions (16). Proteins were then electrophoretically transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane. The membrane was successively incubated with PBST (50 mM phosphate-buffered saline, 0.1% Tween 20) containing 5% of fat-free milk (2 h), PBST containing 0.8% fat free milk and rabbit anti-CD46 antibody (1:1000) (16 h), and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:20000) (1 h). CD46 was visualized using the Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

2.4.4 Treatment of human oral epithelial cells with *P. gingivalis*

Oral epithelial cells grown to confluence were treated for 2 h (37°C) with an overnight culture of *P. gingivalis* diluted 1:2 in DMEM - 1% FBS. Thereafter, culture medium supernatants were collected, subjected to centrifugation (10000 g, 5 min), concentrated 10-fold by ultrafiltration (MWCO = 10 kDa) and stored at -20°C until use. Cells incubated in M199-FBS: Todd Hewitt Broth were used as controls.

2.4.5 Determination of residual membrane-anchored CD46 and shed CD46

Following treatment of epithelial cells with *P. gingivalis*, residual membrane-anchored CD46 on epithelial cells was determined by a cell-based ELISA assay. After removing supernatants, cell surface CD46 was detected using rabbit anti-CD46 antibody (1:200) and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:1000). The amount of shed CD46 in the 10-fold concentrated culture supernatant following treatment of oral epithelial cells with *P. gingivalis* was evaluated by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using rabbit anti-CD46 antibody (1:200) as capture antibody. Bound CD46 were then detected using mouse anti-CD46 monoclonal antibody (1:200) and HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000). All assays were performed in triplicate.

2.4.6 Treatment of epithelial cells with recombinant CD46 and interleukin-8 determination

Epithelial cells were treated with increasing concentrations of soluble recombinant CD46 (0, 300, 500 or 1000 ng/ml) and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 24 h. Culture medium supernatants were collected and stored at -20°C until use. Cells incubated in culture medium without CD46 or with CD46 in the presence of polymyxin B (10 µg/ml) were used as controls. A commercial ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to quantify interleukin-8 (IL-8) in the cell-free culture supernatants according to the manufacturer's protocols. Cytokine concentrations were determined in triplicate.

2.4.7 Purification of Lys-gingipain

Lys-gingipain was purified from the cell envelope extract of *P. gingivalis* KDP112 by affinity chromatography on arginine Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) as described previously (11). KDP112, an Arg-gingipain deficient mutant of *P. gingivalis* ATCC 33277, was kindly provided by K. Nakayama (Nagasaki University). Lys-gingipain activity was quantified by using N-p-tosyl-Gly-Pro-Lys-p-nitroanilide as substrate. One unit of enzyme activity was defined as the amount required to release 1 nM of p-nitroaniline per h.

2.4.8 Susceptibility of recombinant CD46 to degradation by *P. gingivalis* cells and purified Lys-gingipain

Degradation of soluble recombinant human CD46 (0.4 µg per 100 µl) by *P. gingivalis* was tested by adding increasing concentrations of bacteria (10^3 to 10^8 cells/ml) to 50 mM PBS containing 60 mM dithiothreitol. Samples were incubated at 37°C for 4 h and then boiled for 10 min. Degradation of CD46 by a preparation of Lys-gingipain was also tested by adding various amount of proteinase (0.25 to 8 milliunits/ml). Cleavage of CD46 was monitored by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis, as described above. The effect of 1 mM tosyl-Lys-chloromethylketone (TLCK) on degradation of recombinant CD46 by the Lys-gingipain preparation was evaluated.

2.5 Results

The expression of the complement regulatory protein CD46 by the GSM-K oral epithelial cell line was first evaluated. As shown in Figure 2.1, a major band with a molecular weight of approximately 60 kDa was detected in epithelial cell lysate using a specific antibody to CD46. Although much less important, a lower molecular weight band (52 kDa) was also detected.

Treatment of oral epithelial cells with an overnight culture of *P. gingivalis* decreased by approximately 80% the amount of membrane-anchored CD46 (Fig. 2.2). CD46 shedding from the cell surface of treated oral epithelial cells was investigated by ELISA. Basal levels of soluble CD46 were detected in the culture supernatants of untreated epithelial cells while a significant increase was observed in the culture supernatants of epithelial cells treated with *P. gingivalis* (Fig. 2.3). More specifically, soluble CD46 increased approximately 3.5-fold compared to basal levels.

Thereafter, the effect of stimulating epithelial cells with soluble recombinant human CD46 on the secretion of the chemokine IL-8 was investigated. Figure 2.4 reports that epithelial cells secrete basal levels ($42 \pm 4 \mu\text{g/ml}$) of IL-8. Stimulation of cells with recombinant CD46 induced IL-8 secretion in a dose dependent manner. When used at 1000 ng/ml, CD46 increased by 6-fold the amounts of IL-8 secreted. Adding polymyxin B during stimulation of epithelial cells with recombinant CD46 had no effect on IL-8 secretion indicating that the effect observed was not related to LPS contaminants (data not shown).

Recombinant human CD46 was tested for its susceptibility to proteolytic degradation by *P. gingivalis* cells following a 4-h incubation (Fig. 2.5A). The results clearly indicated that CD46 was highly sensitive to degradation since complete hydrolysis of the protein was observed after incubation with 10^6 bacteria/ml. Some degradation was also observed when CD46 was incubated with 10^4 bacteria/ml. The susceptibility of human CD46 to degradation by various concentrations of purified Lys-gingipain was also investigated (Fig. 2.5B). The purified Lys-gingipain was found to extensively degrade the CD46. This degradation was inhibited by adding 1 mM TLCK, an inhibitor of Lys-gingipain, in the assay mixture (data not shown).

2.6 Discussion

The complement system plays an important role in host defense. However, if not properly regulated, activated complement can cause significant damage to host tissues. To prevent complement-mediated autologous tissue damage, human cells express a number of membrane-bound complement regulatory proteins (22). CD46 is a widely distributed complement regulator which protects host cells from complement injury by acting as a cofactor for proteolytic inactivation of C3b and C4b by the serine protease factor I (18, 27). The cleavage of C3b produces the fragment C3bi whereas hydrolysis of C4b generates the fragments C4c and C4d, all of which are unable to support further complement activation. Our laboratory previously reported that *P. gingivalis* can mediate the shedding of important cell surface molecules: CD14 from human macrophages (7) and syndecan-1 from oral epithelial cells (1, 2). In this study, we investigated the ability of *P. gingivalis* to cause the shedding/proteolysis of the complement regulatory protein CD46 from the surface of oral epithelial cells.

The GMSM-K oral epithelial cell line used in this study was found to express CD46 as a major band at 60 kDa and a minor band at 52 kDa. This is consistent with a previous study reporting that up to four major CD46 isoforms (BC1, BC2, C1, C2), with molecular weight ranging from 51 to 68 kDa, may be expressed per cell type (17). The size difference can be attributed mainly to the variations in the amount of O-linked sugars on the isoforms.

Our results clearly showed that *P. gingivalis* mediates the shedding of membrane-anchored CD46 in epithelial cells. First, treated cells showed only residual membrane-anchored CD46 after such treatment. Second, the amount of soluble CD46 in the cell-free culture supernatant increased significantly following treatment. Surface CD46 decrease upon infection by *P. gingivalis* may render the cells more susceptible to lysis by complement, as previously demonstrated *in vitro* (8, 28). This is also supported by the fact that CD46 is naturally shed from the surface of apoptotic and necrotic cells, allowing their efficient removal by phagocytes (8).

Shed CD46 can have detrimental effects with regard to periodontal disease. We showed that soluble CD46 can induce IL-8 secretion by epithelial cells. IL-8 is a potent chemokine that directs the migration of polymorphonuclear leukocytes, monocytes and macrophages to the site of infection. Increased levels of IL-8 are found in the gingival crevicular fluid of inflamed periodontal sites compared with healthy sites (13, 21, 30). Periodontal therapy reduces immune cell numbers in the infiltrate and the levels of IL-8, suggesting a relationship between this chemokine and periodontal status (9). Once present in the extracellular environment in the soluble form, CD46 could also interact with microorganisms. The capacity of human bacterial pathogens to bind the complement regulatory protein CD46 on their cell surface may confer these microorganisms a capacity to resist serum killing. Although such a phenomenon has been previously reported for *Neisseria meningitidis* and group A streptococci (15, 19, 24), there are no data available regarding the capacity of oral pathogens to bind CD46 on their surface.

Gingipain cysteine proteinases of *P. gingivalis*, which are both secreted and cell-bound, may contribute to the pathogenic process of periodontitis by disrupting host defense mechanisms and degrading tissue components (14). These proteolytic enzymes may participate in the shedding and proteolysis of cell surface molecules. Our results clearly indicated the CD46 was highly sensitive to degradation by whole cells of *P. gingivalis*. Since the recombinant CD46 possesses thrice as many lysine residues as arginine residues in its amino acid sequence (7.8% and 2.5%, respectively) (20), we tested its susceptibility to purified Lys-gingipain. SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis showed that the Lys-gingipain preparation caused a complete degradation of CD46.

In conclusion, our study showed that infection of oral epithelial cells with *P. gingivalis* reduces membrane-anchored CD46, a phenomena that may render cells susceptible to the complement system. Shed CD46 may either trigger cell signaling pathways leading to secretion of IL-8 or be cleaved by Lys-gingipain produced by *P. gingivalis*.

2.7 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research. We thank Koji Nakayama (Nagasaki University) for providing the gingipain-deficient mutants KDP112 and Valerie Murrah (University of North Carolina at Chapel Hill) for providing the GSMK-K cell line.

2.8 References

1. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2006; **21**: 123-128.
2. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide induces shedding of syndecan-1 expressed by gingival epithelial cells. *J Cell Physiol* 2005; **204**: 178-183.
3. Arribas J, Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 2002; **102**: 4627-4638.
4. Carey DJ. Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors. *Biochem J* 1997; **327**: 1-16.
5. Cutler CW, Calmer JR, Genco CA. Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol* 1995; **3**: 45-51.
6. De Astorza B, Cortés G, Crespi C, Saus C, Rojo JM, Alberti S. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun* 2004; **72**: 1767-1774.
7. Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D. Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* 2004; **36**: 319-325.

8. Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 36342-36354.
9. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, Jorge O, Silva A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001; **36**: 194-203.
10. Gilchrist EP, Moyer MP, Shillitoe EJ, Clare N, Murrah VA. Establishment of a human polyclonal oral epithelial cell line. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 2000; **90**: 340-347.
11. Goulet V, Britigan B, Nakayama K, Grenier D. Cleavage of human transferrin by *Porphyromonas gingivalis* gingipains promotes growth and formation of hydroxyl radicals. *Infect. Immun.* 2004; **72**: 4351-4356.
12. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 1999; **20**: 168-238.
13. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Soder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002; **29**: 604-614.
14. Kadowaki T, Nakayama K, Okamoto K, Abe N, Baba A, Shi Y, Ratnayake DB, Yamamoto K. *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *J Biochem (Tokyo)* 2000; **128**: 153-159.
15. Källstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein

(MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 1997; **25**: 639-647.

16. Laemmli UK. Cleavage of a structural protein during the assemblage of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.

17. Liszewski MK, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. *J Immunol* 1996; **156**: 4415-4421.

18. Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991; **9**: 431-455.

19. Lövkvist L, Sjölander H, Wehelie R, Aro H, Norrby-Teglund A, Plant L, Jonsson AB. CD46 contributes to the severity of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 2008; **76**: 3951-3958.

20. Lublin DM, Liszewski MK, Post TW, Arce MA, Le Beau MM, Rebentisch MB, Lemons LS, Seya T, Atkinson JP. Molecular cloning and chromosomal localization of human membrane cofactor protein (MCP). Evidence for inclusion in the multigene family of complement-regulatory proteins. *J Exp Med* 1988; **168**: 181-194.

21. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996; **31**: 489-495.

22. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol* 2001; **1**: 445-459.

23. McNearney T, Ballard L, Seya T, Atkinson JP. Membrane cofactor protein of

complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J Clin Invest* 1989; **84**: 538-545.

24. Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *Streptococcus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 2489-2493.

25. Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin and beta-toxin. *J Biol Chem* 2004; **279**: 251-258.

26. Park PW, Pier GB, Preston MJ, Goldberger O, Fitzgerald ML, Bernfield M. Syndecan-1 shedding is enhanced by LasA, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 3057-3064.

27. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 2004; **25**: 496-503.

28. Schnorr JJ, Dunster LM, Namnan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 976-984.

29. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. *Periodontol* 2000 1999; **20**: 82-121.

30. Tsai CC, Ho YP, Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995; **66**: 852-859.

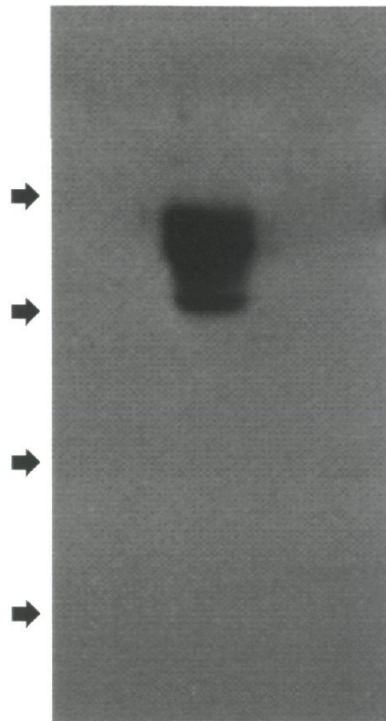


Figure 2.1. Identification of CD46 in lysate of oral epithelial cells GSMK-K by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis. Molecular weight markers were from top to bottom: bovine serum albumin (97.3 kDa), ovalbumin (50.4 kDa), carbonic anhydrase (37.2 kDa), and soybean trypsin inhibitor (29.2 kDa).

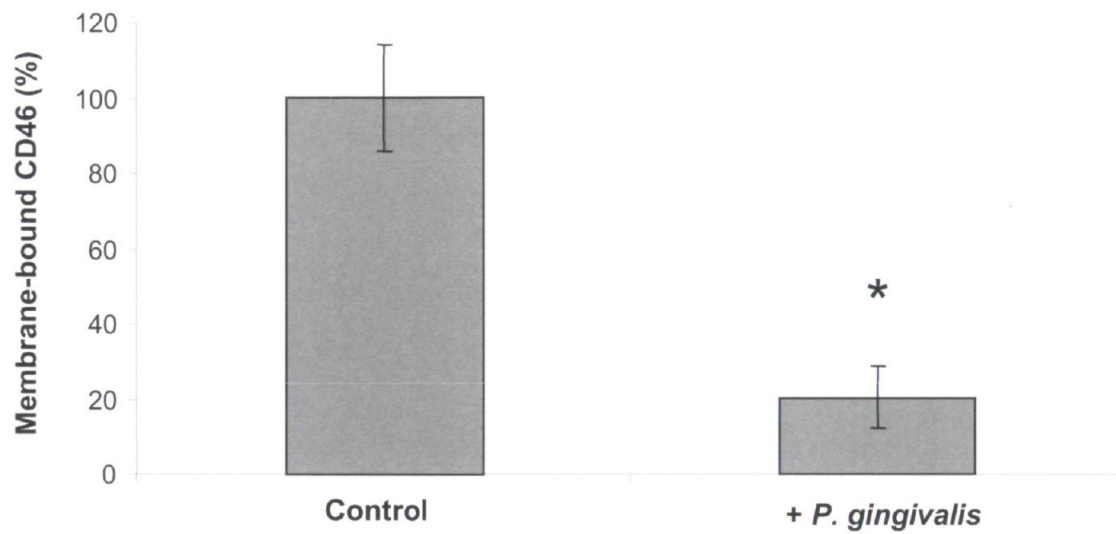


Figure 2.2. Determination of residual membrane-anchored CD46 on oral epithelial cells treated or not with an overnight culture of *P. gingivalis*. CD46 was determined by a cell-based ELISA. A value of 100% was assigned to untreated epithelial cells.

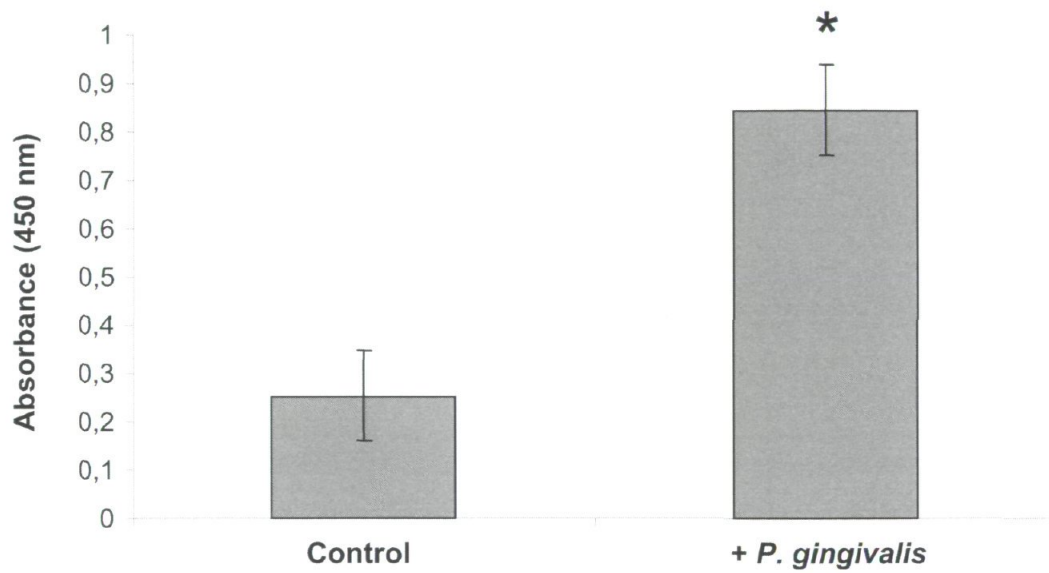


Figure 2.3. Determination of shed CD46 in the cell free culture supernatant (10-fold concentrated) of oral epithelial cells treated or not with an overnight culture of *P. gingivalis*. CD46 levels were determined by ELISA.

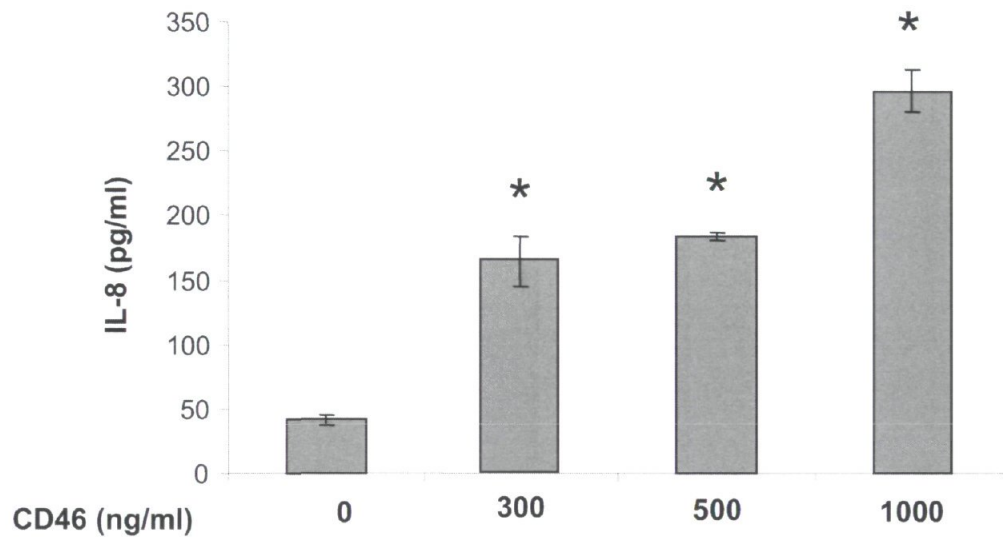


Figure 2.4. Secretion of IL-8 by epithelial cells stimulated with various amounts of soluble recombinant CD46. IL-8 concentrations in cell-free culture supernatants were determined by ELISA.

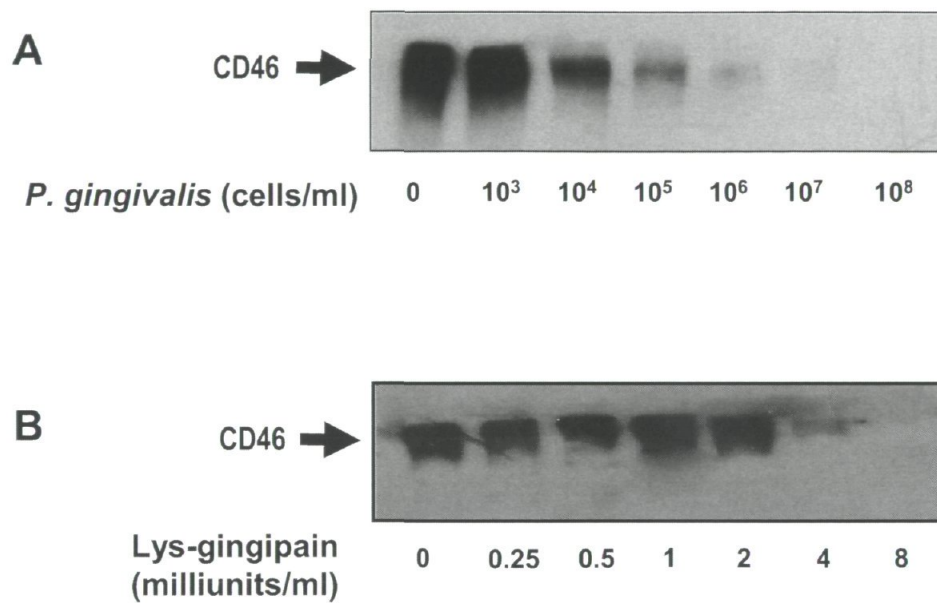


Figure 2.5. Degradation of recombinant human CD46 by cells (A) and purified Lys-gingipain (B) of *P. gingivalis*, as determined by SDS-PAGE/Western immunoblotting analysis.

CHAPITRE 3

***Fusobacterium nucleatum* binding to complement regulatory protein CD46 modulates the expression and secretion of cytokines and matrix metalloproteinases by oral epithelial cells**

3.1 Résumé

Les parodontites sont des maladies inflammatoires chroniques de nature infectieuse qui mènent à la destruction des tissus supportant la dent. Les cellules épithéliales gingivales sont une barrière mécanique importante qui participe à la réponse inflammatoire de l'hôte contre les bactéries parodontopathogènes. Le but de cette étude était d'investiguer la capacité de *Fusobacterium nucleatum* à lier la protéine régulatrice du complément CD46, exprimée par les cellules épithéliales, et de déterminer l'impact de cette liaison sur l'expression des gènes et la sécrétion des cytokines IL-6 et IL-8 et de la métalloprotéinase matricielle MMP-9 par les cellules épithéliales buccales. La liaison de la protéine humaine CD46 recombinante à la surface de *F. nucleatum* a été démontrée par immunobuvardage. Après la stimulation de cellules épithéliales par *F. nucleatum*, l'expression des gènes a été déterminée par RT-PCR et la sécrétion protéique a été mesurée par ELISA. Le traitement des bactéries par la chaleur ou une protéase a réduit la

liaison de CD46. *F. nucleatum* couvert de CD46 a induit le clivage de C3b en présence du Facteur I. La stimulation de cellules épithéliales avec *F. nucleatum* à une multiplicité d'infection de 50 a induit une augmentation significative de l'expression du gène et de la sécrétion de la protéine chez l'IL-6, l'IL-8 et la MMP-9. Cependant, un prétraitement des cellules épithéliales avec un anticorps polyclonal anti-CD46 a réduit la production d'IL-6, d'IL-8 et de MMP-9 en réponse à *F. nucleatum*. Aucun effet n'a été observé suite à un traitement des cellules épithéliales avec un anticorps non spécifique au CD46. Cette étude a démontré que *F. nucleatum* lie la protéine régulatrice du complément CD46. L'interaction de *F. nucleatum* avec CD46 de la surface des cellules épithéliales pourrait contribuer à augmenter les niveaux de médiateurs pro-inflammatoires et de MMPs dans les sites parodontaux modulant ainsi la destruction tissulaire.

3.2 Abstract

Background: Periodontitis is a chronic inflammatory disease that results in the destruction of the supporting tissues of the teeth. Gingival epithelial cells are an important mechanical barrier and participate in the host inflammatory response to periodontopathogens. The aim of the present study was to investigate the capacity of *Fusobacterium nucleatum* to bind to the complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells and to determine the impact of the binding on the gene expression and protein secretion of interleukin (IL)-6, IL-8, and matrix metalloproteinase (MMP) -9 by oral epithelial cells.

Methods: Binding of recombinant human CD46 to the surface of *F. nucleatum* was demonstrated by immunological assays. Following stimulation of oral epithelial cells with *F. nucleatum*, protein expression was determined by real-time polymerase chain reaction analysis while protein secretion was monitored by enzyme-linked immunosorbent assays.

Results: Heat and protease treatments of bacterial cells reduced CD46 binding. *F. nucleatum*-bound CD46 mediated the cleavage of C3b in the presence of factor I. Stimulating oral epithelial cells with *F. nucleatum* at a multiplicity of infection of 50 resulted in a significant up-regulation of the gene expression and protein secretion of IL-6, IL-8, and MMP-9 by oral epithelial cells. However, pre-treating the epithelial cells with an anti-CD46 polyclonal antibody attenuated the production of IL-6, IL-8, and MMP-9 in response to *F. nucleatum*. Such an inhibitory effect was not observed with non-specific antibodies.

Conclusions: The present study demonstrated that *F. nucleatum* can bind the complement regulatory protein CD46. The interaction of *F. nucleatum* with epithelial cell surface CD46 may contribute to increasing the levels of pro-inflammatory mediators and MMPs in periodontal sites and consequently modulate tissue destruction.

3.3 Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that results in the destruction of the supporting tissues of the teeth, including the periodontal ligament and alveolar bone. Gram-negative anaerobic bacteria have been associated with the different forms of periodontitis.¹ In response to these bacteria, mucosal and immune cells secrete various inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs), which can modulate periodontal tissue destruction.^{2,3} *Fusobacterium nucleatum* is known to increase in numbers at periodontitis sites.⁴ *F. nucleatum* adheres to several mammalian cell types and coaggregates with numerous oral bacterial species.^{5,6} In addition, this bacterial species possesses receptors for salivary and extracellular matrix proteins.^{7,8} It has been reported that *F. nucleatum* adheres to and invades oral epithelial cells.⁹ Moreover, oral epithelial cells challenged with *F. nucleatum* respond by producing high levels of cytokines, including interleukin-6 and interleukin-8.^{10,11}

The human complement system is a complex group of proteins, activated in a cascade, and is a key part of the immune response to invading pathogenic microorganisms. Some periodontopathogens have developed mechanisms to avoid the chemotactic, opsonic and lytic actions of the complement system. *Porphyromonas gingivalis*, an important etiologic agent of the chronic form of periodontitis, is known to produce cysteine proteases (called gingipains) that degrade complement factors C3 and C5.¹² Moreover, *Treponema denticola*, a spirochete often found in association with *P. gingivalis*, was recently reported to bind the complement regulatory protein factor H that facilitates the evasion of the alternative complement cascade.¹³

Inappropriate or excessive activation of the complement system may be deleterious for the host because this may directly and/or indirectly mediate inflammatory tissue destruction, as is the case in autoimmune diseases.¹⁴ To avoid autologous complement-mediated tissue injury, host cells express several membrane-bound complement regulatory proteins.¹⁵ The CD46 (membrane cofactor protein: MCP) complement regulator is a type I transmembrane glycoprotein highly expressed (four major isoforms) on the surface of almost every cell types, including epithelial cells.¹⁶ The extracellular portion of CD46 is made of four short consensus repeats, which contain C3b- and C4b-binding sites.¹⁷ CD46 is a cofactor for plasma serine protease factor I, which mediates the cleavage of C3b and C4b proteins.¹⁷ This process avoids the formation of the membrane attack complex and protects human cells from complement-mediated lysis. The capacity of some human bacterial pathogens, including *Streptococcus pyogenes* (group A streptococci) and pathogenic *Neisseria*, to express CD46 receptors on their surface has been reported previously.^{18,19} More specifically, the surface M protein of *S. pyogenes* binds to CD46 expressed by keratinocytes and mediates adherence and cell invasion.¹⁹ The adherence of *S. pyogenes* to keratinocytes was found to be significantly reduced by the down-regulation of CD46 expression by small interfering RNA.¹⁹ In the present study, we investigated the ability of *F. nucleatum* to interact with the complement regulatory protein CD46 and evaluated the impact of this binding on the gene expression and protein secretion of pro-inflammatory mediators and MMP-9 by oral epithelial cells.

3.4 Materials and methods

3.4.1 Bacteria and growth conditions

F. nucleatum ATCC 10953, ATCC 49256, ATCC 25586, 934, 691, and 102.3, as well as *Streptococcus gordonii* ATCC 10608 were used in this study. The cultures were grown anaerobically (80% N₂, 10% CO₂, 10% H₂) for 24 h at 37°C in Todd-Hewitt Broth (THB)[†] supplemented with 0.01% hemin and 0.001% vitamin K.

3.4.2 Preparation of recombinant CD46

The soluble recombinant human CD46 was generated as described previously.²⁰ Briefly, a 835-bp DNA fragment comprising the extracellular region of the MCP-C2 isoform was amplified by PCR. The product was cloned in pCR2.1-TOPO§ and the EcoRI-HindIII fragment was subcloned in the pET24b plasmid||. The His-tagged CD46 protein was produced in *Escherichia coli* BL-21, and extracted from inclusion bodies. To refold the recombinant CD46, the protein solution was diluted (1:1) with folding buffer 1 (4 M urea, 5 mM EDTA, 4 mM L-glutathione reduced, 0.4 mM L-glutathione oxidized, 100 mM, Tris/HCl, pH 8) and subjected to dialysis for 16 h against 500 ml of folding buffer 1. Thereafter, the sample was successively dialyzed against 500 ml of folding buffer 2 (2 M urea, 1 mM EDTA, 1 mM L-glutathione reduced, 0.1 mM L-glutathione oxidized, 100 mM, Tris/HCl, pH 8; 6-8 h), 500 ml of folding buffer 3 (1 M urea, 0.5 mM EDTA, 0.1 mM L-glutathione reduced, 0.01 mM L-glutathione oxidized, 50 mM Tris/HCl, pH 8; 6-8 h), 2 l of 2-fold PBS (50 mM phosphate-buffered saline pH 7.2; 2 h) and two final dialysis steps against 2 l of PBS (2 h). The protein solution was then centrifuged (30 min, 20,000 x g) and the supernatant filter-sterilized and analyzed for protein content and quality by sodium dodecyl sulfate – 10% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

3.4.3 Functional activity of soluble recombinant CD46

To determine whether the recombinant CD46 was functional, its ability to bind C3b was tested. Briefly, wells of a 96-well plate were coated with either human C3b^{||} or ovalbumin (10 µg/ml). Recombinant CD46 (10 µg/ml) was then added to wells and after washing with PBS, bound CD46 was detected using rabbit anti-human CD46 antibodies[¶], horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibodies[#], and HRP substrate[#].

3.4.4 Immuno-dot blot assay of CD46 binding

An immuno-dot blot assay was first used to determine CD46 binding activity of various strains of *F. nucleatum*. Briefly, bacterial cells were harvested from late log-phase cultures by centrifugation and suspended in PBS to an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 1. Recombinant CD46 protein was added to the bacterial suspensions at a final concentration of 0.4 µg/100 µl, and the mixtures were incubated for 1 h at 4°C. After rinsing three times with PBS, the cells were suspended in 100 µl PBS and 20 µl was applied on a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane using a Bio-Dot microfiltration apparatus^{**}. Various amounts of recombinant soluble CD46 were used as positive controls while cells of *S. gordonii* ATCC 10608 incubated with recombinant CD46 were used as negative control. The membrane was successively incubated with PBS + 0.1 % Tween 20 (PBST) containing 5% fat-free milk (2 h) and PBST containing 0.8% fat-free milk and monoclonal anti-CD46 antibody[¶] (1:200) (overnight). The membrane was then rinsed with PBST, incubated with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG[#] (1:1,000) for 1 h, and developed with Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus^{††}.

3.4.5 Cell-based enzyme-linked immunosorbent assay for CD46 binding

A cell-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to confirm and preliminary characterize the CD46 binding activity of *F. nucleatum*.

Bacterial cells were harvested by centrifugation and suspended to an OD₆₆₀ of 1, 0.5, and 0.25 in 50 mM carbonate buffer (pH 9.6). The bacterial suspensions (100 µl) were incubated for 2 h at room temperature in the wells of a 96-well plate to allow them to adhere to the plastic. Unbound bacterial cells were removed by rinsing and free sites were blocked using blocking buffer (PBS containing 0.5% gelatin and 0.1% Tween 20). The microplate was incubated for 60 min at room temperature. The blocking buffer was removed and 100 µl of PBS containing 400 ng of recombinant CD46 was added to each well, prior to further incubate the microplate for 2 h at room temperature. The use of PBS without CD46 served as a control. The unbound CD46 was removed and wells were washed twice prior to adding mouse anti-CD46 monoclonal antibody[¶] (1:200). After incubation for 60 min at room temperature, the unbound antibody was removed, and goat anti-mouse IgG antibody conjugated to HRP (1:1,000) was added. The microplate was incubated for an additional 60 min at room temperature. The wells were rinsed three times with washing buffer and 100 µl of a solution containing 0.2 M sodium phosphate (4.86 ml), 0.1 M citric acid (5.15 ml), 30% H₂O₂ (10 µl), and 1 mg tetramethylbenzidine was added to each well. The microplate was incubated for 20 min at room temperature, and 50 µl of 2 N H₂SO₄ was then added to stop the reaction. The absorbance at 550 nm (A₅₅₀) was recorded using a microplate reader. Non-specific interactions were also assessed in wells containing bacteria and mouse anti-CD46 antibody[¶] only. Various amounts of recombinant CD46 bound to wells were used as positive controls. The effect of various conditions or treatments on the binding of recombinant CD46 to *F. nucleatum* was investigated. More specifically, the effects of reactional pH during incubation of bacteria with CD46 was tested using the following buffers: citrate (pH 5), phosphate (pH 6 and 7), and Tris-HCl (pH 8). Bacteria were also heat-treated (60, 70, and 100°C for 30 min) or proteinase K-treated (500 µg/ml for 30 min) prior to be incubated in the presence of CD46.

3.4.6 C3b cleavage assay

The functional activity of CD46 once bound to *F. nucleatum* was assayed using a factor I-cofactor assay. Briefly, *F. nucleatum* (OD₆₆₀ = 1) was incubated with

recombinant human CD46 (10 µg/ml) for 2 h at 37°C. The bacteria were then washed twice and suspended in PBS. Human C3b^{||} (4.5 µg/ml) and human factor I^{††} (2.5 µg/ml) were added, and the mixture was incubated for 2 h at 37°C. Denaturing electrophoresis buffer was then added and the mixture was subjected to SDS-10% PAGE. Proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane, and C3b degradation products were visualized by a Western immunoblot procedure using goat anti-human C3b antibody^{††} (1:500) and AP-conjugated mouse anti-goat IgG antibody[†] (1:1,000). The positive control for C3b cleavage contained CD46, factor I, and C3b in the absence of *F. nucleatum*.

3.4.7 Cultivation of human oral epithelial cells

The immortalized human oral epithelial cell line GSM-K, which was developed by V. Murrah (Department of Diagnostic Sciences and General Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA) was used.²¹ This cell line has an epithelial phenotype based on electron microscopic and immunohistochemical analyses.²¹ The cells were maintained and cultured as monolayers in tissue culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4 mM L-glutamine^{§§}, 10% heat-inactivated fetal bovine serum (DMEM-FBS), and 100 µg/ml of penicillin-streptomycin in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The epithelial cells were harvested by gentle trypsinization (0.05% trypsin-EDTA), washed once with DMEM-FBS, suspended at a density of 0.5 x 10⁶ cells per ml in DMEM-FBS, seeded in a 6-well plate (10⁶ cells/well in 2 ml), and cultured overnight in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C to allow cell adhesion. The medium was then replaced by fresh DMEM supplemented with 1% heat-inactivated FBS prior to the epithelial cell treatments. In a previous report²², we showed that the GSM-K cell line possesses membrane-anchored CD46, which migrates as a major 60-kD band by SDS-PAGE.

3.4.8 Treatment of epithelial cells

Epithelial cells were stimulated (24 h) with *F. nucleatum* at a multiplicity of infection (MOI) of 50. Epithelial cells pre-treated for 2 h at 37°C with rabbit polyclonal anti-CD46 antibody (1:50) prior to stimulation with *F. nucleatum* were also prepared. Control epithelial cells pretreated with a non-specific rabbit serum (1:50) were also stimulated with *F. nucleatum*. Epithelial cells and supernatants were used to determine the mRNA expression and secretion of IL-6, IL-8, and MMP-9 as described below. The experiments were performed in triplicate for each condition.

3.4.9 Quantitative RT-PCR analysis of the expression of genes coding for IL-6, IL-8, and MMP-9

Total RNA was isolated from epithelial cells using RNeasy Plus Mini Kits^{||} according to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of RNA were assayed using the Experion system and RNA StdSens analysis kit^{**} according to the manufacturer's specifications. The reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR) was performed as follows. RNA from each sample (1 µg) was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) using Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase^{¶¶} and random hexamers^{##}. Reverse transcription conditions were 10 min at 65°C, 1 h at 37°C, and 10 min at 65°C. The amounts of mRNA transcripts were determined using the Bio-Rad CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories). Reactions were prepared with 25 µl of PCR mixture containing 12.5 µl of iQ SYBR Green Supermix^{**}, 5 µl of cDNA sample, 0.5 µl of gene-specific primers (IL-6, IL-8, MMP-9; final concentration of 250 nM), and 7 µl of RNase- and DNase-free water. The sequences of the primers[§] used for the real-time PCR are listed in Table 3.1. The samples were processed with a Bio-Rad MyCycler[™] Thermal Cycler^{**}. The amplification conditions for IL-6 and IL-8 were 95°C for 10 min followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 1 cycle at 60°C for 1 min. The amplification conditions for MMP-9 were 95°C for 3 min, followed by 35 cycles at 95°C for 15 s and 1 cycle at 60°C for 1 min. To validate the specificity of each primer pair, melting temperature curve analyses

were done. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an internal control. All real-time RT-PCR were performed in triplicate.

3.4.10 Determination of IL-6, IL-8 and MMP-9 production

Commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits^{***} were used to quantify IL-6, IL-8, and MMP-9 concentrations in the cell-free culture supernatants according to the manufacturer's protocols. Each sample from the three stimulatory assays was tested in triplicate. The optical density at 450 nm was read using a microplate reader with the wavelength correction set at 550 nm. The sensitivities of the kits were 9.3 pg/ml for IL-6, and 31.2 pg/ml for IL-8 and MMP-9.

3.4.11 Statistical analysis

Differences between means were analyzed for statistical significance using the Student's t-test and were considered significant at $p < 0.05$.

3.5 Results

The purified recombinant soluble CD46 protein stained by Coomassie blue migrated as a major band of apparent molecular mass of 33-35 kDa on a 10% polyacrylamide gel under non-reducing conditions (Figure 3.1A). This band comprised more than 90% of the refolded protein, as determined by a densitometric analysis. Besides, the protein was functional, as assessed by its specific binding to purified C3b in an ELISA assay (Figure 3.1B).

In a preliminary screening assay using the immuno-dot blot assay, *F. nucleatum* ATCC 49256 was shown to bind recombinant human CD46 (Figure 3.2). By applying different amounts of CD46, the immuno-dot blot assay made it possible to semi-

quantitatively determine the quantity of CD46 bound to *F. nucleatum* (between 7.5 and 15 ng). Figure 3.2 also shows that *S. gordonii*, which was used as a negative control, did not bind CD46 suggesting the specificity of the interactions between CD46 and *F. nucleatum*. Additional strains of *F. nucleatum* (ATCC 10953, ATCC 25586, 934, 691, 102.3) were also found to bind CD46 (data not shown). The ability of *F. nucleatum* ATCC 49256 to bind CD46 was further characterized using a cell-based ELISA assay. Figure 3.3 shows that the amount of CD46 bound to *F. nucleatum* depended on the number of bacterial cells coating the microplate wells. Under our assay conditions, coating the wells with a bacterial suspension adjusted to an OD₆₆₀ of 0.5 resulted in the binding of approximately 15 ng of CD46. The cell-based ELISA assay was used to investigate the effects of several treatments or conditions on the binding of CD46 to *F. nucleatum*. CD46 binding occurred from pH 6 to 8, although binding was slightly lower (80% relative to pH 7) at pH 8. Lastly, CD46 binding activity was reduced by 96% and 40% (relative to untreated) following heat and protease treatments, respectively.

The functional activity of *F. nucleatum*-bound CD46 was tested using a factor I-cofactor assay. Both C3b and factor I were added to bacterial cells pre-incubated with recombinant CD46 and after incubation, C3b degradation products were identified by SDS-PAGE/Western immunoblotting. Figure 3.4 shows the cofactor activity of bound CD46 by the appearance of the 68-kDa cleavage product. The same band was generated in the positive control, which contained soluble CD46, factor I and C3b. In contrast, no C3b cleavage was observed when *F. nucleatum* cells were not pre-treated with CD46 prior to adding factor I and C3b.

We next looked at whether the interaction between CD46 and *F. nucleatum* could modulate pro-inflammatory cytokine production by oral epithelial cells. Treating epithelial cells with *F. nucleatum* at an MOI of 50 increased the level of IL-6 mRNA expression approximately 3.5-fold compared to the unstimulated control cells (Figure 3.5A). However, IL-6 mRNA levels decreased significantly in epithelial cells pre-treated with anti-CD46 antibody and then stimulated with *F. nucleatum*. Non-specific antibodies (rabbit serum) did not affect *F. nucleatum*-induced IL-6 mRNA expression. The

inhibitory effect of anti-CD46 antibody on the *F. nucleatum*-induced IL-6 response in oral epithelial cells was confirmed at the protein level by ELISA analysis. As shown in Figure 3.5B, stimulation of epithelial cells with *F. nucleatum* increased IL-6 levels approximately 12-fold relative to the basal level measured in unstimulated control cells. As observed with the mRNA expression, pre-treating the epithelial cells with anti-CD46 antibody attenuated the increase in the secretion of IL-6 following *F. nucleatum* stimulation.

Treating the epithelial cells with *F. nucleatum* (MOI = 50) increased IL-8 mRNA expression 7-fold and protein secretion 70-fold compared to the unstimulated control cells (Figure 3.6). As observed with IL-6, IL-8 mRNA expression and protein secretion decreased significantly when the epithelial cells were pre-treated with anti-CD46 antibody prior to the stimulation with *F. nucleatum* (Figure 3.6). This inhibitory effect was not observed when the epithelial cells were pre-treated with a non-specific rabbit serum instead of anti-CD46 antibodies.

Lastly, we looked at whether the interaction between CD46 and *F. nucleatum* modulated the secretion of MMP-9 by epithelial cells. Figure 3.7A shows that stimulating oral epithelial cells with *F. nucleatum* (MOI = 50) increased the level of MMP-9 mRNA expression 18-fold relative to the unstimulated control cells while pre-treating the epithelial cells with anti-CD46 antibody prior to stimulating them with *F. nucleatum* significantly attenuated this increase in MMP-9 mRNA expression. The importance of epithelial cell surface CD46 in *F. nucleatum*-mediated MMP-9 production was confirmed at the protein level by ELISA (Figure 3.7B). Stimulating oral epithelial cells with *F. nucleatum* increased MMP-9 secretion, while pre-treating the oral epithelial cells with anti-CD46 antibody resulted in a decrease in MMP-9 secretion by epithelial cells stimulated by *F. nucleatum*.

3.6 Discussion

The complement system is a complex group of soluble proteins and plays a major role in host immune defenses against bacterial pathogens. Complement activation occurs in the subgingival sites of periodontitis patients²³ and appears to involve both the classical and alternative complement pathways given that C4a, C3b, and C5a have been found in gingival crevicular fluid.²⁴ Excessive activation of the complement system may be deleterious for the host by directly and indirectly mediating inflammatory tissue destruction. To prevent complement-mediated autologous tissue damage, human cells express a number of membrane-bound complement regulatory proteins.¹⁵ CD46, a major protective complement regulator expressed by all human cells with the exception of erythrocytes, binds C3b and C4b, thus inhibiting the lysis of host cells.^{25,26} In a previous study, we reported the capacity of *P. gingivalis* to mediate the shedding of CD46 from the epithelial cell surface and to cause its subsequent proteolysis.²² This may render epithelial cells susceptible to complement attack and contribute to tissue destruction observed during periodontitis. In the present study, we hypothesized that some periodontopathogens possess receptors for CD46 and may interact via this complement regulatory protein to induce inflammatory mediator secretion in oral epithelial cells.

We first showed that *F. nucleatum* can bind recombinant human CD46. This binding appeared to be specific since it was not observed with *S. gordonii*. On the basis of heat sensitivity and susceptibility to proteinase K, the receptor for CD46 on *F. nucleatum* may contain a proteinaceous moiety. The biological relevance of CD46 binding by *F. nucleatum* was investigated by assaying C3b cleavage. Since we showed that surface-bound CD46 can contribute to C3b cleavage, this suggests a novel mechanism by which *F. nucleatum* can evade the complement system in subgingival sites. Interestingly, Lovkvist *et al.*²⁷ showed that the binding of soluble CD46 to group A streptococci increased the resistance of the bacteria in a human whole blood model. The CD46 receptor expressed by group A streptococci was also found to be actively involved in the capacity of these bacteria to invade epithelial cells.¹⁹ Since the invasion of epithelial cells by *F. nucleatum* has been previously reported⁹, the possible involvement

of the interaction between CD46 and *F. nucleatum* in the invasive process is worth to be investigated.

Epithelial cells are a major physical barrier to periodontopathogens.²⁸ They form an integral part of the innate immune system and participate in the inflammatory response of gingival tissues.²⁹ Previous studies have shown that periodontopathogens can induce the production of proinflammatory cytokines by oral epithelial cells.³⁰ In the present study, we showed that *F. nucleatum* up-regulates the gene expression and protein secretion of IL-6 and IL-8 by epithelial cells. IL-6 participates in the recruitment of leukocytes to sites of inflammation.³¹ Interestingly, it has been reported that IL-6 levels are higher in diseased periodontal sites than in healthy ones.³² IL-8 directs the migration of neutrophils, monocytes to sites of infections. It was also demonstrated that IL-8 levels are higher in inflamed periodontal sites than in healthy ones.³³⁻³⁵ Our study suggests that part of the IL-6 and IL-8 secretion involves an interaction of *F. nucleatum* with epithelial cell surface CD46, since treating epithelial cells with an anti-CD46 antibody prevented this response, while non-specific antibodies had no such an inhibitory effect. To our knowledge, this is the first report that provides evidence for the involvement of oral epithelial cell surface CD46 in the inflammatory response to bacteria. In a previous study, Ghali and Schneider-Schaulier reported that interactions of measles virus with CD46 was associated with IL-6 production by astrocytoma cells.³⁶ The involvement of CD59, another complement regulatory protein, in LPS signal transduction in oral keratinocytes has been reported by Yamamoto *et al.*³⁷ Using an approach similar to ours, they showed that keratinocytes pretreated with an anti-CD59 antibody lost their ability to bind LPS and to secrete IL-6, TNF- α , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) following LPS stimulation.³⁷

We also observed that *F. nucleatum* increased MMP-9 gene expression and protein secretion by oral epithelial cells. As with IL-6 and IL-8, treating epithelial cells with an anti-CD46 antibody resulted in a significant decrease in MMP-9 production, suggesting that the interaction between CD46 and *F. nucleatum* plays an important role in periodontal tissue destruction. MMP-9 cleaves extracellular matrix macromolecules,

including collagen and fibronectin, and higher levels are found in the gingival crevicular fluid and gingival tissue of patients with periodontitis.³⁸ Previous studies have shown that MMP expression is regulated by variety of factors, including cytokines.³⁹ Inflammatory cytokines appear to increase MMP secretion by human gingival cells.³⁹ Interestingly, our study showed that the MMP-9 expression and secretion by epithelial cells following a *F. nucleatum* challenge are associated with IL-6 and IL-8 secretion.

In summary, we showed that *F. nucleatum* possesses the capacity to bind human CD46, a property that may help the bacteria to resist the complement system. In addition, this property may provide the capacity of the bacteria to migrate from periodontal sites and cause focal infections elsewhere, as has been suggested by several studies.^{40,41} *F. nucleatum* induced IL-6, IL-8, and MMP-9 gene expression and protein secretion by epithelial cells through interactions with cell surface CD46. This indicates that *F. nucleatum* may play an important role in promoting tissue destruction during periodontitis.

3.7 Footnotes

- ‡ BBL Microbiology systems, Cockeysville, MD.
- § Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA.
- || EMD Chemicals, Gibbstown, NJ.
- ¶ Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA.
- # Sigma-Aldrich Canada Ltd, Ontario, Canada.
- ** Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada
- †† Perkin Elmer, Waltham, MA.
- ‡‡ Quidel Corporation, San Diego, CA.
- §§ HyClone Laboratories, Logan, UT.
- ||| Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada
- ¶¶ Invitrogen Life Technologies, Mississauga, Ontario, Canada
- ## Amersham Pharmacia Biotech Inc., Baie d’Urfé, Québec, Canada
- *** R&D Systems, Minneapolis, MN.

3.8 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Canada) and the Instituto de Salud Carlos III (Spain). We wish to thank M. Rouabhia (Laval University) and S. Curt (Laval University) for their expert technical assistance.

3.9 References

1. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111
2. Graves D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 2008;79:1585-1591
3. Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306-321
4. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD and Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000;27:648-657
5. Kolenbrander PE, Andersen RN and Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun* 1989;57:3194-3203
6. Ozaki M, Miyake Y, Shirakawa M, Takemoto T, Okamoto H and Suginaka H. Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. *J Periodontal Res* 1990;25:129-134

7. Winkler JR, John SR, Kramer RH, Hoover CI and Murray PA. Attachment of oral bacteria to a basement-membrane-like matrix and to purified matrix proteins. *Infect Immun* 1987;55:2721-2726
8. Xie Z, Singh M and Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *J Biol Chem* 2004;279:39513-39519
9. Han YW, Shi W, Huang GT, et al. Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* 2000;68:3140-3146
10. Kang MS, Jang HS, Oh JS, et al. Effects of methyl gallate and gallic acid on the production of inflammatory mediators interleukin-6 and interleukin-8 by oral epithelial cells stimulated with *Fusobacterium nucleatum*. *J Microbiol* 2009;47:760-767
11. Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC and Kinane DF. Epithelial cell pro-inflammatory cytokine response differs across dental plaque bacterial species. *J Clin Periodontol* 2010;37:24-29
12. Slaney JM, Curtis MA. Mechanisms of evasion of complement by *Porphyromonas gingivalis*. *Front Biosci* 2008;13:188-196
13. McDowell JV, Huang B, Fenno C, Marconi RT. Analysis of a unique interaction between the complement regulatory protein factor H and the periodontal pathogen *Treponema denticola*. *Infect Immun* 2009;77:1417-1425
14. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* 2009;9:729-740

15. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol* 2001;1:445-459
16. McNearney T, Ballard L, Seya T and Atkinson JP. Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J Clin Invest* 1989;84:538-545
17. Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D and Atkinson JP. Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol* 2002;168:6298-6304
18. Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP and Jonsson AB. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol* 2001;3:133-143
19. Rezcallah MS, Hodges K, Gill DB, Atkinson JP, Wang B and Cleary PP. Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005;7:645-653
20. de Astorza B, Cortes G, Crespi C, Saus C, Rojo JM and Alberti S. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells. *Infect Immun* 2004;72:1767-1774
21. Gilchrist EP, Moyer MP, Shillitoe EJ, Clare N and Murrah VA. Establishment of a human polyclonal oral epithelial cell line. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:340-347
22. Mahtout H, Chandad F, Rojo JM and Grenier D. *Porphyromonas gingivalis* mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:396-400

23. Ebersole JL. Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000* 2003;31:135-166
24. Schenkein HA, Genco RJ. Gingival fluid and serum in periodontal diseases. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (factor B) and C4 in gingival fluid. *J Periodontol* 1977;48:778-784
25. Liszewski MK, Post TW and Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol* 1991;9:431-455
26. Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK and Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 2004;25:496-503
27. Lovkvist L, Sjolinder H, Wehelie R, et al. CD46 Contributes to the severity of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 2008;76:3951-3958
28. Kagnoff MF, Eckmann L. Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 1997;100:6-10
29. Dale BA. Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 2002;30:70-78
30. Milward MR, Chapple IL, Wright HJ, Millard JL, Matthews JB and Cooper PR. Differential activation of NF-kappaB and gene expression in oral epithelial cells by periodontal pathogens. *Clin Exp Immunol* 2007;148:307-324
31. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-325

32. Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, et al. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 1994;65:147-153
33. Jin LJ, Leung WK, Corbet EF and Soder B. Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29:604-614
34. Mathur A, Michalowicz B, Castillo M and Aepli D. Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 1996;31:489-495
35. Tsai CC, Ho YP and Chen CC. Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66:852-859
36. Ghali M, Schneider-Schaulies J. Receptor (CD46)- and replication-mediated interleukin-6 induction by measles virus in human astrocytoma cells. *J Neurovirol* 1998;4:521-530
37. Yamamoto T, Nakane T, Doi S, Osaki T. Lipopolysaccharide signal transduction in oral keratinocytes - involvement of CD59 but not CD14. *Cell Signal* 2003;15:861-869
38. Westerlund U, Ingman T, Lukinmaa PL, et al. Human neutrophil gelatinase and associated lipocalin in adult and localized juvenile periodontitis. *J Dent Res* 1996;75:1553-1563
39. Mauviel A. Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J Cell Biochem* 1993;53:288-295
40. Hill GB. Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Ann Periodontol* 1998;3:222-232

41. Romero R, Mazor M, Morrotti R, et al. Infection and labor. VII. Microbial invasion of the amniotic cavity in spontaneous rupture of membranes at term. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:129-133

Tableau 3.1. Primers used for the quantitative RT-PCR analysis.

Gene		Sequence (5'-3')
IL-6	F	TCTCCACAAGCGCCTTCG
	R	CTCAGGGCTGAGATGCCG
IL-8	F	ATGACTTCCAAGCTGGCC
	R	CAAGAGAGCCACGGCCAG
MMP-9	F	TTGACAGCGACAAGAAGTGG
	R	CCCTCAGTGAAGCGGTACAT
GAPDH	F	GGTATCGTCGAAGGACTCATG
	R	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTC

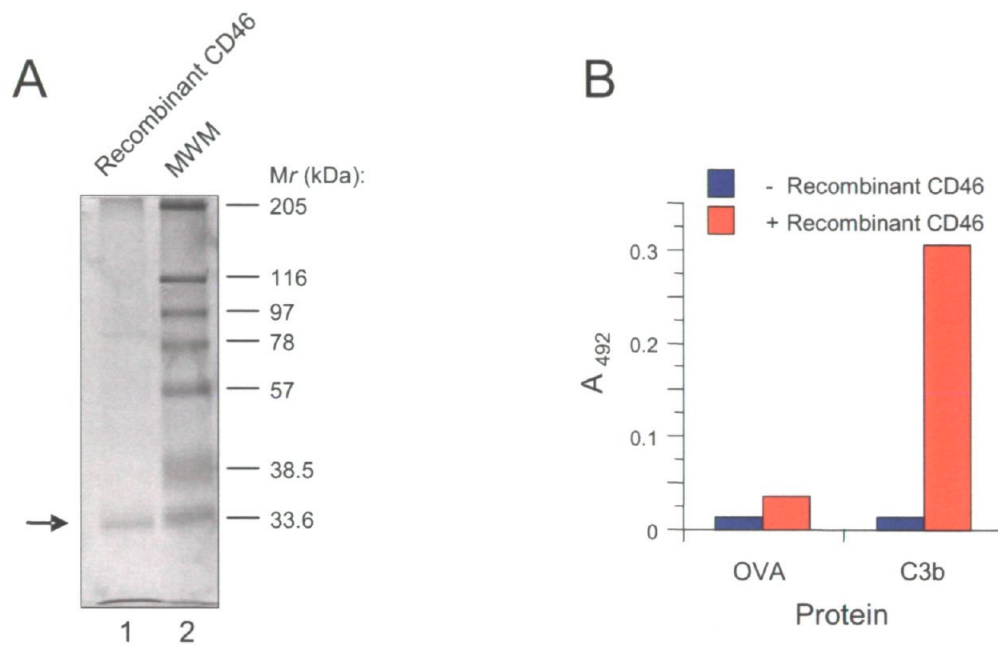


Figure 3.1. Analysis of the recombinant CD46 protein. Panel A: Electrophoretic separation by SDS-10% PAGE under non-reducing conditions of recombinant CD46 folded from inclusion bodies (lane 1) and molecular weight markers (lane 2). Panel B: Binding of recombinant CD46 (10 $\mu\text{g/ml}$) to plates coated with human C3b or ovalbumin (OVA) (10 $\mu\text{g/ml}$), as detected using rabbit anti-CD46 antibodies, HRP-coupled goat anti-rabbit antibodies, and HRP substrate.

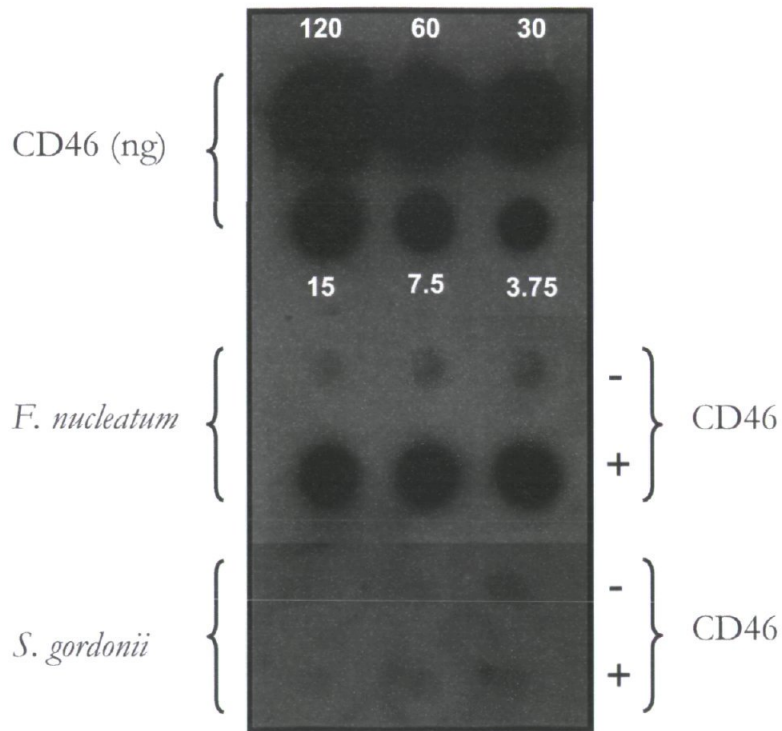


Figure 3.2. Binding of CD46 by *F. nucleatum* ATCC 49256 cells, as determined by an immuno-dot blot assay. Bacteria were incubated with recombinant CD46, washed, and applied on a PDVF membrane. CD46 was detected using monoclonal anti-CD46 antibody and HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG. Various amounts of recombinant soluble CD46 were used as positive controls while cells of *S. gordonii* ATCC 10608 incubated with recombinant CD46 were used as negative control. Assays were performed in triplicate.

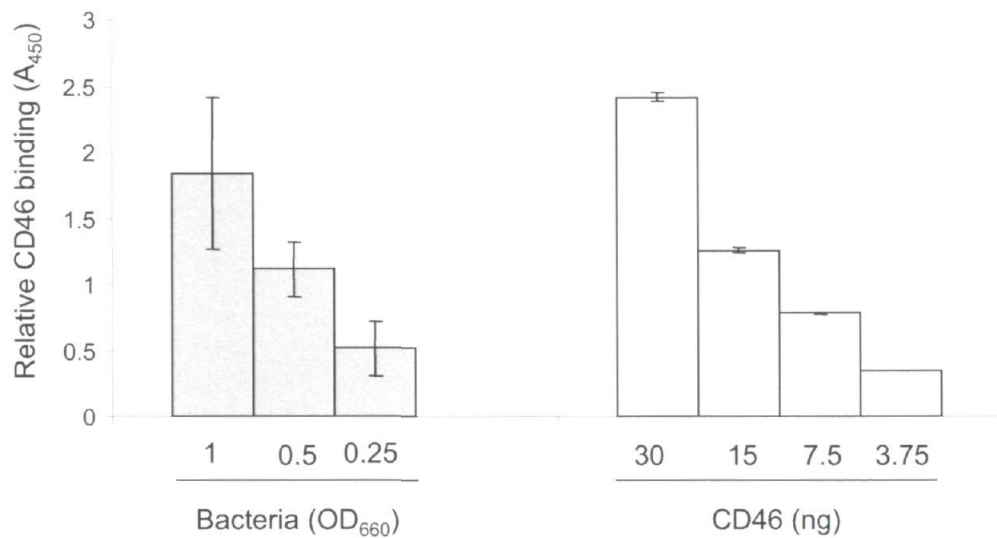


Figure 3.3. Quantitative determination of CD46 binding to *F. nucleatum* ATCC 49256 using a cell-based ELISA. Various amounts of bacteria bound to wells of 96-well plate were successively incubated with recombinant CD46, mouse anti-CD46 monoclonal antibody, and goat anti-mouse IgG antibody conjugated to HRP. Various amounts of recombinant CD46 bound to wells were used as positive controls. Assays were performed in triplicate.

<i>F. nucleatum</i>	+	-	+	+	+	+
CD46	-	+	+	-	+	+
Factor I	-	+	+	+	-	+
C3b	-	+	+	+	+	-

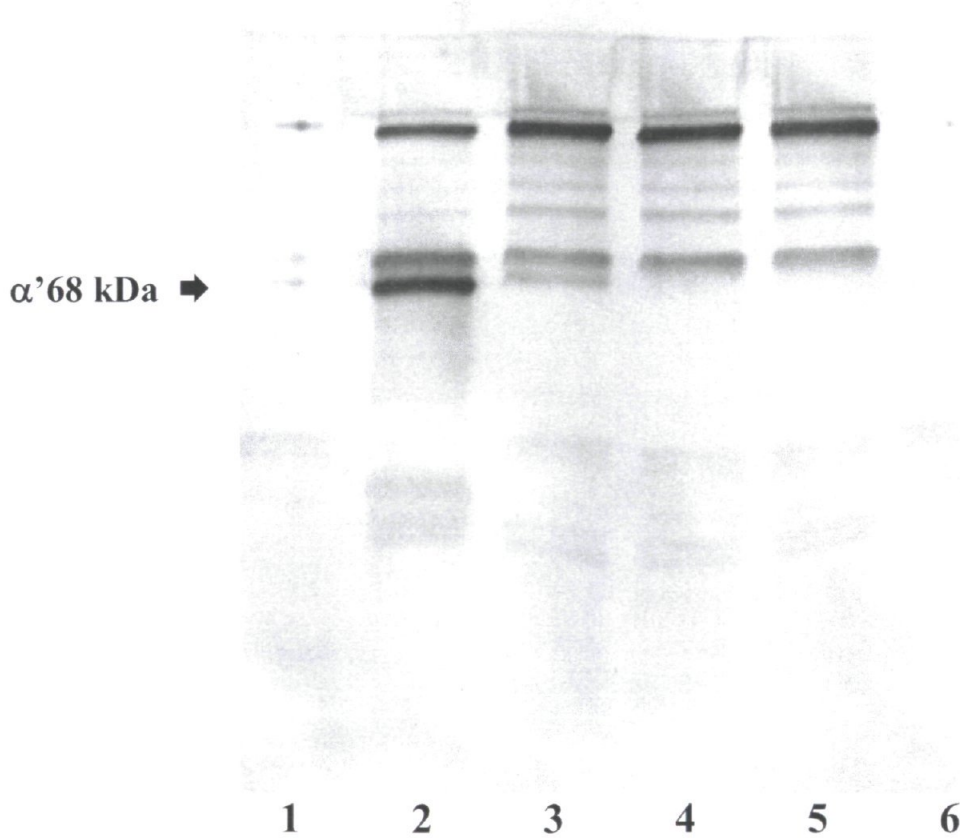


Figure 3.4. Capacity of *F. nucleatum*-bound CD46 to serve as a cofactor in the factor I-mediated cleavage of C3b. C3b degradation is visualized by SDS-PAGE/Western immunoblot procedure using goat anti-human C3b antibody and AP-conjugated mouse anti-goat IgG antibody. Lane 1, *F. nucleatum* cells alone; Lane 2, CD46 + factor I + C3b; Lane 3, CD46-coated *F. nucleatum* + factor I + C3b; Lane 4, *F. nucleatum* + factor I + C3b; Lane 5, CD46-coated *F. nucleatum* + C3b; Lane 6, CD46-coated *F. nucleatum* + factor I. Results representative of triplicate assays.

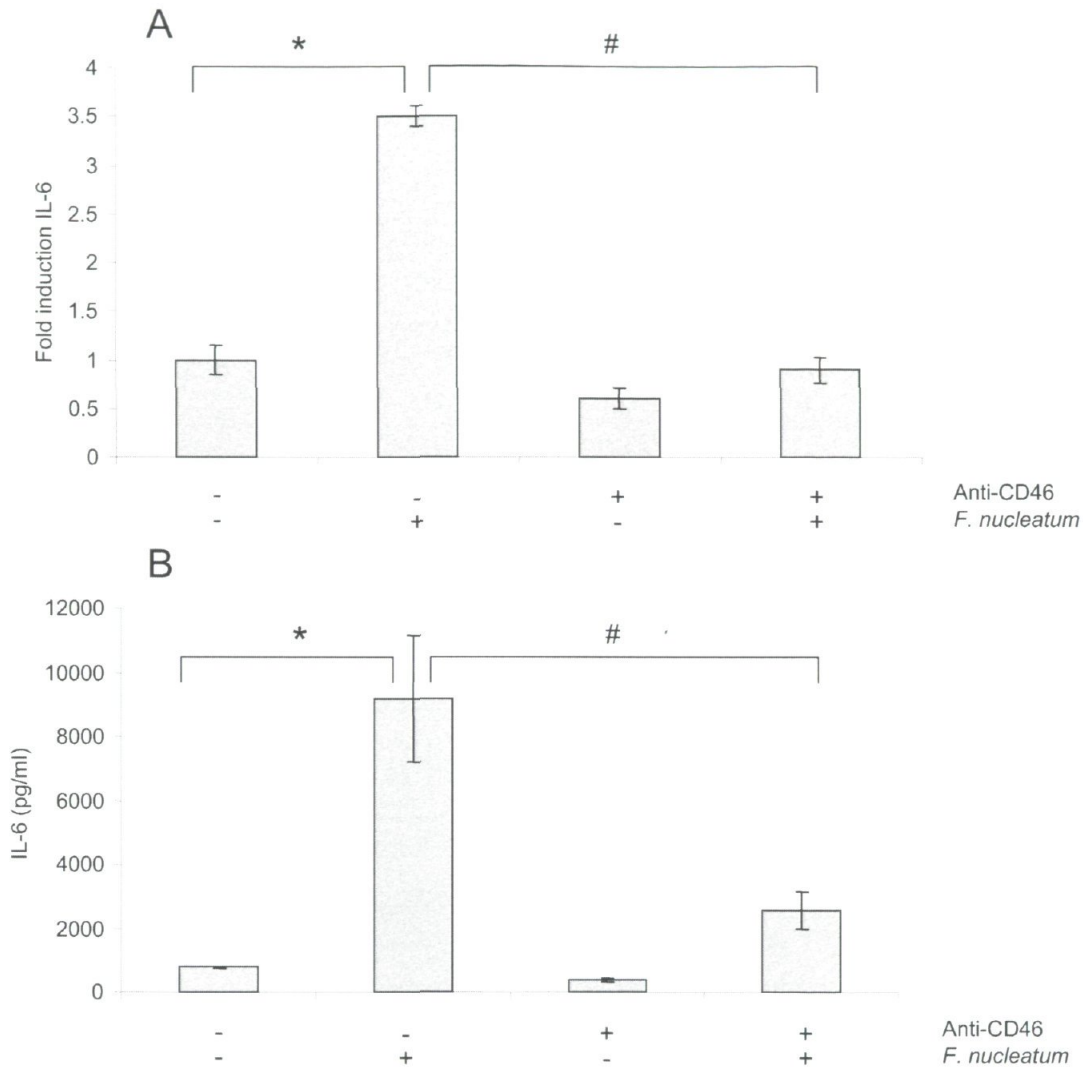


Figure 3.5. IL-6 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). Epithelial cells were treated (2 h) or not with rabbit polyclonal anti-CD46 prior to stimulation. IL-6 gene expression was quantified by real-time RT-PCR. IL-6 concentrations in cell-free culture supernatants were determined by ELISA. * Significant increase ($p < 0.05$) compared to unstimulated control cells. Assays were performed in triplicate. # Significant decrease ($p < 0.05$) compared to *F. nucleatum*-stimulated cells in the absence of anti-CD46.

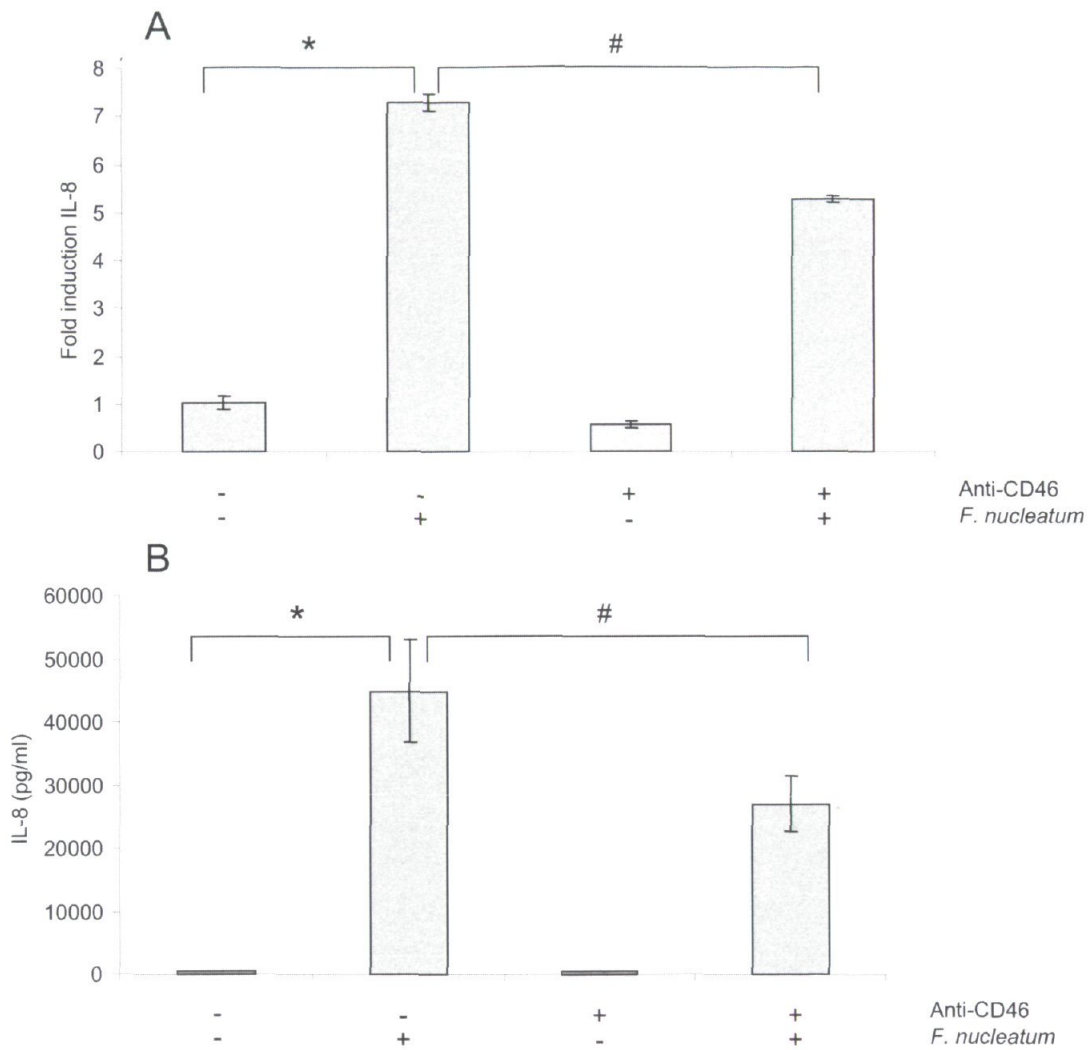


Figure 3.6. IL-8 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). Epithelial cells were treated (2 h) or not with rabbit polyclonal anti-CD46 prior to stimulation. IL-8 gene expression was quantified by real-time RT-PCR. IL-8 concentrations in cell-free culture supernatants were determined by ELISA. * Significant increase ($p < 0.05$) compared to unstimulated control cells. Assays were performed in triplicate. # Significant decrease ($p < 0.05$) compared to *F. nucleatum*-stimulated cells in the absence of anti-CD46.

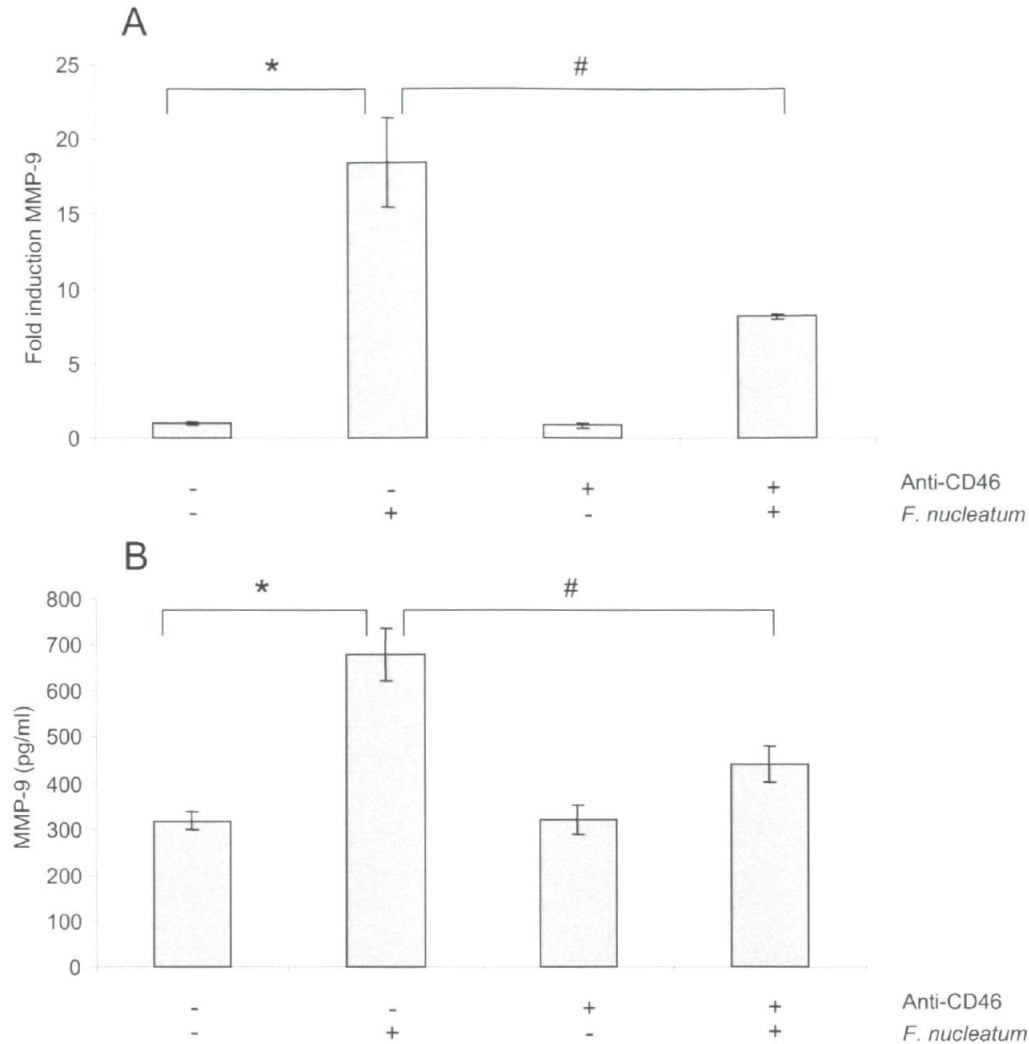


Figure 3.7. MMP-9 gene expression (A) and protein secretion (B) by oral epithelial cells stimulated (24 h) with *F. nucleatum* (MOI = 50). Epithelial cells were treated (2 h) or not with rabbit polyclonal anti-CD46 prior to stimulation. MMP-9 gene expression was quantified by real-time RT-PCR. MMP-9 concentrations in cell-free culture supernatants were determined by ELISA. * Significant increase ($p < 0.05$) compared to unstimulated control cells. Assays were performed in triplicate. # Significant decrease ($p < 0.05$) compared to *F. nucleatum*-stimulated cells in the absence of anti-CD46.

CHAPITRE 4

Effect of periodontopathogen lipopolysaccharides and pro-inflammatory cytokines on CD46, CD55, and CD59 gene/protein expression by oral epithelial cells

4.1 Résumé

Le système du complément est un élément important dans la réponse de l'hôte contre les microorganismes pathogènes. Les protéines régulatrices du complément (CRPs), incluant le CD46, CD55 et CD59, protègent les cellules hôtes de l'attaque par le complément. Dans cette présente étude, nous avons investigué la modulation de l'expression des CRPs (gène et protéine) par le LPS de parodontopathogènes majeurs (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) pour différentes périodes du temps. L'expression des gènes CD46, CD55 et CD59 a été évaluée par PCR quantitative et l'expression de la protéine de surface a été mesurée par l'immunofluorescence. La sécrétion de cytokines par les cellules épithéliales stimulées par le LPS des parodontopathogènes a été quantifiée par ELISA. Des cytokines recombinantes ont été utilisées pour stimuler les cellules épithéliales et l'expression des CRPs (gène et protéine) a été analysée comme indiqué précédemment. Les LPS de *T. denticola* et *T. forsythia* ont

augmenté significativement l'expression des gènes codant pour CD55 et CD59 et à moindre degré CD46. L'expression de CRPs à la surface cellulaire a également été augmentée suite à la stimulation des cellules par les cytokines. L'expression de CD46, CD55 et CD59 (gène et protéine) est régulée par le LPS des parodontopathogènes et de cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 β et TNF- α . Les cellules épithéliales surexpriment les CRPs à leur surface en réponse aux bactéries parodontopathogènes et aux conditions inflammatoires associées aux sites parodontaux actifs. Cette surexpression des CRPs à la surface des cellules épithéliales pourrait protéger les cellules d'une autolyse par le complément qui activée durant les parodontites.

4.2 Abstract

Introduction: The complement system is an important host response against invading pathogenic microorganisms. Membrane-anchored complement regulatory proteins (CRPs), including CD46, CD55, and CD59, protect host cells from complement attack. In the present study, we investigated whether periodontopathogen LPS and pro-inflammatory cytokines modulate CRP gene/protein expression in human oral epithelial cells.

Methods: Oral epithelial cells were stimulated with LPS from major periodontopathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) for various periods of time. CD46, CD55, and CD59 gene expression was evaluated by real-time PCR, while cell surface protein expression was quantified by immunofluorescence analysis. Cytokine secretion by epithelial cells stimulated with periodontopathogen LPS was quantified by enzyme-linked immunosorbent assays. Recombinant forms of cytokines were also used to stimulate oral epithelial cells and CRP gene/protein expression was monitored as above.

Results: The LPS of *T. denticola* and *T. forsythia* were the most potent for increasing the gene expression of CD55 and CD59, and to a lesser extent CD46, after a

48 h stimulation. An LPS-induced upregulation of epithelial cell surface CRP was also demonstrated. The stimulation of epithelial cells with LPS was associated with IL-6 and IL-8 secretion. Although these two cytokines had no effect on CD46 and CD55 gene expression in epithelial cells, IL-1 β and TNF- α induced a significant upregulation. Cell surface expression of CRP was also increased by stimulation of epithelial cells with cytokines.

Conclusion: The CD46, CD55, and CD59 gene/protein expression was upregulated by periodontopathogen LPS and pro-inflammatory cytokines. It can be hypothesized that, when faced with bacterial challenges and inflammatory conditions associated to active periodontal sites, oral epithelial cells may respond by increasing CRP gene expression to avoid cell lysis by the complement system, which is activated during periodontitis.

4.3 Introduction

Periodontitis is a chronic inflammatory disease that leads to the destruction of tooth-supporting tissues through the formation of periodontal pockets and the resorption of alveolar bone. The disease is caused by a specific group of Gram-negative bacteria called periodontopathogens. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* have been associated with the chronic form of periodontitis, while *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is considered the major etiologic agent of the aggressive form of periodontitis (Feng and Weinberg, 2006; Haffajee and Socransky, 1994). The host response against these bacteria and their products, such as lipopolysaccharide (LPS), is a critical determinant that modulates the progression of periodontitis toward tissue destruction or healing (Ebersole and Taubman, 1994; Madianos et al., 2005). Gingival epithelial cells are a major barrier preventing periodontal tissue invasion by periodontopathogens (Andrian et al., 2006b). These cells are the first target for bacterial LPS and participate in the inflammatory process of periodontitis by secreting pro-inflammatory cytokines and chemokines (Andrian et al., 2006b; Dale, 2002).

The human complement system is an important component of the host defense against invading pathogenic microorganisms. Complement activation occurs in subgingival sites of periodontitis patients (Ebersole, 2003) and appears to involve both the classic and alternative complement pathways. This leads to the formation of C3 convertase and the membrane attack complex and results in the lysis of target bacteria. Inappropriate or excessive activation of the complement system may be deleterious for the host by directly or indirectly mediating inflammatory tissue destruction, as is the case in autoimmune diseases (Zipfel and Skerka, 2009). To avoid autologous complement-mediated tissue injury, mammalian cells express several membrane-anchored complement regulatory proteins (CRP), including membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59) (Miwa and Song, 2001). CD46 and CD55 act early in the complement cascade to deactivate C3 and C5 convertases (Yang *et al.*, 2009), while CD59 acts later to prevent membrane attack complex formation (Davies and Lachmann, 1993; Kim and Song, 2006). Recently, we showed that *P. gingivalis* can induce CD46 shedding from the surface of oral epithelial cells through the action of proteolytic enzymes (Mahtout *et al.*, 2009). This was suggested to be a pathogenic mechanism by which *P. gingivalis* may render epithelial cells susceptible to complement attack and contribute to tissue destruction. There is no information in the scientific literature on the effect of periodontopathogens on the CRP gene/protein expression by host cells.

CRP gene/protein expression has been studied in different pathological disorders, including cancer (Jurianz *et al.*, 1999) and infectious diseases (Cocuzzi *et al.*, 2000). More specifically, it has been reported that tumor cells over-express CRPs in colorectal tumors and other types of cancer (Inoue *et al.*, 2002; Varsano *et al.*, 1998). In the present study, we hypothesized that periodontopathogen LPS and inflammatory cytokines, which are found in diseased periodontal sites, have the ability to modulate CRP gene/protein expression in human oral epithelial cells.

4.4 Materials and methods

4.4.1 LPS preparation

P. gingivalis ATCC 33277, *T. denticola* ATCC 35405, *T. forsythia* ATCC 43037, and *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 were grown in the appropriate culture media (Grenier, 1996). LPS were isolated from these bacterial strains according to the protocol of Darveau and Hancock (Darveau and Hancock, 1983). This method is based on protein digestion of a whole cell extract by proteinase K and successive solubilization and precipitation steps. The LPS preparations were freeze-dried and stored at -20°C until used. The amount of contaminating protein was evaluated using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) with bovine serum albumin as a control and was less than 0.001% in all LPS preparations. *T. denticola* possesses a lipooligosaccharide (although it will be called LPS in the present study) that has properties that are different than those of the classic LPS of the *Bacteroides* group (Schultz *et al.*, 1998).

4.4.2 Cultivation of human oral epithelial cells

The immortalized human oral epithelial cell line GSMK-K, which was developed by V. Murrah (Department of Diagnostic Sciences and General Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA) was used (Gilchrist *et al.*, 2000). This cell line has an epithelial phenotype based on electron microscopic and immunohistochemical analyses (Gilchrist *et al.*, 2000). The cells were maintained and cultured as monolayers in tissue culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 4 mM L-glutamine (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), and 100 µg mL⁻¹ of penicillin-streptomycin (DMEM-FBS) in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The epithelial cells were harvested by gentle trypsinization (0.05% trypsin-EDTA; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), washed once with DMEM-FBS, suspended at a density of 0.5 x 10⁶ cells per mL in

DMEM-FBS, seeded in 6-well plates (10^6 cells/well in 2 mL), and cultured overnight in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C to allow cell adhesion. The medium was then replaced by fresh DMEM supplemented with 1% heat-inactivated FBS prior to the epithelial cell treatments.

4.4.3 Treatment of epithelial cells

Epithelial cells were treated or not for various periods of time (0, 24, and 48 h) with *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, or *A. actinomycetemcomitans* LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). To investigate the effect of pro-inflammatory cytokines on CRP gene expression, epithelial cells were also treated with recombinant human IL-6, IL-8, IL-1 β , or TNF- α (50 ng/ml; Feldan Bio, Montreal, QC, Canada). The cells were harvested and used to determine the expression of the CD46, CD55, and CD59 genes.

4.4.4 Real-time PCR analysis of the expression of the CD46, CD55, and CD59 genes

Total RNA was isolated using RNeasy Plus mini kits (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of the RNA were assayed using the Experion system and RNA StdSens analysis kit according to the manufacturer's specifications (Bio-Rad Laboratories). The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as follows. RNA from each sample (1 μg) was reverse-transcribed using Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Mississauga, ON, Canada) and random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverse transcription conditions were 10 min at 65°C, 1 h at 37°C, and 10 min at 65°C. The amounts of mRNA transcript were measured using the Bio-Rad CFX96 RT-PCR detection system (Bio-Rad Laboratories). Triplicate reactions were prepared with 25 μL of a PCR mixture containing 12.5 μL of IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 5 μL of cDNA, 0.5 μL of gene-specific primer (CD46, CD55, CD59), and 7 μL of RNase- and DNase-

free water (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA). The sequences of the primers (Invitrogen) used for the RT-PCR are listed in Table 4.1. The samples were amplified using a MyCyclerTM thermal cycler (Bio-Rad Laboratories). The amplification conditions for CD46, CD55, and CD59 were 95°C for 3 min followed by 35 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s, and 72°C for 30 s. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, which displays highly uniform expression, was used as an internal control.

4.4.5 Immunofluorescence analysis for cell surface CD46, CD55, and CD59 proteins

GMSM-K cells were treated (48 h) as above and cells were fixed in PBS-4% paraformaldehyde for 30 min. They were incubated for 1 h in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and then with rabbit anti-CD46, anti-CD55, or anti-CD59 polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in PBS-1% BSA (1 h) followed by Alexa fluor 555-conjugated ,goat anti-rabbit IgG polyclonal antibody (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in PBS-1% BSA (1 h). The nuclei was visualized by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (Molecular Probes). After washing with PBS, the cells were examined using an Olympus FSX100 fluorescence microscope and FSX-BSW imaging software (Olympus, Tokyo, Japan). Epithelial cells incubated with Alexa fluor 555-conjugated secondary antibody alone were included as non-specific staining controls. Assays were performed in triplicate. Image analysis was performed using Image J v3.91 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Three high power fields were selected for analysis of each tested condition. For each high power field consisting of 5-6 confluent GSMK cells, binary image masks of CRPs and DAPI positive staining were created for analysis. Each image was converted to a binary mask that included all fluorescence data above background. The DAPI staining mask was used to define the cell-surface CRPs. Using the image calculator, the DAPI mask was subtracted from the CRPs and DAPI mask to create a staining mask defining the cell surface CRPs in untreated and treated epithelial cells. Quantitative fluorescence data were exported from Image J into Microsoft Excel software and calculated as the means \pm

standard deviations (SD) of cell-surface CRP fluorescence of three individual high power fields. Data were presented as relative staining of cell-surface CRP in bacteria-treated epithelial cells and compared to untreated control (100%).

4.4.6 Determination of cytokine secretion

Commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) were used to quantify the levels of IL-1 β , IL-6, IL-8, and TNF- α in the epithelial cell-free culture supernatants according to the manufacturer's protocols. The absorbance at 450 nm was read using a microplate reader with the wavelength correction set at 550 nm. Cytokine concentrations were determined in triplicate. The sensitivities of the commercial ELISA kits were 3.9 pg mL⁻¹ for IL-1 β , 9.3 pg mL⁻¹ for IL-6, 31.2 pg mL⁻¹ for IL-8, and 15.6 pg mL⁻¹ for TNF- α .

4.4.7 Statistical analysis

The means \pm standard deviations of triplicate assays from a minimum of three separate experiments were calculated. Differences between the control and test values were analyzed for statistical significance using the Student's t-test and were considered significant at $P < 0.05$.

4.5 Results

As shown in figure 4.1, all three CRPs (CD46, CD55, CD59) were expressed at basal levels as a function of time by untreated oral epithelial cells (control). After 48 h, the CD46, CD55, and CD59 gene expression were increased 2.7-, 3.6-, and 2.2-fold, respectively, compared to time 0. LPS isolated from four major periodontopathogens (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*) were then analyzed for their ability to stimulate CRP gene expression in the GSMK oral epithelial cell line.

Epithelial cells were treated with the different LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) for 24 and 48 h prior to be analyzed for gene expression by real-time PCR. Following a 24-h treatment, the CD46 gene expression was stimulated 1.2-, 1.6-, and 1.1-fold by *P. gingivalis*, *T. denticola*, and *T. forsythia* LPS, respectively, while *A. actinomycetemcomitans* LPS had no significant effect (Fig. 4.2A). CD46 gene expression was stimulated 1.2-, 1.3-, 1.4-, and 1.3-fold by *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, and *A. actinomycetemcomitans* LPS, respectively, following a 48-h treatment. Regarding CD55, the gene expression by epithelial cells was stimulated 1.3-, 1.8-, 2-, and 1.6-fold by *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, and *A. actinomycetemcomitans* LPS, respectively, following a 48-h treatment (Fig. 4.2B). CD55 gene expression was not affected by a 24-h treatment with all LPS preparations. Lastly, CD59 gene expression by epithelial cells was significantly increased by a 48-h treatment with *T. denticola* and *T. forsythia* LPS. *T. forsythia* LPS had the strongest effect, causing a 1.8-fold increase in CD59 expression. No effect was observed following stimulation with LPS of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans*. In addition, a 24-h treatment with the four LPS preparations had no effect on CD59 gene expression (Fig. 4.2C).

The effect of the LPS preparations on epithelial cell surface CD46, CD55, and CD59 proteins was then investigated by an immunofluorescence procedure. The quantitative analysis using Image J software showed that surface-associated CD46 was increased by a 48-h treatment with all LPS tested (Fig. 4.3), in agreement with the increased CD46 gene expression observed. The increase in cell surface CD46 ranged from 1.7- to 2.5-fold. In contrast, surface-associated CD55 was only increased by LPS of *T. forsythia* (1.3-fold) while surface-associated CD59 was increased by LPS of *T. forsythia* (1.7-fold) and *T. denticola* (1.4-fold).

Table 4.2 lists the cytokines secreted by epithelial cells stimulated with the four LPS preparations. Cytokine secretion was measured after 24 h of stimulation since a kinetics analysis showed that cytokine levels reached a maximum after 24 h (data not shown). Unstimulated cells produced undetectable levels of IL- 1β and TNF- α and low levels of IL-6 and IL-8 (Table 4.2). All four LPS preparations significantly stimulated IL-

6 and IL-8 secretion but had no effect on IL-1 β and TNF- α secretion. *A. actinomycetemcomitans* and *T. forsythia* LPS had the strongest effect.

In an attempt to establish a possible relationship between secreted cytokines induced by LPS and CRP gene/protein expression, IL-6 and IL-8, which are secreted by LPS-stimulated oral epithelial cells (Table 4.2), as well as IL-1 β and TNF- α , which are secreted by human macrophage stimulated with periodontopathogen LPS (Bodet et al., 2006b), were used in their recombinant forms to stimulate epithelial cells prior to measuring the CD46, CD55, and CD59 gene expression and cell-associated proteins. CD46 gene expression was significantly stimulated following the 24- and 48-h treatments with IL-1 β and TNF- α (Fig. 4.4A). The maximal effect was observed after 48 h, with a 2- and 3-fold increase, respectively, for IL-1 β and TNF- α . A 24- or 48-h treatment with IL-6 and IL-8 did not cause any significant increase in CD46 gene expression. IL-6 and IL-8 had no effect on CD55 gene expression by epithelial cells. However, as observed for CD46, IL-1 β and TNF- α significantly stimulated CD55 gene expression following the 24- and 48-h treatments. The maximal effect was observed after 48 h, with a 8- and 12-fold increase, respectively, for IL-1 β and TNF- α (Fig. 4.4B). IL-6, IL-8, and IL-1 β stimulated CD59 gene expression by epithelial cells 1.8-, 2-, and 1.5-fold, respectively, after a 24-h treatment (Fig. 4.4C). TNF- α had no effect. When a 48-h treatment was performed on epithelial cells, CD59 gene expression was not increased by any of the recombinant cytokines. In contrast, CD59 gene expression by epithelial cells treated with IL-1 β and TNF- α was 1.3- and 1.6-fold lower, respectively, than that of untreated epithelial cells.

The effect of the recombinant cytokines on epithelial cell surface CD46, CD55, and CD59 proteins was then determined by immunofluorescence. All cytokines significantly increased cell-associated CD46 ranging from 2.4-fold (IL-6) to 3.3-fold (TNF- α) following a 48-h treatment (Fig. 4.3). Figure 4.5 shows that CD46 was uniformly distributed on the surfaces of untreated oral epithelial cells, while treatment with TNF- α induced a significant increase of cell surface CD46. Similarly, cell-associated CD59 was also increased by all cytokine treatment, in particular with IL-6 (2.9-fold). Lastly, cell

surface CD55 was only increased by IL-1 β (1.6-fold) and TNF- α (1.5-fold) treatment (Fig 4.3).

4.6 Discussion

The complement system is composed of plasma proteins with the ability to interact with themselves and with host cell membrane proteins, after stimulation and activation. The components of the complement system play a major role in the host immune defense against microbial pathogens through opsonization and killing (Hajishengallis). Components of the complement system (C4a, C3b, C5a) have been identified in gingival crevicular fluid samples from periodontitis patients (Schenkein and Genco, 1977). It is well known that an excessive activation of the complement system may be deleterious for the host by directly and indirectly mediating inflammatory tissue destruction. Therefore, the regulation of the complement system by soluble and membrane-bound proteins is of utmost importance. Membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59) are membrane-bound complement regulators expressed by all mammalian cells except erythrocytes. These proteins protect autologous tissues from complement-mediated lysis (Miwa and Song, 2001). Interestingly, several bacterial and viral pathogens have developed a strategy to resist complement killing by binding soluble CRPs (Bernet *et al.*, 2003; Cattaneo, 2004; Russell, 2004).

In the present study, we tested the hypothesis that mechanisms exist to induce the upregulation of CRPs in oral epithelial cells in order to maintain the integrity of the epithelium during chronic periodontal diseases where complement activation occurs. In this purpose, we investigated the regulation of CRP gene/protein expression by LPS of major periodontopathogens and pro-inflammatory cytokines, which are components found in high concentrations in diseased periodontal sites. First, we showed a time-dependent increase of the basal levels of CD46, CD55, and CD59 gene expression. This phenomenon may be associated to cell-cell contact as the cultures become confluent or to

the accumulation of an unknown factor regulating CRP expression that is secreted by epithelial cells.

To the best of our knowledge, the present study is the first to demonstrate that periodontopathogen LPS can modulate CD46, CD55, and CD59 gene/protein expression in human oral epithelial cells. In general, maximal expression levels of CRPs were observed after a 48-h LPS treatment. Among the LPS tested, the one of *T. forsythia* induced the most important upregulation of CRPs. We also showed that LPS-induced cytokines secreted by the epithelial cell line used in this study (IL-6 and IL-8) or by macrophages (IL-1 β and TNF- α) (Bodet et al., 2006c; Milward et al., 2007) modulated to various extents membrane-associated CRPs as well as CRP gene expression. Considering that cytokine levels are significantly higher in diseased periodontal sites than in healthy sites (Jin et al., 2002; Romano et al., 1997; Tsai et al., 1995), it is likely that a cytokine-mediated up-regulation of CRP genes occurs in inflammatory periodontitis.

An increased expression of membrane-associated CD46 was observed when epithelial cells were treated with any of the LPS preparations or recombinant cytokines used. This upregulation of surface-associated CD46 in oral epithelial cells may be a double-edged sword. On the one hand, it contributes to protecting cells against attack by the complement system by acting as a cofactor for factor I and mediating the cleavage of C3b and C4b. On the other hand, it may also have deleterious effects and contribute to the inflammatory pathological process of periodontitis. Indeed, we previously reported that *P. gingivalis* can mediate the shedding of CD46 from the surface of oral epithelial cells, and that soluble CD46 can induce a pro-inflammatory response (Mahtout *et al.*, 2009). In addition, we also reported that *Fusobacterium nucleatum* interacts with epithelial cell surface CD46 and leads to a significant up-regulation of the gene expression and protein secretion of IL-6, IL-8, and MMP-9 (Mahtout *et al.*, 2011).

Only the LPS of *T. forsythia* as well as the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α significantly upregulated surface-associated CD55 in oral epithelial cells. Such an increased expression of CD55 may inhibit the formation of C3 convertases as well as

accelerate their decay to protect cells against autologous complement attack. The ability of TNF- α to induce CD55 expression in endothelial cells (Mason *et al.*, 1999) and lung cancer cell lines ((Varsano *et al.*, 1998) has been previously demonstrated.

Surface-associated CD59 was increased by treatment of epithelial cells with LPS (*T. denticola* and *T. forsythia*) or cytokines, more specifically IL-6. CD59 is known to bind C8 and limit the incorporation of C9 thus preventing the formation of the membrane attack complex and ultimately cell lysis. Since oral epithelial cells do not express CD14, Yamamoto *et al.*, 2003 brought evidence for the involvement of CD59 in LPS signal transduction leading to cytokine secretion. More specifically, the authors showed that following binding of LPS to CD59, nuclear translocation of nuclear factor-kappa B (NF- κ B) was induced and secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, IL-6, and TNF- α was stimulated. Such a phenomenon may thus contribute to maintaining an inflammatory condition in periodontal sites.

In summary, we report for the first time that CRPs expressed by oral epithelial cells can be upregulated by periodontopathogen LPS. Such a phenomenon was also observed with pro-inflammatory cytokines, which are present in high amounts in diseased periodontal sites. These data obtained using an immortalized cell line need to be confirmed with primary oral epithelial cells. Further studies are required to better understand the involvement of the upregulation of CRPs in the pathogenic process of periodontitis.

4.7 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research.

4.8 References

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

Bernet J, Mullick J, Singh AK & Sahu A (2003) Viral mimicry of the complement system. *J Biosci* **28**: 249-264.

Bodet C, Chandad F & Grenier D (2006) Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res* **85**: 235-239.

Buettner R, Huang M, Gritsko T, *et al.* (2007) Activated signal transducers and activators of transcription 3 signaling induces CD46 expression and protects human cancer cells from complement-dependent cytotoxicity. *Mol Cancer Res* **5**: 823-832.

Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP & Saed GM (2004) The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* **191**: 1678-1687.

Cattaneo R (2004) Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol* **78**: 4385-4388.

Cocuzzi E, Guidubaldi J, Bardenstein DS, Chen R, Jacobs MR & Medof EM (2000) Release of complement regulatory proteins from ocular surface cells in infections. *Curr Eye Res* **21**: 856-866.

Dale BA (2002) Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* **30**: 70-78.

Darveau RP & Hancock RE (1983) Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* **155**: 831-838.

Davies A & Lachmann PJ (1993) Membrane defence against complement lysis: the structure and biological properties of CD59. *Immunol Res* **12**: 258-275.

Ebersole JL (2003) Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000* **31**: 135-166.

Ebersole JL & Taubman MA (1994) The protective nature of host responses in periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 112-141.

Feng Z & Weinberg A (2006) Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontol 2000* **40**: 50-76.

Gilchrist EP, Moyer MP, Shillitoe EJ, Clare N & Murrah VA (2000) Establishment of a human polyclonal oral epithelial cell line. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**: 340-347.

Grenier D (1996) Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*. *Microbiology* **142 (Pt 4)**: 955-961.

Haffajee AD & Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* **5**: 78-111.

Hajishengallis G (2010) Complement and periodontitis. *Biochem Pharmacol* **80**: 1992-2001.

Inoue T, Yamakawa M & Takahashi T (2002) Expression of complement regulating factors in gastric cancer cells. *Mol Pathol* **55**: 193-199.

Jin LJ, Leung WK, Corbet EF & Soder B (2002) Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* **29**: 604-614.

Juriansz K, Ziegler S, Garcia-Schuler H, Kraus S, Bohana-Kashtan O, Fishelson Z & Kirschfink M (1999) Complement resistance of tumor cells: basal and induced mechanisms. *Mol Immunol* **36**: 929-939.

Kim DD & Song WC (2006) Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* **118**: 127-136.

Madianos PN, Bobetsis YA & Kinane DF (2005) Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* **32 Suppl. 6**: 57-71.

Mahtout H, Chandad F, Rojo JM & Grenier D (2011) *Fusobacterium nucleatum* binding to complement regulatory protein CD46 modulates the expression and secretion of cytokines and matrix metalloproteinases by oral epithelial cells. *J Periodontol* **82**: 311-319.

Mahtout H, Chandad F, Rojo JM & Grenier D (2009) *Porphyromonas gingivalis* mediates the shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* **24**: 396-400.

Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA & Haskard DO (1999) Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood* **94**: 1673-1682.

Miwa T & Song WC (2001) Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. *Int Immunopharmacol* **1**: 445-459.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, *et al.* (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* **6**: 315-325.

Russell S (2004) CD46: a complement regulator and pathogen receptor that mediates links between innate and acquired immune function. *Tissue Antigens* **64**: 111-118.

Schenkein HA & Genco RJ (1977) Gingival fluid and serum in periodontal diseases. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (factor B) and C4 in gingival fluid. *J Periodontol* **48**: 778-784.

Schultz CP, Wolf V, Lange R, Mertens E, Wecke J, Naumann D & Zahringer U (1998) Evidence for a new type of outer membrane lipid in oral spirochete *Treponema denticola*. Functioning permeation barrier without lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **273**: 15661-15666.

Tsai CC, Ho YP & Chen CC (1995) Levels of interleukin-1 beta and interleukin-8 in gingival crevicular fluids in adult periodontitis. *J Periodontol* **66**: 852-859.

Varsano S, Rashkovsky L, Shapiro H & Radnay J (1998) Cytokines modulate expression of cell-membrane complement inhibitory proteins in human lung cancer cell lines. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**: 522-529.

Yamamoto T, Nakane T, Doi S & Osaki T (2003) Lipopolysaccharide signal transduction in oral keratinocytes--involvement of CD59 but not CD14. *Cell Signal* **15**: 861-869.

Yang P, Tyrrell J, Han I & Jaffe GJ (2009) Expression and modulation of RPE cell membrane complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**: 3473-3481.

Zipfel PF & Skerka C (2009) Complement regulators and inhibitory proteins. *Nat Rev Immunol* **9**: 729-740.

Tableau 4.1. Primers used in the real-time PCR analysis.

Gene	Sequence (5'-3')	Reference
CD46	F TGGTGACAATTCAGTGTGGAGTC	(Buettner, <i>et al.</i> , 2007)
	R CCTGATATCTGTTTTCCATTTTCGA	
CD55	F AGGCATTTTCATCTTTCCTTCGGG	(Yang, <i>et al.</i> , 2009)
	R CCTTATCACCATCAACACCCCTGG	
CD59	F GAGCCCAGGGAGGGAAAGGTTC	(Yang, <i>et al.</i> , 2009)
	R GGAGGTTAAGGCAAAACCCTACG	
GAPDH	F GGTATCGTCGAAGGACTCATGAC	(Buhimschi, <i>et al.</i> , 2004)
	R ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	

Tableau 4.2. Secretion of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α by oral epithelial cells stimulated with *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia* or *A. actinomycetemcomitans* LPS (1 μ g/mL) for 24 h. Cytokine secretion was assessed by ELISA. The data are expressed as the means \pm standard deviations of triplicate assays. * Significant increase (P < 0.05).

Bacterial LPS	Amounts of cytokine secreted (pg mL ⁻¹)			
	IL-1 β	IL-6	IL-8	TNF- α
None	< 3.9	85 \pm 21	210 \pm 46	< 15.6
<i>P. gingivalis</i>	< 3.9	253 \pm 18*	485 \pm 97*	< 15.6
<i>T. denticola</i>	< 3.9	756 \pm 149*	524 \pm 162*	< 15.6
<i>T. forsythia</i>	< 3.9	1 822 \pm 340*	4 314 \pm 351*	< 15.6
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	< 3.9	2 633 \pm 256*	7 242 \pm 524*	<15.6

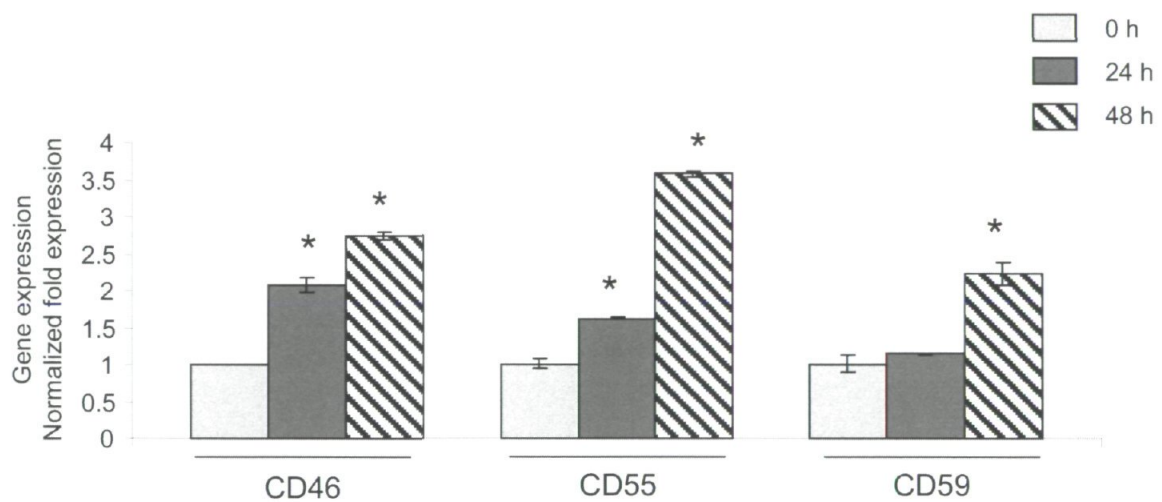


Figure 4.1. Basal levels of CD46, CD55, and CD59 gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. Results are presented as fold increases in the expression of the gene compared to the control (time 0). * Significant increase ($P < 0.05$) compared to control cells.

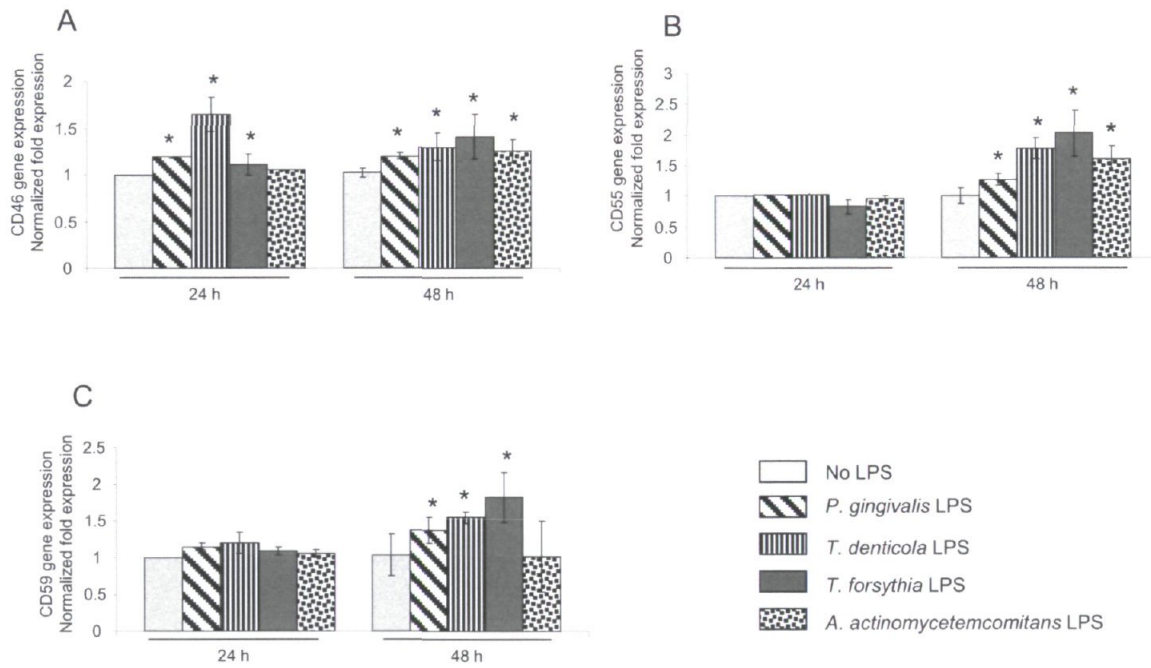


Figure 4.2. Effect of *P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, or *A. actinomycetemcomitans* LPS ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) on CRP gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. Panel A: CD46, Panel B: CD55, Panel C: CD59. Results are presented as fold increases in the expression of the gene in test samples compared to the control. * Significant increase ($P < 0.05$) compared to unstimulated control cells.

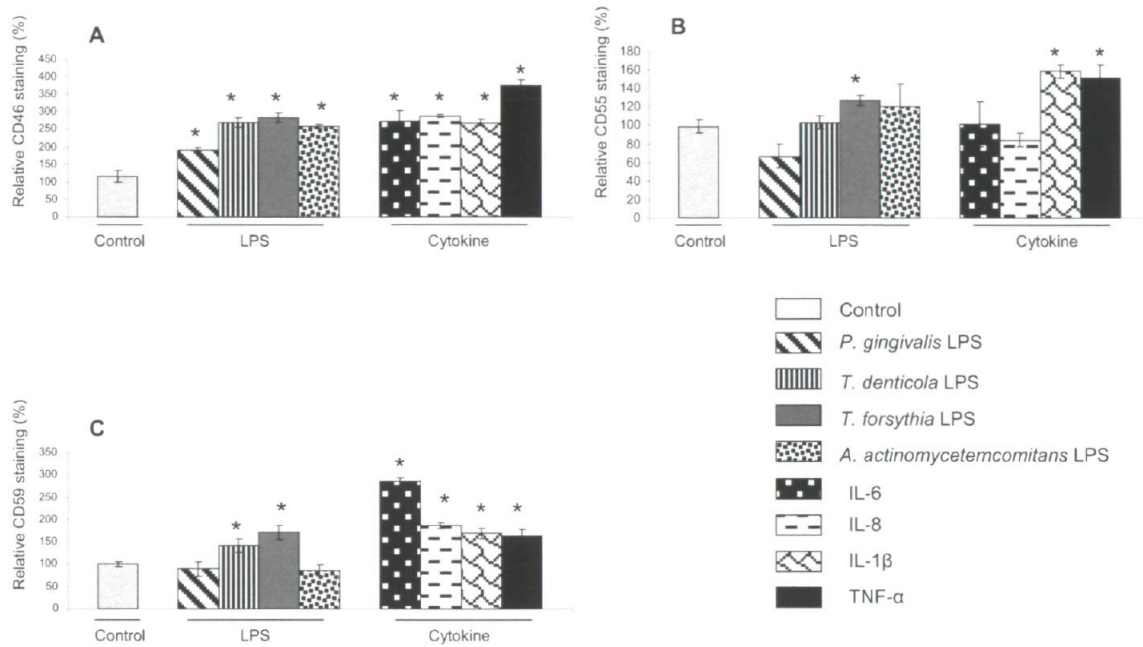


Figure 4.3. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 following treatments (48 h) with either periodontopathogen LPS (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*, or *A. actinomycetemcomitans*) or recombinant cytokines (IL-6, IL-8, IL-1 β , or TNF- α). Three separated fluorescence high power fields were analyzed in each condition. Data are expressed as means \pm standard deviations. *Significantly lower ($P < 0.01$) compared to untreated control cells.

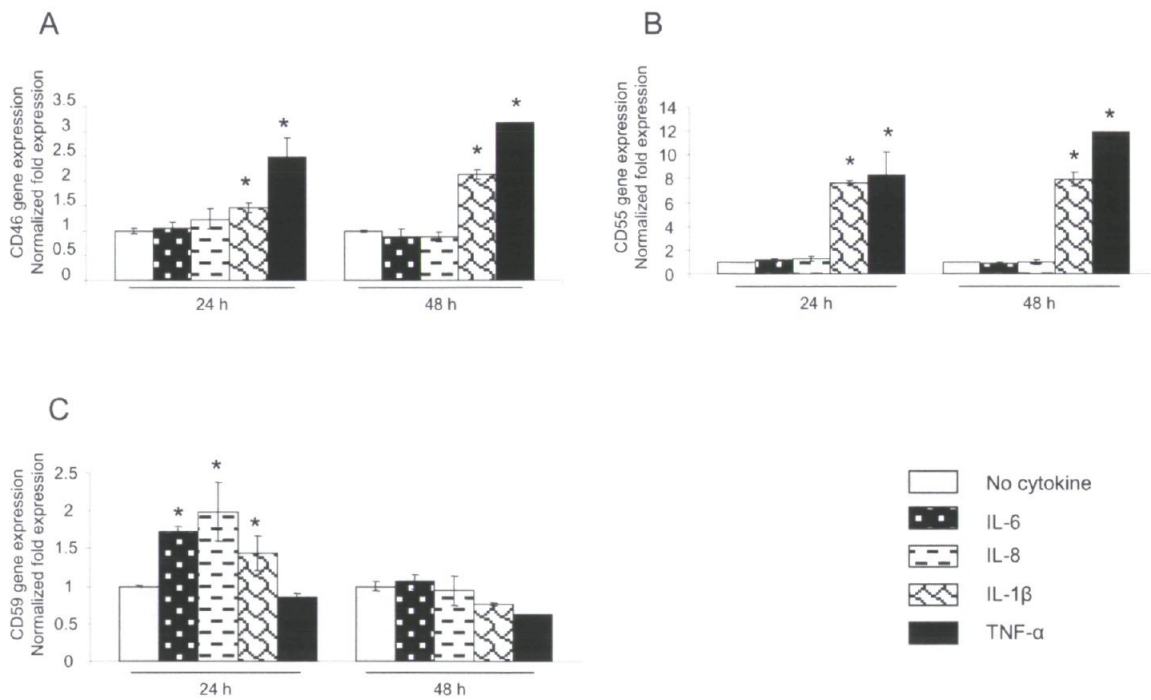


Figure 4.4. Effect of recombinant IL-6, IL-8, IL-1β, or TNF-α (50 ng mL⁻¹) on CRP gene expression by oral epithelial cells. Gene expression was quantified by real-time PCR. Results are presented as fold increases in the expression of the gene in test samples compared to the control. Panel A: CD46, Panel B: CD55, Panel C: CD59. * Significant increase (P < 0.05) compared to unstimulated control cells.

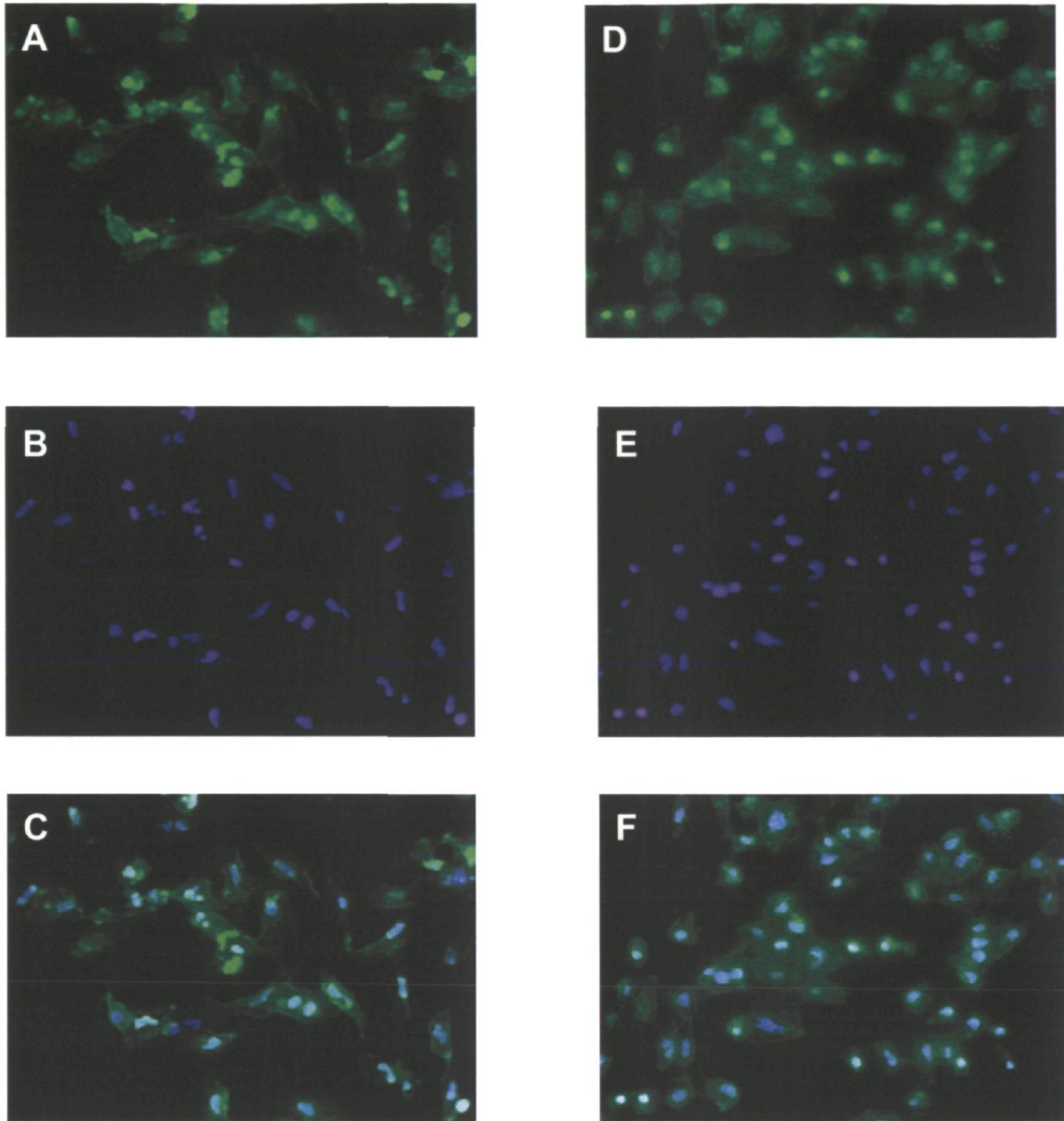


Figure 4.5. Immunofluorescence staining of epithelial cell surface CD46. Epithelial cells were treated (Panels D, E, and F) or not (Panels A, B, and C) with TNF- α (50 ng mL^{-1}). Panels A and D are CD46 staining (green). Panels B and E are DAPI-counterstained for DNA (blue). Panels C and F are merged images of CD46 and DNA staining. Images are representative of at least three independent experiments. Original magnification: 20 X.

CHAPITRE 5

Expression of membrane-bound complement regulatory proteins by oral epithelial cells and upregulation of their levels by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide

5.1 Résumé

Plusieurs évidences suggèrent que l'activation du complément se produit dans les sites parodontaux malades. Pour éviter des dommages involontaires suite à une activation du complément, les cellules hôtes expriment à leur surface des protéines régulatrices du complément (CRPs), incluant CD46 (*membrane cofactor protein*), CD55 (*decay accelerating factor*) et CD59 (*protectin*). Dans cette étude, nous avons étudié l'expression des CRPs au niveau du gène et de la protéine chez les cellules épithéliales buccales humaines stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) d'*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Les cellules épithéliales ont été stimulées ou non avec des concentrations croissantes (0.25 à 8 pg/ml) de LPS d'*A. actinomycetemcomitans*. L'expression des gènes codant pour les CRPs (CD46, CD55 et CD59) a été évaluée par

des analyses PCR quantitatives en temps réel après différents temps de stimulation (12, 24 et 48 h). En outre, l'expression des CRPs à la surface des cellules a été quantifiée par immunofluorescence. Les gènes et les protéines de surface CD46, CD55 et CD59 ont été exprimés à un niveau de base par les cellules épithéliales en fonction du temps. Les gènes codant pour CD46 et CD55, mais non pour CD59 ont été surexprimés d'une manière temps et dose dépendantes suite à un traitement avec le LPS d'*A. actinomycetemcomitans*. Les niveaux des protéines CD46 et CD55 à la surface des cellules épithéliales ont également été augmentés. En conclusion, le traitement des cellules épithéliales buccales avec le LPS d'*A. actinomycetemcomitans* est associé à une augmentation de l'expression de CD46 et CD55 tant au niveau du gène que de la protéine. Ces observations suggèrent que dans la poche parodontale infectée, les cellules épithéliales surexpriment les CRPs leur permettant d'éviter des dommages qui peuvent être induits par le complément.

5.2 Abstract

Objective and design: Several evidences suggest that complement activation occurs in diseased periodontal sites. To prevent unintended injury by activated complement, host cells express membrane-bound complement regulatory proteins (CRPs), including CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay accelerating factor), and CD59 (protectin). In this study, we investigated CRP expression at both transcriptional and translational levels in human oral epithelial cells as well as their upregulation by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide (LPS).

Methods: Oral epithelial cells were stimulated or not with increasing concentrations (0.25 to 8 µg/ml) of *A. actinomycetemcomitans* LPS. CRP gene expression (CD46, CD55, and CD59) was evaluated by real-time RT-PCR after various stimulation times (12, 24, and 48 h). In addition, cell surface CRPs were quantified by immunofluorescence microscopy.

Results: CD46, CD55, and CD59 genes and cell surface proteins were expressed at basal levels and time-dependently by epithelial cells. CD46 and CD55, but not CD59, genes were over-expressed in a dose-dependent manner following *A. actinomycetemcomitans* LPS treatment. Levels of epithelial cell surface CD46 and CD55 were also upregulated.

Conclusion: Oral epithelial cells constitutively express CRPs. Treatment of oral epithelial cells with *A. actinomycetemcomitans* LPS is associated with increased expression of CD46 and CD55 at both the transcriptional and translational levels. This suggests that in infected periodontal pockets, epithelial cells may respond by expressing CRPs in order to avoid complement-mediated damages.

5.3 Introduction

Periodontitis is an oral infection characterized by a destructive inflammatory process affecting the tooth supporting tissues. Although the infection is initiated by specific Gram-negative anaerobic bacteria that increase in numbers in subgingival sites, the host response to these bacteria and their products modulate periodontitis severity and progression [1]. More specifically, prevalence studies have associated *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* with localized aggressive periodontitis [2]. This bacterium produces several virulence factors which are involved in tissue colonization and invasion as well as in immune defense neutralization and bone destruction [2].

The human complement system plays an important role in the host defense against invading microorganisms. Once triggered, the complement cascade results in activation and proteolytic cleavage of different serum proteins via the classical, lectin, or alternative pathways [3]. Activated complement elicits potent biological activities by promoting inflammation as well as opsonisation and direct lysis of pathogens [3]. A number of evidences have suggested that complement activation occurs in periodontal sites [4]. The presence of a functional complement system in periodontal sites has been suggested on

the basis that gingival crevicular fluid harbors a complement-dependent haemolytic activity [5, 6]. In addition, activated complement components, including C3, C3a, C3b, C3c, C5, C5a, C5b, and C5c, have been detected in gingival crevicular fluid and chronically inflamed gingiva [5, 7-10].

Activated complement may be a double-edged sword since although it mediates the clearance of pathogens and apoptotic cells, it may also be potentially destructive for host tissues [11]. To avoid such complement-mediated tissue damages, most cell types express on their surface several complement regulatory proteins (CRPs), including membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55) and protectin (CD59) [11, 12]. CD46 protects host cells from complement attack by serving as a cofactor protein for factor I-mediated inactivation of the activated complement proteins C3b and C4b. CD55 possesses regulatory activity by preventing the formation of C3 and C5 convertases, while CD59 prevents the formation of the membrane attack complex (MAC) at the terminal step of the complement activation cascade. Interestingly, Rautemaa and Meri [10] brought evidence that CD59 is strongly expressed in the epithelium of the periodontium and that it may prevent MAC formation and tissue damages. Although CRPs are likely to play an important role in protection of cells in diseased periodontal sites, little is known regarding the regulation of their expression. Previously, we reported that LPS from various periodontopathogens as well as pro-inflammatory cytokines can upregulate CRP expression in oral epithelial cells [13]. In the present study, we further characterized the CD46, CD55, and CD59 gene/protein basal expression in oral epithelial cells as well as their upregulation mediated by *A. actinomycetemcomitans* LPS.

5.4 Materials and methods

5.4.1 LPS preparation

A. actinomycetemcomitans ATCC 29522 (serotype b) was grown at 37°C under anaerobic conditions (80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂) for 24 h in Todd-Hewitt broth (THB;

BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) supplemented with 0.001% hemin and 0.0001% vitamin K. LPS were isolated from this bacterial strain according to the protocol of Darveau and Hancock [14]. This method is based on protein digestion of a whole cell extract by proteinase K and successive solubilization and precipitation steps. The LPS preparation was freeze dried and kept at -20°C . The amount of contaminating protein was evaluated using a protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) with bovine serum albumin as a control and was less than 0.001%.

5.4.2 Cultivation and treatments of human oral epithelial cells

The immortalized human oral epithelial cell line GSMK-K [15] was kindly provided by V. Murrah (Department of Diagnostic Sciences and General Dentistry, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, NC, USA). The cells were maintained and cultured as monolayers in tissue culture flasks in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 4 mM L-glutamine (HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (DMEM-FBS), and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of penicillin-streptomycin in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C . The epithelial cells were harvested by gentle trypsinization (0.05% trypsin-EDTA; Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA), washed once with DMEM-FBS, suspended at a density of 0.5×10^6 cells per ml in DMEM-FBS, seeded in a 6-well plate (10^6 cells/well in 2 ml), and cultured overnight in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C to allow cell adhesion. The medium was then replaced by fresh DMEM supplemented with 1% heat-inactivated FBS prior to the epithelial cell treatments. Epithelial cells were treated or not for various periods of time (0, 12, 24, and 48 h) with various concentrations of *A. actinomycetemcomitans* LPS (0.25, 1, 4 and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

5.4.3 Real-time RT-PCR analysis for expression of CD46, CD55 and CD59 genes

Total RNA was isolated from untreated and treated epithelial cells using RNeasy Plus mini kits (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. The quality and quantity of the RNA were assayed using the Experion system and RNA StdSens analysis kit according to the manufacturer's specifications (Bio-Rad Laboratories). The reverse transcription-polymerase chain reaction analysis (RT-PCR) was performed as follows. RNA from each sample (1 µg) was reverse-transcribed using Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Mississauga, ON, Canada) and random hexamers (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Reverse transcription conditions were 10 min at 65°C, 1 h at 37°C, and 10 min at 65°C. The amounts of mRNA transcript were measured using the Bio-Rad CFX96 RT-PCR detection system (Bio-Rad Laboratories). Triplicate reactions were prepared with 25 µl of PCR mixture containing 12.5 µl of IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories), 5 µl of cDNA, 0.5 µl of gene-specific primer (CD46, CD55, CD59), and 7 µl of RNase- and DNase-free water (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA). The sequences of the primers (Invitrogen Life Technologies) used for the RT-PCR are listed in Table 1. The samples were amplified using a Bio-Rad MyCycler™ thermal cycler (Bio-Rad Laboratories). The amplification conditions for CD46, CD55 and CD59 were 95°C for 3 min followed by 35 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 72°C for 30 s. Glycerate-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used as an internal control.

5.4.4 Immunofluorescence analysis for cell surface CD46, CD55 and CD59

Untreated and LPS-treated epithelial cells were fixed in phosphate-buffered saline (PBS)-4% paraformaldehyde for 30 min. They were incubated for 1 h in PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) and then with rabbit anti-CD46, anti-CD55, or anti-CD59 polyclonal antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in PBS-1% BSA (1 h) followed by Alexa fluor 555-conjugated, goat anti-rabbit IgG

polyclonal antibody (1:200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in PBS-1% BSA (1 h). The nuclei was visualized by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining (Molecular Probes). After washing with PBS, the cells were examined using an Olympus FSX100 fluorescence microscope and FSX-BSW imaging software (Olympus, Tokyo, Japan). Epithelial cells incubated with Alexa fluor 555-conjugated secondary antibody alone were included as non-specific staining controls. Assays were performed in triplicate. Image analysis was performed using Image J v3.91 software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). Three high power fields were selected for analysis of each tested condition. For each high power field consisting of 5-6 confluent epithelial cells, binary image masks of CRPs and DAPI positive staining were created for analysis. Each image was converted to a binary mask that included all fluorescence data above background. The DAPI staining mask was used to define the cell-surface CRPs. Using the image calculator, the DAPI mask was subtracted from the CRPs and DAPI mask to create a staining mask defining the cell surface CRPs in untreated and LPS-treated epithelial cells. Quantitative fluorescence data were exported from Image J into Microsoft Excel software and calculated as the means \pm standard deviations (SD) of cell-surface CRP fluorescence of three individual high power fields. Data were presented as relative staining of cell-surface CRP in LPS-treated epithelial cells and compared to untreated control (100%).

5.4.5 Statistical analysis

All treatments were performed in triplicate. Differences between means were analyzed for statistical significance using the Student's t-test and were considered significant at $P < 0.01$.

5.5 Results

CD46, CD55 and CD59 were expressed at gene and protein levels by non-stimulated oral epithelial cells (Figures 5.1 and 5.2). Over a period of 48 h, a time-dependent increase in gene/protein expression of all three CRPs was observed.

Following a 48-h incubation, the gene expression for CD46, CD55 and CD59 in non-treated epithelial cells increased by 2.1-, 5.25-, and 2.7-fold, respectively, compared to time 0 h (Figure 5.1). Concomitantly, cell surface CD46, CD55, and CD59 increased by 5-, 6-, and 6.1-fold, respectively (Figure 5.2).

The kinetics of induction of CRP gene/protein expression in oral epithelial cells by *A. actinomycetemcomitans* LPS were first assessed using a concentration of 1 $\mu\text{g/ml}$ with stimulation times of 12, 24, and 48 h. Figure 5.1 shows that LPS treatment induced CD46 gene expression in epithelial cells. More specifically, at 24- and 48-h post-treatments, LPS of *A. actinomycetemcomitans* increased gene expression by 1.4- and 1.38-fold, respectively, in comparison with untreated cells. Cell surface CD46 was also significantly increased following a 24 h (1.7-fold) and 48 h (2.15-fold) treatment of epithelial cells with LPS (Figure 5.2). Regarding CD55, gene expression increased by 1.5- and 1.3-fold following LPS treatment for 24 h and 48 h, respectively, when compared to untreated cells (Figure 5.1). As observed for CD46, cell surface CD55 was increased following a 24 h (2.1-fold) and 48 h (1.8-fold) treatment of epithelial cells with *A. actinomycetemcomitans* LPS (Figure 5.2). Lastly, CD59 gene/protein expression levels in LPS-treated epithelial cells were not significantly different compared to untreated cells (Figures 5.1 and 5.2).

Thereafter, we examined whether stimulation of epithelial cells with *A. actinomycetemcomitans* LPS increases CRP gene/protein expression in a dose-dependent manner. For this purpose, oral epithelial cells were treated with different concentrations of LPS (0.25, 1, 4, and 8 $\mu\text{g/ml}$) during 24 h. As reported in Figure 5.3, treatment of epithelial cells with LPS was associated with a concentration-dependent increase in gene expression of both CD46 and CD55. On the contrary, at up to 4 $\mu\text{g/ml}$, LPS of *A. actinomycetemcomitans* had no effect on CD59 gene expression as compared to untreated cells. At the highest concentration used (8 $\mu\text{g/ml}$), LPS increased CD46, CD55, and CD59 gene expression by 2.9-, 2.6-, and 2-fold, respectively, as compared to untreated cells. The effect of increasing concentrations of *A. actinomycetemcomitans* LPS on epithelial cell surface CD46, CD55, and CD59 proteins was also investigated by

immunofluorescence. The quantitative analysis showed that surface-associated CD46 and CD55 was dose-dependently increased by LPS at up to 4 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 5.4). At 4 $\mu\text{g/ml}$, cell surface CD46 and CD55 was increased by 3-, and 2.8-fold. However, when LPS was used at 8 $\mu\text{g/ml}$, cell surface CD46 and CD55 were decreased compared to the treatment with 4 $\mu\text{g/ml}$. Figure 5.5 shows that at time 24 h, CD46 was uniformly distributed on the surfaces of untreated oral epithelial cells, while treatment with *A. actinomycetemcomitans* LPS (4 $\mu\text{g/ml}$) induced a significant increase of cell surface CD46. Similar observations were obtained for cell surface CD55 (data not shown). Regarding CD59, treating epithelial cells with *A. actinomycetemcomitans* LPS at up to 8 $\mu\text{g/ml}$ did not cause any significant increase in the levels on the cell surface compared to untreated cells (Figure 5.4).

5.6 Discussion

LPS, an integral component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, is considered as an important virulence factor of periodontopathogens [19]. In particular, the LPS of *A. actinomycetemcomitans*, the major etiological agent in localized aggressive periodontitis [2], has been shown to be a potent inducer of the secretion of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases by host cells, a phenomenon that may modulate periodontal tissue destruction [20, 21]. In addition, using an experimental rat model, Rogers *et al.* [22] reported that the LPS of *A. actinomycetemcomitans* can induce severe bone loss associated with pro-inflammatory cytokine secretion. In this study, we characterized the ability of *A. actinomycetemcomitans* LPS to induce in oral epithelial cells the expression at transcriptional and translational levels of specific proteins (CD46, CD55, and CD59) involved in complement regulation.

The complement system consists of serum proteins with the capacity to interact with themselves and with membrane proteins, following stimulation and activation, and to cause lysis of the target bacteria [3]. Excessive activation of the complement system may be deleterious for the host by directly and indirectly mediating inflammatory tissue

destruction [11]. Therefore, the regulation of the complement by serum proteins or by membrane-bound proteins, including CD46, CD55, and CD59, is very important. Preliminary data from a previous study indicated the ability of *A. actinomycetemcomitans* LPS to modulate the expression of CRPs in epithelial cells [13]. In this study, we further characterized the CD46, CD55, and CD59 gene/protein basal expression in oral epithelial cells as well as their upregulation mediated by *A. actinomycetemcomitans* LPS. We first demonstrated that CD46, CD55 and CD59 are constitutively expressed by oral epithelial cells and that their expression is time-dependent over a 48-h period of incubation. Our results showed an increase in the expression of CD46 and CD55 by epithelial cells, in a dose and time-dependent manner, in response to a stress induced by *A. actinomycetemcomitans* LPS. Such effect was not observed for CD59. The ability of *A. actinomycetemcomitans* LPS to upregulate CD46 and CD55 expression may be related to its capacity to induce IL-6 and IL-8 secretion by epithelial cells [13]. Indeed, it has been previously reported that these pro-inflammatory cytokines can modulate CRP expression in epithelial cells [13].

On the one hand, this increase in CRP expression mediated by LPS of *A. actinomycetemcomitans* could be interpreted as a mechanism of defense of oral epithelial cells against complement-mediated cytolysis in order to maintain the integrity of epithelium. On the other hand, this phenomenon may have a tissue damaging effect and contribute to the pathological process of periodontitis since we previously brought evidence that *Fusobacterium nucleatum* can interact with epithelial cell-surface CD46 and induce a significant upregulation of cytokine and MMP expression at both gene and protein levels [23]. Furthermore, *Porphyromonas gingivalis* can induce the shedding of epithelial cell membrane-anchored CD46, which in turn can upregulate cytokine secretion [24].

5.7 Acknowledgments

This study was supported by the Canadian Institutes of Health Research.

5.8 References

1. Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2010;8:481-90.
2. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontol* 2000 2010;54:78-105.
3. Volanakis JE, Frank M. *The Human Complement System in Health and Disease*. 1998; New York: Marcel Dekker.
4. Hajishengallis G. Complement and periodontitis. *Biochem Pharmacol* 2010;80:1992-2001.
5. Courts FJ, Boackle RJ, Fudenberg HH, Silverman MS. Detection of functional complement components in gingival crevicular fluid from humans with periodontal diseases. *J Dent Res* 1977;56:327-31.
6. Boackle RJ. The interaction of salivary secretions with the human complement system – a model for the study of host defense systems on inflamed mucosal surfaces. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:355-67.
7. Patters MR, Niekrash CE, Lang NP. Assessment of complement cleavage in gingival fluid during experimental gingivitis in man. *J Clin Periodontol* 1989;16:33-7.
8. Lally ET, McArthur WP, Baehni PC. Biosynthesis of complement components in chronically inflamed gingival. *J Periodontal Res* 1982;17:257-62.
9. Nikolopoulou-Papaconstantinou AA, Johannessen AC, Kristoffersen T. Deposits of

immunoglobulins, complement, and immune complexes in inflamed human gingival. Acta Odontol Scand 1987;45:187-93.

10. Rautemaa R, Meri S. Protection of gingival epithelium against complement-mediated damage by strong expression of the membrane attack complex inhibitor protectin (CD59). J Dent Res 1996;75:568-74.

11. Zipfel PF, Skerka C. Complement regulators and inhibitory proteins. Nat Rev Immunol 2009;9:729-40.

12. Miwa T, Song WC. Membrane complement regulatory proteins: insight from animal studies and relevance to human diseases. Int Immunopharmacol 2001;1:445-59.

13. Mahtout H, Curt S, Chandad F, Rouabhia M, Grenier D. Effect of periodontopathogen lipopolysaccharides and proinflammatory cytokines on CD46, CD55, and CD59 gene/protein expression by oral epithelial cells. FEMS Immunol Med Microbiol 2011;62:295-303.

14. Darveau RP, Hancock RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J Bacteriol 1983;155:831-38.

15. Gilchrist EP, Moyer MP, Shillitoe EJ, Clare N, Murrah VA. Establishment of a human polyclonal oral epithelial cell line. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000;90:340-47.

16. Buettner R, Huang M, Gritsko T, Karras J, Enkemann S, Mesa T, Nam S, Yu H, Jove R. Activated signal transducers and activators of transcription 3 signaling induces CD46 expression and protects human cancer cells from complement-dependent cytotoxicity. Mol Cancer Res 2007;5:823-32.

17. Yang P, Tyrrell J, Han I, Jaffe GJ. Expression and modulation of RPE cell membrane complement regulatory proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3473-481.
18. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 2004;191:1678-687.
19. O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC. Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol 2000* 2004;35:101-34.
20. Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol* 2007;212:189-94.
21. La VD, Tanabe S, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Modulation of matrix metalloproteinase and cytokine production by licorice isolates licoricidin and licorisoflavan A: potential therapeutic approach for periodontitis. *J Periodontol* 2001;82:122-28.
22. Rogers JE, Li F, Coatney DD, Rossa C, Bronson P, Krieder JM, Giannobile WV, Kirkwood KL. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide-mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2007;78:550-58.
23. Mahtout H, Chandad F, Rojo JM, Grenier D. *Fusobacterium nucleatum* binding to complement regulatory protein CD46 modulates the expression and secretion of cytokines and matrix metalloproteinases by oral epithelial cells. *J Periodontol* 2011;82:311-19.
24. Mahtout H, Chandad F, Rojo JM, Grenier D. *Porphyromonas gingivalis* mediates the

shedding and proteolysis of complement regulatory protein CD46 expressed by oral epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 2009;24:396-400.

Tableau 5.1. Primers used in the real-time PCR analysis.

Gene	Sequence (5'-3')	Reference
CD46	F TGGTGACAATTCAGTGTGGAGTC	[16]
	R CCTGATATCTGTTTTCCATTTTCGA	
CD55	F AGGCATTTTCATCTTTCCTTCGGG	[17]
	R CCTTATCACCATCAACACCCCTGG	
CD59	F GAGCCCAGGGAGGGAAAGGTTC	[17]
	R GGAGGTTAAGGCAAACCCTACG	
GAPDH	F GGTATCGTCGAAGGACTCATGAC	[18]
	R ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	

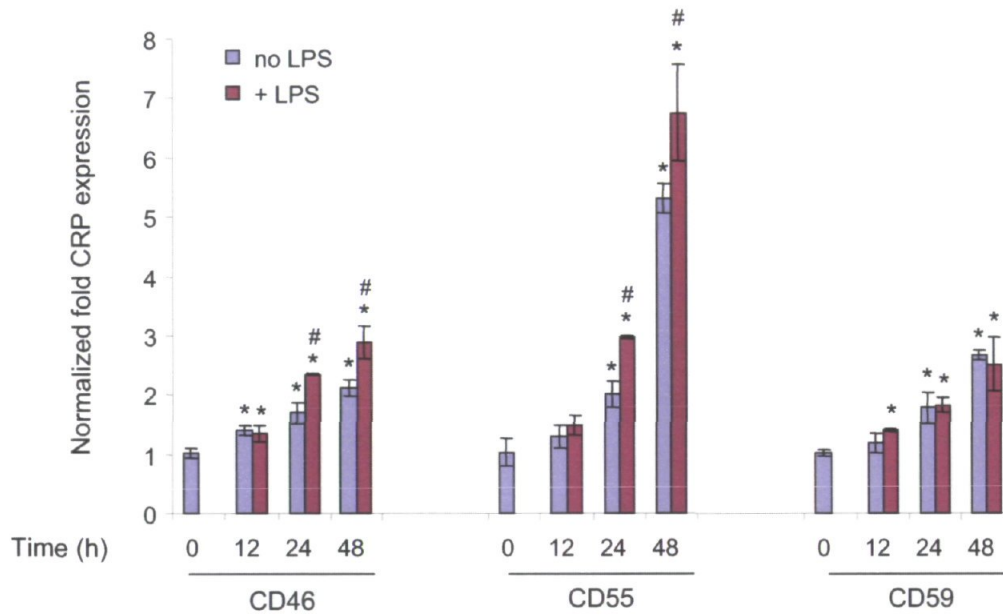


Figure 5.1. Effect of *A. actinomycetemcomitans* LPS on CRP gene expression by oral epithelial cells. Epithelial cells were treated with LPS (1 μ g/ml) were incubated for various periods of times (0, 12, 24 and 48 h). Gene expression was quantified by real-time RT-PCR. *, Significant increase ($P < 0.01$) compared to time 0 h; #, Significant increase ($P < 0.01$) compared to non-stimulated control cells.

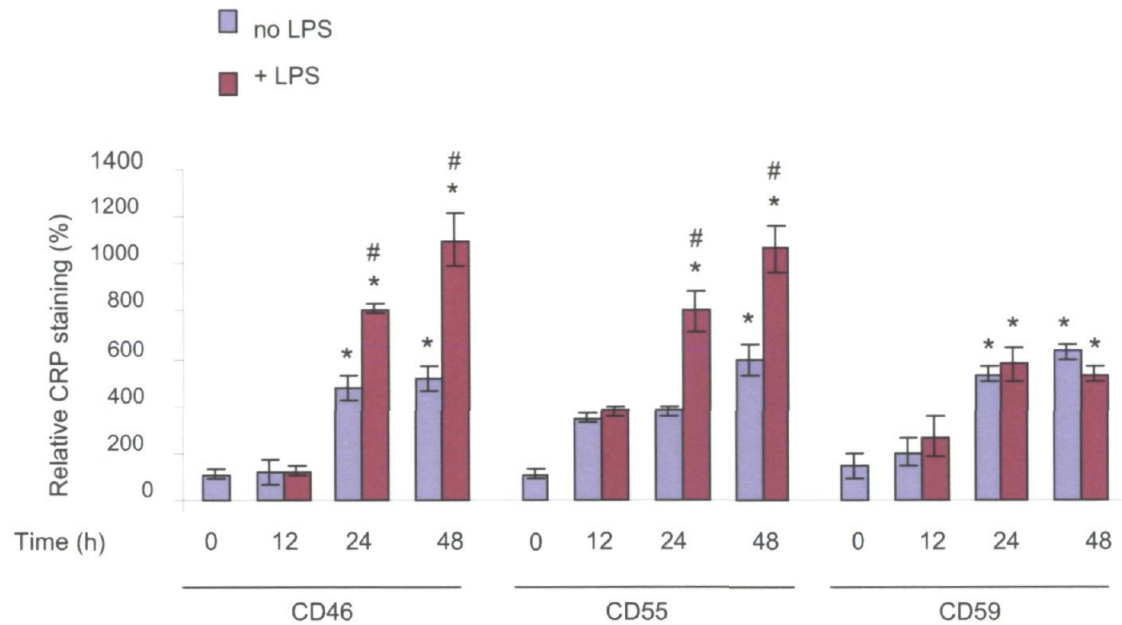


Figure 5.2. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 in oral epithelial cells treated or not with *A. actinomycetemcomitans* LPS (1 μ g/ml) for 0, 12, 24, and 48 h. Three separated fluorescence high power fields were analyzed in each condition. Data are expressed as means \pm standard deviations. *, Significant increase ($P < 0.01$) compared to time 0 h; #, Significant increase ($P < 0.01$) compared to non-stimulated control cells.

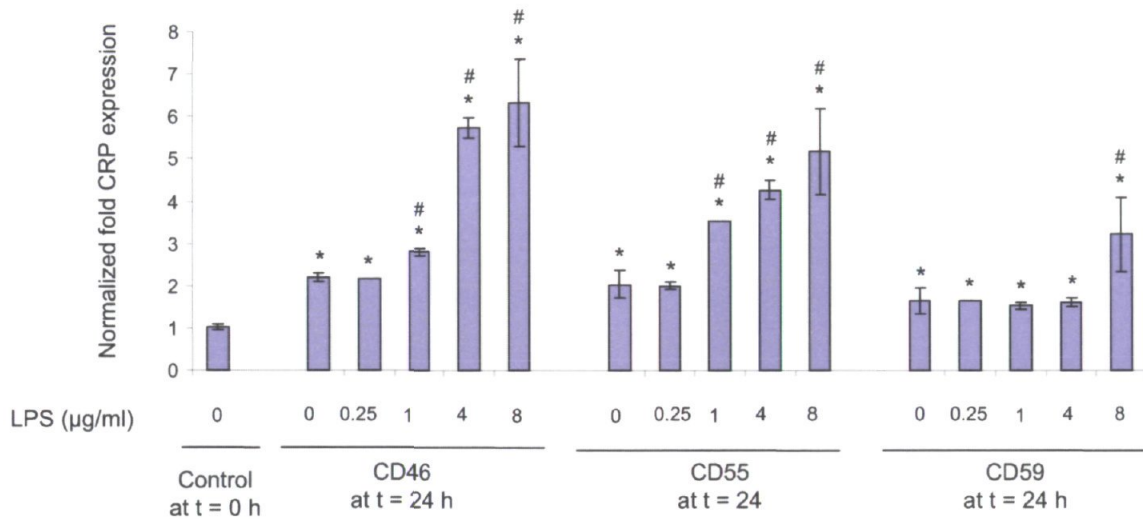


Figure 5.3. Effect of *A. actinomycetemcomitans* LPS on CRP gene expression by oral epithelial cells. Epithelial cells were treated with LPS (0, 0.25, 1, 4 and 8 µg/ml) for 0 and 24 h. Gene expression was quantified by real-time RT-PCR. *, Significant increase ($P < 0.01$) compared to time 0 h; #, Significant increase ($P < 0.01$) compared to non-stimulated control cells.

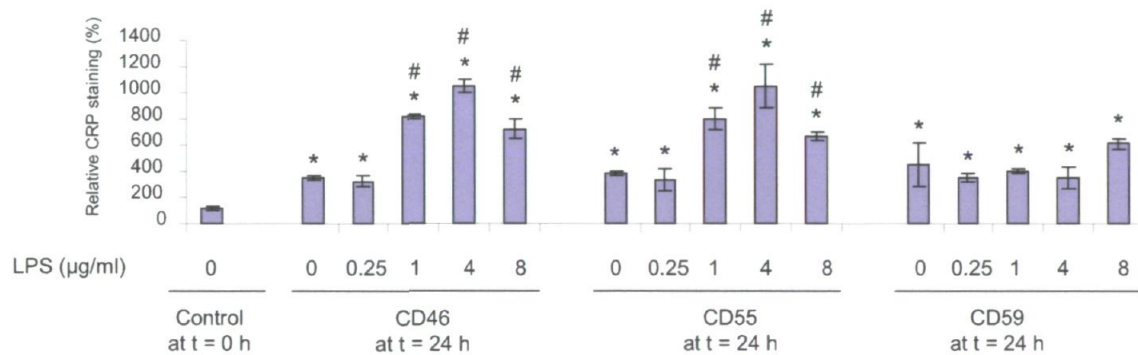


Figure 5.4. Quantitative analysis of surface-associated CD46, CD55, and CD59 in oral epithelial cells treated with *A. actinomycetemcomitans* LPS (0, 0.25, 1, 4 and 8 µg/ml) for 0 and 24 h. Three separated fluorescence high power fields were analyzed in each condition. Data are expressed as means ± standard deviations. *, Significant increase ($P < 0.01$) compared to time 0 h; #, Significant increase ($P < 0.01$) compared to non-stimulated control cells.

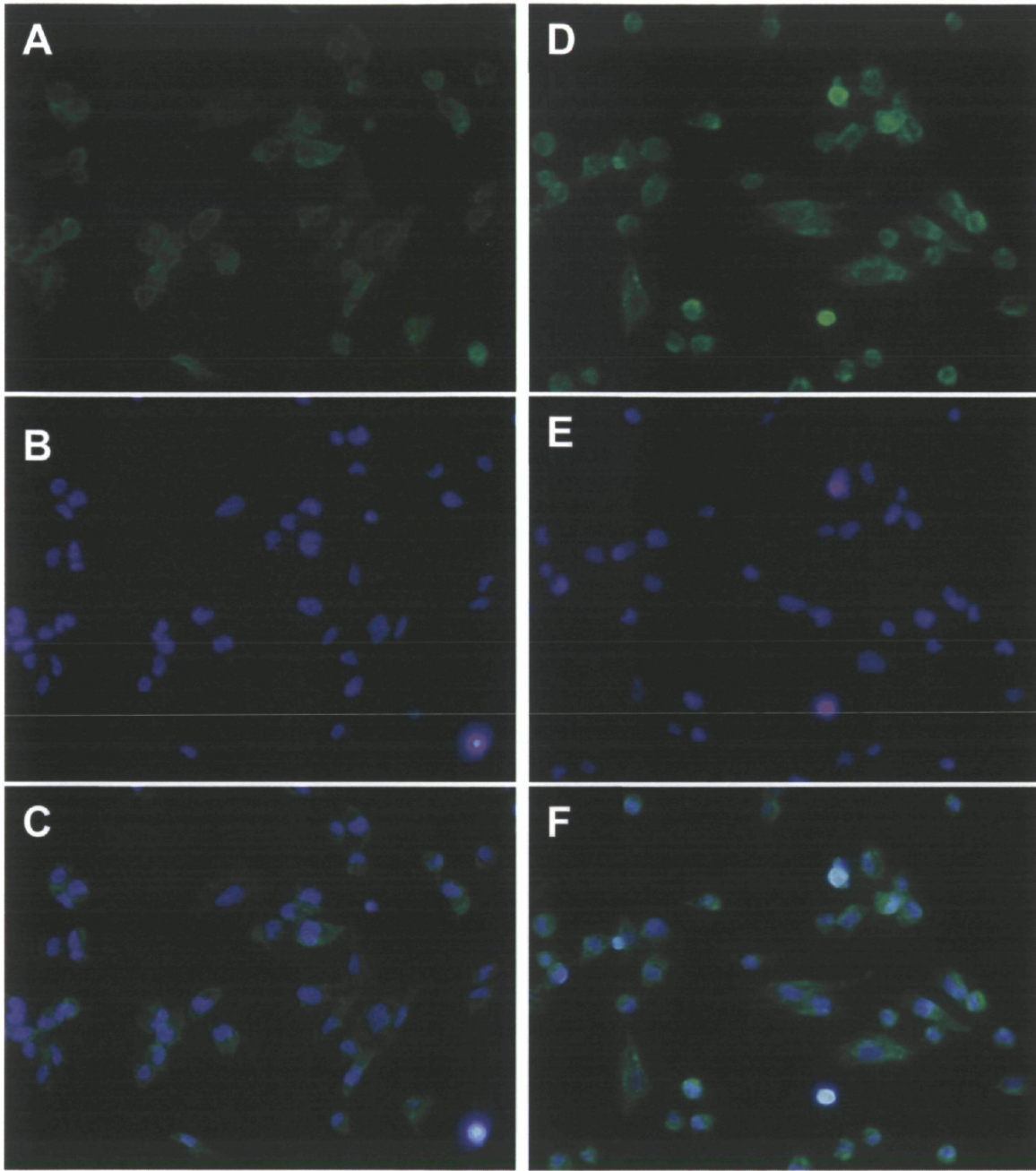


Figure 5.5. Immunofluorescence staining of epithelial cell surface CD46. Epithelial cells were treated (Panels D, E, and F) or not (Panels A, B, and C) with *A. actinomycetemcomitans* LPS (4 µg/ml). Panels A and D are CD46 staining (green). Panels B and E are DAPI-counterstained for DNA (blue). Panels C and F are merged images of CD46 and DNA staining. Images are representative of at least three independent experiments. Original magnification: 20 X.

CHAPITRE 6

DISCUSSION

La progression et la sévérité des maladies parodontales dépendent de la virulence des bactéries parodontopathogènes et de la réponse immuno-inflammatoire de l'hôte (Kinane, 2001; Kinane and Lappin, 2001; Okada and Murakami, 1998). Le système du complément est l'un des éléments importants de la réaction immunitaire qui intervient dans les sites parodontaux et qui peut contribuer au maintien de la santé parodontale (Ebersole, 2003). Des composantes actives du complément (C4a, C3b, C5a) ont déjà été identifiées dans le fluide crévicaire des patients atteints de parodontites (Schenkein and Genco, 1977). Les protéines du complément sont activées en cascade à la suite de leur interaction avec les composantes bactériennes. Cette activation mène à une inflammation contrôlée et une neutralisation des pathogènes. Cependant, un mauvais fonctionnement ou l'hyperactivation du système du complément peut mener à diverses maladies inflammatoires et auto-immunes. Pour se protéger de l'effet délétère du complément, les cellules de l'hôte expriment à leur surface des protéines régulatrices du complément dont CD46, CD55 et CD59. Ces molécules sont exprimées par toutes les cellules de mammifères à l'exception des érythrocytes et jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la réponse immunitaire innée du système du complément. La capacité des bactéries

parodontopathogènes à échapper à ce système de défense est un facteur déterminant pour leur survie, leur persistance et pour l'expression de leur pouvoir pathogénique. Cette étude s'est intéressée à la capacité de certaines bactéries parodontopathogènes, notamment *F. nucleatum* et *P. gingivalis*, à interagir avec les protéines régulatrices du complément (CD46, CD55 et CD59). Ces deux espèces bactériennes, en plus d'être associées aux parodontites, ont été isolées de diverses infections extrabuccales. Un modèle de cellules épithéliales buccales en culture a été utilisé pour réaliser cette étude. Les cellules épithéliales buccales constituent une barrière entre les microorganismes et le tissu conjonctif gingival. De plus, elles secrètent des cytokines inflammatoires, des prostaglandines et des MMPs en réponse à la stimulation bactérienne (Dale, 2002; Kagnoff and Eckmann, 1997), ce qui peut contribuer à la progression des maladies parodontales.

Dans un premier temps, nous avons montré que *P. gingivalis* a la capacité de détacher le CD46 de la surface des cellules épithéliales. *P. gingivalis* exprime plusieurs facteurs de virulence, notamment les protéases Lys- et Arg-gingipaines qui sont responsables de la presque totalité des activités protéolytiques de la bactérie. Nous avons observé une diminution de la quantité de la protéine CD46 associée à la surface des cellules épithéliales suivant une stimulation avec *P. gingivalis*. Ce phénomène était accompagné d'une augmentation de la concentration de CD46 dans le surnageant de ces cultures cellulaires. Le largage de CD46 de la surface des cellules serait médié par l'action protéolytique des gingipaines. Des études antérieures ont déjà démontré que ces enzymes participent au détachement de plusieurs récepteurs de surface comme le syndecan 1, corécepteur pour divers facteurs de croissance retrouvé sur les cellules épithéliales (Andrian et al., 2006b), et le CD14, récepteur de LPS présent chez les macrophages (Duncan et al., 2004). Un phénomène similaire de largage de CD46 a été démontré chez d'autres pathogènes, notamment chez *Streptococcus pyogenes* et *Neisseria gonorrhoeae* (Gill et al., 2005; Lovkvist et al., 2008). Il est à souligner qu'un largage spontané de CD46 a été rapporté chez les cellules cancéreuses et les cellules apoptotiques (Elward et al., 2005; Hakulinen et al., 2004).

La perte de CD46 induite par *P. gingivalis* pourrait rendre les cellules épithéliales susceptibles à une autolyse par le complément, tel que précédemment rapporté (Elward et al., 2005). En effet, les cellules nécrotiques des kératinocytes deviennent la cible du complexe d'attaque membranaire (MAC) suite à un détachement du CD46 de la surface des cellules. De même, une lyse des monocytes par le complément a été observée, suite à une baisse de CD46 membranaire induite par une infection par le virus de la rougeole (Schnorr et al., 1995). Conséquemment à la perte de CD46 par les cellules épithéliales et à l'autolyse du complément, l'infiltration des parodontopathogènes à travers ces cellules serait facilitée. Ceci favoriserait la dissémination des bactéries plus profondément dans les tissus parodontaux. Enfin, nous avons montré que *P. gingivalis* a la capacité de dégrader la protéine CD46 soluble. L'intensité de la dégradation est dépendante de la dose bactérienne utilisée. Des résultats similaires ont été observés en utilisant les protéases Lys- et Arg-gingipaines purifiées de *P. gingivalis*.

Notre étude a montré pour la première fois que la protéine CD46 recombinante induit la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales. L'IL-8 est une chimiokine qui augmente l'afflux des leucocytes phagocytaires au site d'infection (Jin et al., 2002). Elle est présente en grande quantité dans le fluide crévulaire et les tissus parodontaux des patients atteints de parodontites (Jin et al., 2002; Mathur et al., 1996). Ces données suggèrent que le CD46 détaché des cellules épithéliales pourrait avoir un effet déterminant dans l'évolution de l'inflammation observée lors des parodontites, en stimulant les cellules hôtes à sécréter des médiateurs inflammatoires. Ceci augmenterait l'inflammation dans les tissus gingivaux, favorisant ainsi la réponse immunodestructrice de l'hôte.

L'adhérence des bactéries parodontopathogènes aux cellules épithéliales est une étape cruciale qui permet à ces pathogènes de coloniser et d'infiltrer les tissus gingivaux profonds. *F. nucleatum* a pu être observé à l'intérieur des cellules épithéliales (Han et al., 2000; Ji et al., 2010). L'internalisation dans les cellules épithéliales permet aux bactéries d'échapper aux défenses de l'hôte ainsi qu'à l'effet des antibiotiques locaux. Pour être internalisées dans les cellules hôtes, les bactéries doivent d'abord s'attacher aux surfaces

cellulaires. Au cours de notre étude, nous avons montré que *F. nucleatum* a la capacité de lier à sa surface la protéine CD46 ce qui pourrait favoriser son internalisation. Cette liaison est spécifique et n'a pu être mise en évidence chez une autre bactérie buccale utilisée comme contrôle (*S. gordonii*). Cette spécificité de liaison pourrait être due à la présence de récepteurs sur *F. nucleatum* exclusifs à la protéine CD46. En effet, il a été rapporté que *S. pyogenes* exprime à sa surface la protéine M, capable de lier le CD46 (Rezcallah et al., 2005). De même, *E. coli* lie la protéine CD46 par l'intermédiaire d'une protéine présente sur les fimbriae de type 1, alors que *N. gonorrhoeae* exprime à sa surface un pili comme récepteur de CD46 (Kallstrom et al., 2001; Li et al., 2006).

Nous avons également montré *in vitro* que *F. nucleatum* lié à CD46 induit le clivage de C3b par le facteur I. Ceci empêcherait le dépôt de C3b sur *F. nucleatum*, inhibant ainsi la formation de la C3 convertase sur la surface de la bactérie. Cela suggère un nouveau mécanisme utilisé par *F. nucleatum* pour échapper à l'effet bactéricide du complément. En effet, il a été montré que la liaison à CD46 modifie la réponse immunitaire de l'hôte en faveur de certains microorganismes comme le virus de la rougeole, *S. pyogenes* et *N. gonorrhoeae* (Gill et al., 2005; Lovkvist et al., 2008).

La destruction tissulaire observée au cours des parodontites est due en grande partie à la réponse immunitaire de l'hôte (Eley and Cox, 2003). En effet, les cellules (résidentes et immunes) de l'hôte sécrètent de nombreuses cytokines inflammatoires, notamment IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α , en réponse à la stimulation continue par les parodontopathogènes (Bodet et al., 2006; Holt and Ebersole, 2005). Ces médiateurs inflammatoires permettent d'activer diverses voies de dégradation tissulaire modulant la progression et la sévérité des parodontites. Nous avons évalué la réponse des cellules épithéliales suite à une stimulation par *F. nucleatum*. Cette dernière bactérie a induit la sécrétion de fortes quantités d'IL-6, IL-8 et MMP-9 par les cellules épithéliales. En revanche, un pré-traitement des cellules épithéliales avec un anticorps neutralisant le récepteur CD46 a permis de réduire significativement cette sécrétion d'IL-6, IL-8 et MMP-9. Ces données suggèrent que la liaison de *F. nucleatum* au récepteur CD46 pourrait être impliquée dans l'induction de cette réponse inflammatoire chez les cellules

épithéliales, un processus qui pourrait contribuer au maintien de l'état inflammatoire observé lors de parodontites. En effet, des études ont rapporté que CD46 peut jouer un rôle anti- ou pro-inflammatoire dépendamment du type d'isoformes (CD46-1 ou CD46-2) exprimé par les lymphocytes T. CD46 a un effet sur la voie de signalisation qui mène à une réponse immunitaire spécifique en agissant sur l'immunité cellulaire (Marie et al., 2002; Russell, 2004).

Dans cette étude, nous avons également évalué la régulation de l'expression des CRPs (gène/protéine) par le LPS d'importants parodontopathogènes et de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles sont présentes en fortes quantités dans les sites parodontaux atteints de parodontite (Okada and Murakami, 1998). Il est à souligner qu'aucune étude n'avait encore évalué jusqu'à ce jour l'expression des CRPs à la surface des cellules épithéliales suivant une stimulation par des parodontopathogènes ou leurs facteurs de virulence. Dans un premier temps, nous avons démontré que le LPS des parodontopathogènes pouvait moduler les niveaux d'expression de CD46, CD55 et CD59. Cette modulation était dépendante de la dose du LPS utilisé et du temps de stimulation. Nous avons observé que parmi les LPS testés, celui de *T. forsythia* induisait une importante régulation des trois CRPs (gène et protéine). Nous avons également montré que les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-8, IL-1 β et TNF- α) ont un effet sur les niveaux d'expression des CRPs (gène et protéine). Il est à souligner que ces cytokines sont sécrétées soit par les cellules épithéliales (IL-6, IL-8) ou soit par les macrophages (IL-1 β et TNF- α) (Bodet et al., 2006). Nous avons noté une surexpression de CD46 suite à une stimulation des cellules épithéliales par chacun des LPS ou des cytokines recombinantes. Cette surexpression pourrait avoir deux conséquences. D'un côté, elle pourrait contribuer à la protection des cellules épithéliales contre les effets néfastes du complément, en agissant comme cofacteur au facteur I et provoquant le clivage de C3b et C4b. D'un autre côté, elle pourrait également avoir un effet délétère en contribuant à l'augmentation du processus inflammatoire lors des parodontites, en favorisant l'adhérence de *F. nucleatum* ou en permettant une plus grande libération de CD46 soluble via l'action de *P. gingivalis*.

Le LPS de *T. forsythia* ainsi que les cytokines IL-1 β et TNF- α ont augmenté significativement l'expression du CD55 à la surface des cellules épithéliales. Cette augmentation aurait comme effet d'inhiber la formation de C3 convertase et protéger les cellules hôtes d'une lyse par le complément. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Mason et al., (1999). En effet, ces auteurs ont rapporté que le TNF- α induit la surexpression du CD55 chez les cellules endothéliales. En ce qui concerne le CD59, son niveau d'expression est augmenté suite à un traitement des cellules épithéliales par le LPS (*T. denticola* et *T. forsythia*) ou par les cytokines, plus spécifiquement l'IL-6. La surexpression du CD59 inhiberait la formation du complexe d'attaque membranaire à la surface des cellules hôtes, empêchant ainsi la lyse par le complément. Nous avons également démontré que la régulation des CRPs par le LPS d'*A. actinomycetemcomitans* est dépendante de la dose de traitement et du temps de stimulation des cellules épithéliales. L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression des CRPs à la surface des cellules hôtes, suite à une stimulation d'origine bactérienne ou par les cytokines pro-inflammatoires, pourrait avoir un rôle protecteur contre une autolyse par le complément.

En résumé, dans le premier objectif de cette étude, nous avons démontré que *P. gingivalis* était capable d'induire le largage de la protéine CD46 de la surface des cellules épithéliales et/ou de causer sa protéolyse. Tel que résumé dans la figure 6.1, ce phénomène peut avoir diverses conséquences. D'une part, il pourrait rendre les cellules épithéliales susceptibles à une autolyse par le complément. De plus, la protéine CD46 larguée pourrait stimuler les cellules épithéliales à sécréter des médiateurs inflammatoires. La réponse inflammatoire d'autres types cellulaires (fibroblastes, macrophages) suite à une stimulation par CD46 pourrait faire l'objet d'études additionnelles. Ainsi, l'autolyse par le complément et l'inflammation des tissus épithéliaux pourrait contribuer à la destruction des tissus gingivaux lors d'une parodontite. D'autre part, la protéine CD46 larguée de la surface cellulaire pourrait se lier à d'autres bactéries parodontopathogènes leur permettant de résister à l'action du complément.

Dans la seconde partie du projet, nous avons montré que *F. nucleatum* était capable d'interagir avec la protéine CD46 et d'induire une réponse menant à la sécrétion d'IL-6, d'IL-8 et de MMP-9 par les cellules épithéliales. Ceci pourrait conduire à une destruction accrue des tissus parodontaux (figure 6.1). Par ailleurs, *F. nucleatum* a été isolé dans diverses infections extra-buccales (Bartlett, 1993; Brook, 2010; Marina et al., 1993; Moore and Moore, 1994). Le phénomène que nous avons démontré pourrait donc permettre à la bactérie de résister à l'action du système du complément lors de sa migration de la poche parodontale à un site extra-buccal (figure 6.1).

Cette étude rapporte pour la première fois que certaines composantes bactériennes (LPS) sont capables de moduler l'expression des CRPs à la surface des cellules épithéliales. Ce phénomène pourrait constituer un moyen permettant de protéger l'intégrité tissulaire. En effet, la surexpression des CRPs à la surface des cellules épithéliales pourrait être un moyen d'échapper à une autolyse par le complément. Néanmoins, il pourrait avoir un impact sur le développement de cancers buccaux, où la surexpression des CRPs permettrait aux cellules cancéreuses d'échapper au contrôle du système immunitaire inné de l'hôte (figure 6.2). Nos résultats ont permis de mettre en évidence l'implication des protéines régulatrices du complément dans la pathogenèse des parodontites et dans la rupture de l'homéostasie épithéliale par des bactéries soit pathogènes (*P. gingivalis*), soit commensales opportunistes (*F. nucleatum*). Cependant, ces résultats obtenus avec une lignée de cellules épithéliales immortalisées devraient être confirmés avec les cellules épithéliales gingivales primaires. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication des CRPs dans le processus pathogénique des parodontites.

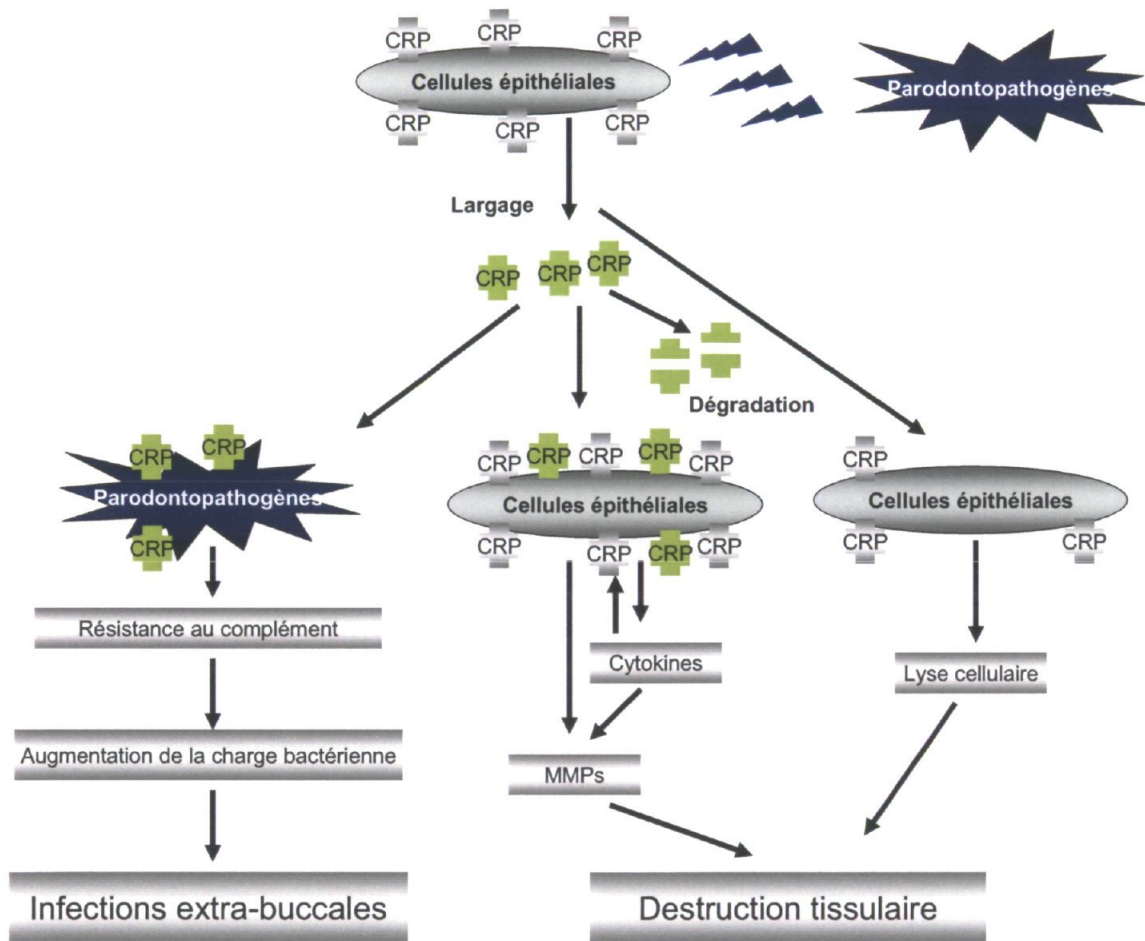


Figure 6.1. Implication des CRPs dans la modulation de la réponse cellulaire épithéliale par les bactéries parodontopathogènes.

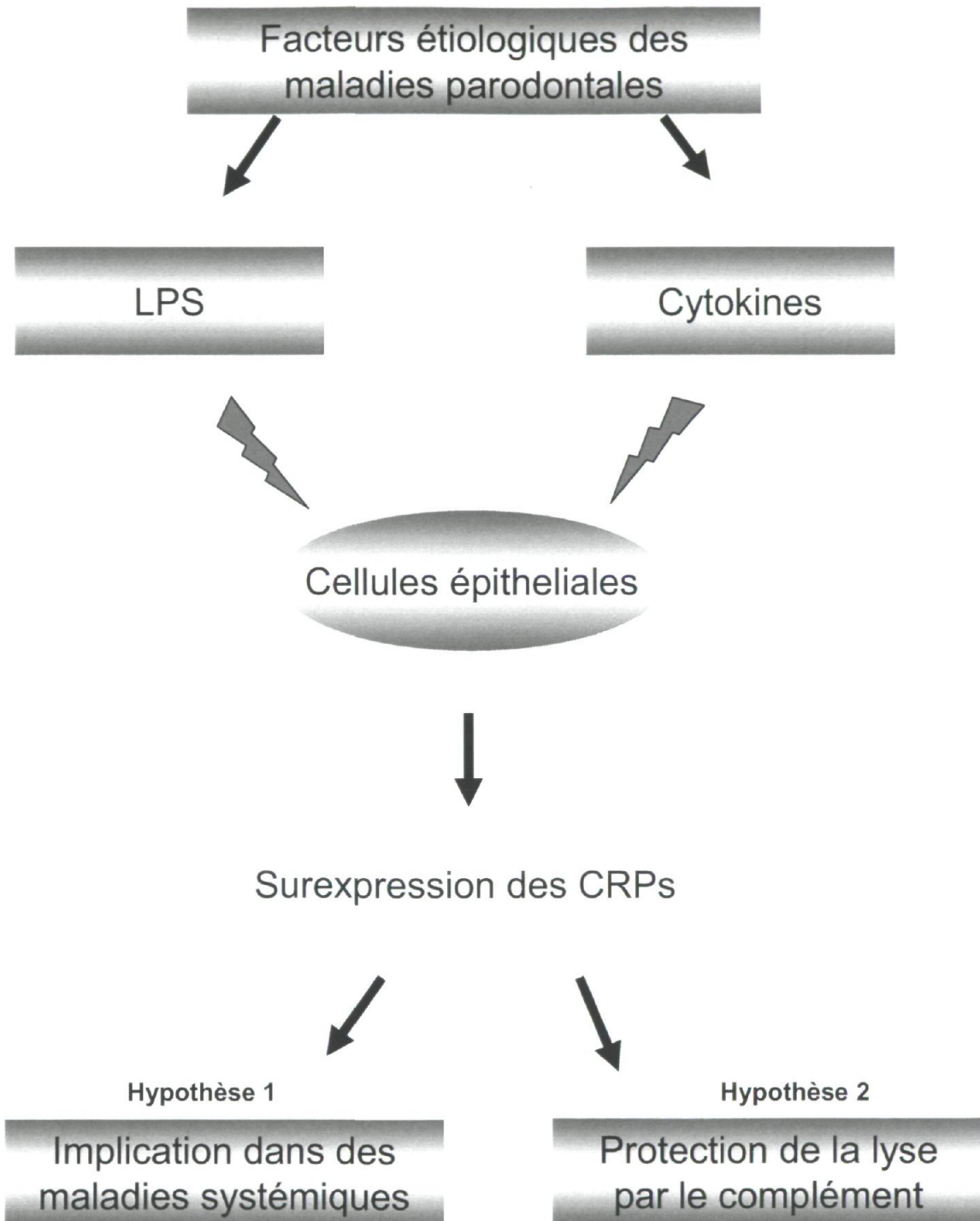


Figure 6.2. Modèle de la modulation d'expression des CRPs par le LPS des parodontopathogènes et les cytokines pro-inflammatoires.

BIBLIOGRAPHIE

Albandar JM (2005). Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49(3):517-32, v-vi.

Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N (2004). Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontal Res* 39(2):136-42.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M (2006a). *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* 85(5):392-403.

Andrian E, Grenier D, Rouabhia M (2006b). *Porphyromonas gingivalis* gingipains mediate the shedding of syndecan-1 from the surface of gingival epithelial cells. *Oral Microbiol Immunol* 21(2):123-8.

Andrian E, Mostefaoui Y, Rouabhia M, Grenier D (2007). Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model. *J Cell Physiol* 211(1):56-62.

Aruni W, Vanterpool E, Osbourne D, Roy F, Muthiah A, Dou Y, Fletcher HM (2011). Sialidase and sialoglycoproteases can modulate virulence in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 79(7):2779-91.

Barilla-LaBarca ML, Liszewski MK, Lambris JD, Hourcade D, Atkinson JP (2002). Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells. *J Immunol* 168(12):6298-304.

Bartlett JG (1993). Anaerobic bacterial infections of the lung and pleural space. *Clin Infect Dis* 16 Suppl 4:S248-55.

Bennett KW, Eley A (1993). Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J Med Microbiol* 39(4):246-54.

Bergstrom J (1989). Cigarette smoking as risk factor in chronic periodontal disease. *Community Dent Oral Epidemiol* 17(5):245-7.

Birkedal-Hansen H (1993). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 64(5 Suppl):474-84.

Bodet C, Chandad F, Grenier D (2005). Modulation of cytokine production by *Porphyromonas gingivalis* in a macrophage and epithelial cell co-culture model. *Microbes Infect* 7(3):448-56.

Bodet C, Chandad F, Grenier D (2006). Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes Infect* 8(1):27-35.

Bodet C, Chandad F, Grenier D (2007). Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathol Biol (Paris)* 55(3-4):154-62.

Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev* 9(1):55-71.

Brook I The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 16(3):183-9.

Brunner J, Scheres N, El Idrissi NB, Deng DM, Laine ML, van Winkelhoff AJ, et al. The capsule of *Porphyromonas gingivalis* reduces the immune response of human gingival fibroblasts. *BMC Microbiol* 10:5.

Budu CE, Luengpailin J, Reyes G, Doyle RJ, Cowan MM (2003). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis* are modified by polyphenol oxidase and asparaginase. *Oral Microbiol Immunol* 18(5):313-7.

Chapitis J, Lepow IH (1976). Multiple sedimenting species of properdin in human serum and interaction of purified properdin with the third component of complement. *J Exp Med* 143(2):241-57.

Chardin H, Barsotti O, Bonnaure-Mallet M (2006). Microbiologie en odontostomatologie. *Maloine, France*, 329 pages.

Childs WC 3rd, Gibbons RJ (1988). Use of percoll density gradients for studying the attachment of bacteria to oral epithelial cells. *J Dent Res* 67(5):826-30.

Choi BK, Moon SY, Cha JH, Kim KW, Yoo YJ (2005). Prostaglandin E(2) is a main mediator in receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand-dependent osteoclastogenesis induced by *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Treponema socranskii*. *J Periodontol* 76(5):813-20.

Choi YH, McKeown RE, Mayer-Davis EJ, Liese AD, Song KB, Merchant AT Association between periodontitis and impaired fasting glucose and diabetes. *Diabetes Care* 34(2):381-6.

Cocuzzi E, Guidubaldi J, Bardenstein DS, Chen R, Jacobs MR, Medof EM (2000). Release of complement regulatory proteins from ocular surface cells in infections. *Curr Eye Res* 21(5):856-66.

Cole JL, Housley GA, Jr., Dykman TR, MacDermott RP, Atkinson JP (1985). Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3):859-63.

Dale BA (2002). Periodontal epithelium: a newly recognized role in health and disease. *Periodontol 2000* 30:70-8.

Dale BA, Fredericks LP (2005). Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 7(2):119-33.

Darenfed H, Grenier D, Mayrand D (1999). Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis. *Infect Immun* 67(12):6439-44.

Darveau RP, Tanner A, Page RC (1997). The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* 14:12-32.

Darveau RP, Belton CM, Reife RA, Lamont RJ (1998). Local chemokine paralysis, a novel pathogenic mechanism for *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 66(4):1660-5.

Davis AE, 3rd, Harrison RA (1982). Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* 21(23):5745-9.

de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD, Dietrich T (2009). Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 5(4):218-24.

Dehazya P, Coles RS, Jr (1980). Agglutination of human erythrocytes by *Fusobacterium nucleatum*: factors influencing hemagglutination and some characteristics of the agglutinin. *J Bacteriol* 143(1):205-11.

Delneste Y, Beauvillain C, Jeannin P (2007). Innate immunity: structure and function of TLRs. *Med Sci (Paris)* 23(1):67-73.

Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192(19):5002-17.

Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A (2000). Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 187(2):139-44.

Duncan L, Yoshioka M, Chandad F, Grenier D (2004). Loss of lipopolysaccharide receptor CD14 from the surface of human macrophage-like cells mediated by *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Microb Pathog* 36(6):319-25.

Ebersole JL (2003). Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications. *Periodontol 2000* 31:135-66.

Edwards AM, Jenkinson HF, Woodward MJ, Dymock D (2005). Binding properties and adhesion-mediating regions of the major sheath protein of *Treponema denticola* ATCC 35405. *Infect Immun* 73(5):2891-8.

Edwards AM, Grossman TJ, Rudney JD (2006). *Fusobacterium nucleatum* transports noninvasive *Streptococcus cristatus* into human epithelial cells. *Infect Immun* 74(1):654-62.

Eley BM, Cox SW (2003). Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000* 31:105-24.

Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, et al. (2005). CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* 280(43):36342-54.

Ezzo PJ, Cutler CW (2003). Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol 2000* 32:24-35.

Falkler WA, Jr., Clayman EB, Shaefer DF (1983). Haemolysis of human erythrocytes by the *Fusobacterium nucleatum* associated with periodontal disease. *Arch Oral Biol* 28(8):735-9.

Fearon DT, Austen KF (1975). Properdin: binding to C3b and stabilization of the C3b-dependent C3 convertase. *J Exp Med* 142(4):856-63.

Flemmig TF (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):32-8.

Geatch DR, Harris JI, Heasman PA, Taylor JJ (1999). In vitro studies of lymphocyte apoptosis induced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 34(2):70-8.

Gemmell E, Carter CL, Seymour GJ (2001). Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol* 125(1):134-41.

Genco RJ, Loe H (1993). The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2:98-116.

Gendron R, Grenier D, Maheu-Robert L (2000). The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect* 2(8):897-906.

Gendron R, Plamondon P, Grenier D (2004). Binding of pro-matrix metalloproteinase 9 by *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* as a mechanism to promote the invasion of a reconstituted basement membrane. *Infect Immun* 72(10):6160-3.

Gibbons RJ (1989). Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res* 68(5):750-60.

Gill DB, Koomey M, Cannon JG, Atkinson JP (2003). Down-regulation of CD46 by piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *J Exp Med* 198(9):1313-22.

Gill DB, Spitzer D, Koomey M, Heuser JE, Atkinson JP (2005). Release of host-derived membrane vesicles following pilus-mediated adhesion of *Neisseria gonorrhoeae*. *Cell Microbiol* 7(11):1672-83.

Graves D (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 79(8 Suppl):1585-91.

Graves DT, Cochran D (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol* 74(3):391-401.

Grenier D (1992). Inactivation of human serum bactericidal activity by a trypsinlike protease isolated from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 60(5):1854-7.

Grenier D, Michaud J (1994). Demonstration of human immunoglobulin G Fc-binding activity in oral bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 1(2):247-9.

Guo M, Han YW, Sharma A, De Nardin E (2000). Identification and characterization of human immunoglobulin G Fc receptors of *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol* 15(2):119-23.

Haber J, Kent RL (1992). Cigarette smoking in a periodontal practice. *J Periodontol* 63(2):100-6.

Haffajee AD, Socransky SS (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5:78-111.

Hajishengallis G (2010). Complement and periodontitis. *Biochem Pharmacol* 80(12):1992-2001.

Hajishengallis G, Wang M, Harokopakis E, Triantafilou M, Triantafilou K (2006). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae proactively modulate beta2 integrin adhesive activity

and promote binding to and internalization by macrophages. *Infect Immun* 74(10):5658-66.

Hakulinen J, Junnikkala S, Sorsa T, Meri S (2004). Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form. *Eur J Immunol* 34(9):2620-9.

Han YW, Shi W, Huang GT, Kinder Haake S, Park NH, Kuramitsu H, et al. (2000). Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect Immun* 68(6):3140-6.

Harrell JC, Stein SH (1995). Prostaglandin E2 regulates gingival mononuclear cell immunoglobulin production. *J Periodontol* 66(3):222-7.

Heinen S, Hartmann A, Lauer N, Wiehl U, Dahse HM, Schirmer S, et al. (2009). Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114(12):2439-47.

Henderson B, Wilson M, Sharp L, Ward JM (2002). *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Med Microbiol* 51(12):1013-20.

Herzberg MC, Meyer MW (1996). Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. *J Periodontol* 67(10 Suppl):1138-42.

Holt SC, Ebersole JL (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000 38:72-122.

Houalet-Jeanne S, Pellen-Mussi P, Tricot-Doleux S, Apiou J, Bonnaure-Mallet M (2001). Assessment of internalization and viability of *Porphyromonas gingivalis* in KB epithelial cells by confocal microscopy. *Infect Immun* 69(11):7146-51.

Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu HK, Haake SK (2001). Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infect Immun* 69(3):1364-72.

Huang GT, Zhang HB, Dang HN, Haake SK (2004). Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog* 37(6):303-12.

Hughes J, Nangaku M, Alpers CE, Shankland SJ, Couser WG, Johnson RJ (2000). C5b-9 membrane attack complex mediates endothelial cell apoptosis in experimental glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 278(5):F747-57.

Ikegami A, Honma K, Sharma A, Kuramitsu HK (2004). Multiple functions of the leucine-rich repeat protein LrrA of *Treponema denticola*. *Infect Immun* 72(8):4619-27.

Imamura T (2003). The role of gingipains in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 74(1):111-8.

Irwin CR, Myrillas TT (1998). The role of IL-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *Oral Dis* 4(1):43-7.

Jagels MA, Ember JA, Travis J, Potempa J, Pike R, Hugli TE (1996). Cleavage of the human C5A receptor by proteinases derived from *Porphyromonas gingivalis*: cleavage of leukocyte C5a receptor. *Adv Exp Med Biol* 389:155-64.

Jenkinson HF, Lamont RJ (2005). Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* 13(12):589-95.

Ji S, Shin JE, Kim YC, Choi Y (2010) Intracellular degradation of *Fusobacterium nucleatum* in human gingival epithelial cells. *Mol Cells* 30(6):519-26.

Jin LJ, Soder PO, Leung WK, Corbet EF, Samaranayake LP, Soder B, et al. (1999). Granulocyte elastase activity and PGE2 levels in gingival crevicular fluid in relation to the presence of subgingival periodontopathogens in subjects with untreated adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 26(8):531-40.

Jin LJ, Leung WK, Corbet EF, Soder B (2002). Relationship of changes in interleukin-8 levels and granulocyte elastase activity in gingival crevicular fluid to subgingival periodontopathogens following non-surgical periodontal therapy in subjects with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 29(7):604-14.

Kagnoff MF, Eckmann L (1997). Epithelial cells as sensors for microbial infection. *J Clin Invest* 100(1):6-10.

Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB (2001). Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol* 3(3):133-43.

Kaplan CW, Lux R, Huynh T, Jewett A, Shi W, Haake SK (2005). *Fusobacterium nucleatum* apoptosis-inducing outer membrane protein. *J Dent Res* 84(8):700-4.

Katz J, Sambandam V, Wu JH, Michalek SM, Balkovetz DF (2000). Characterization of *Porphyromonas gingivalis*-induced degradation of epithelial cell junctional complexes. *Infect Immun* 68(3):1441-9.

Kaufman J, DiRienzo JM (1989). Isolation of a corn cob (coaggregation) receptor polypeptide from *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* 57(2):331-7.

Kawano M (2000). Complement regulatory proteins and autoimmunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48(5):367-72.

Kim DD, Song WC (2006). Membrane complement regulatory proteins. *Clin Immunol* 118(2-3):127-36.

Kimball JR, Nittayananta W, Klausner M, Chung WO, Dale BA (2006). Antimicrobial barrier of an in vitro oral epithelial model. *Arch Oral Biol* 51(9):775-83.

Kimizuka R, Kato T, Ishihara K, Okuda K (2003). Mixed infections with *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* cause excessive inflammatory responses in a mouse pneumonia model compared with mono-infections. *Microbes Infect* 5(15):1357-62.

Kinane DF (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 25:8-20.

Kinane DF, Lappin DF (2001). Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontol Scand* 59(3):154-60.

Kinoshita T (1988). Progress on complement protein chemistry and the molecular mechanism of activation. Alternative complement pathway. *Nippon Rinsho* 46(9):1894-8.

Kinoshita T, Takata Y, Kozono H, Takeda J, Hong KS, Inoue K (1988). C5 convertase of the alternative complement pathway: covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J Immunol* 141(11):3895-901.

Kolenbrander PE, Palmer RJ, Jr., Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol 2000* 42:47-79.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000* 14:33-53.

Kuboniwa M, Amano A, Inaba H, Hashino E, Shizukuishi S (2009). Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations. *Oral Microbiol Immunol* 24(3):260-3.

Kuramitsu HK, Qi M, Kang IC, Chen W (2001). Role for periodontal bacteria in cardiovascular diseases. *Ann Periodontol* 6(1):41-7.

Lambris JD (1988). The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today* 9(12):387-93.

Lamont RJ, Jenkinson HF (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(4):1244-63.

Lee JH, Lee JS, Chung MS, Kim KH (2004). In vitro anti-adhesive activity of an acidic polysaccharide from *Panax ginseng* on *Porphyromonas gingivalis* binding to erythrocytes. *Planta Med* 70(6):566-8.

Li K, Feito MJ, Sacks SH, Sheerin NS (2006). CD46 (membrane cofactor protein) acts as a human epithelial cell receptor for internalization of opsonized uropathogenic *Escherichia coli*. *J Immunol* 177(4):2543-51.

Lindahl G, Sjobring U, Johnsson E (2000). Human complement regulators: a major target for pathogenic microorganisms. *Curr Opin Immunol* 12(1):44-51.

Listgarten MA (1972). Normal development, structure, physiology and repair of gingival epithelium. *Oral Sci Rev* 1:3-67.

Listgarten MA (1986). Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 13(5):418-30.

Liszewski MK, Atkinson JP (1996). Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. *J Immunol* 156(11):4415-21.

Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA (1992). Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 19(2):103-12.

Loos BG, Dyer DW, Whittam TS, Selander RK (1993). Genetic structure of populations of *Porphyromonas gingivalis* associated with periodontitis and other oral infections. *Infect Immun* 61(1):204-12.

Lovkvist L, Sjolinder H, Wehelie R, Aro H, Norrby-Teglund A, Plant L, et al. (2008). CD46 Contributes to the severity of group A streptococcal infection. *Infect Immun* 76(9):3951-8.

Luster AD (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 338(7):436-45.

Madianos PN, Bobetsis YA, Kinane DF (2005). Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:57-71.

Marie JC, Astier AL, Rivaller P, Roubourdin-Combe C, Wild TF, Horvat B (2002). Linking innate and acquired immunity: divergent role of CD46 cytoplasmic domains in T cell induced inflammation. *Nat Immunol* 3(7):659-66.

Marina M, Strong CA, Civen R, Molitoris E, Finegold SM (1993). Bacteriology of anaerobic pleuropulmonary infections: preliminary report. *Clin Infect Dis* 16 Suppl 4:S256-62.

Mariotti A (1999). Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol* 4(1):7-19.

Markiewski MM, Lambris JD (2007). The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight. *Am J Pathol* 171(3):715-27.

Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC (1990). Measurement of interleukin-1 alpha and -1 beta in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res* 25(3):156-63.

Mason JC, Yarwood H, Sugars K, Morgan BP, Davies KA, Haskard DO (1999). Induction of decay-accelerating factor by cytokines or the membrane-attack complex protects vascular endothelial cells against complement deposition. *Blood* 94(5):1673-82.

Mathur A, Michalowicz B, Castillo M, Aeppli D (1996). Interleukin-1 alpha, interleukin-8 and interferon-alpha levels in gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 31(7):489-95.

McNearney T, Ballard L, Seya T, Atkinson JP (1989). Membrane cofactor protein of complement is present on human fibroblast, epithelial, and endothelial cells. *J Clin Invest* 84(2):538-45.

Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, et al. (1991). Periodontal findings in adult twins. *J Periodontol* 62(5):293-9.

Mombelli A, Schmid B, Rutar A, Lang NP (2000). Persistence patterns of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, and *Actinobacillus*

actinomyetemcomitans after mechanical therapy of periodontal disease. *J Periodontol* 71(1):14-21.

Moore WE, Moore LV (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 5:66-77.

Munemasa T, Takemoto T, Dahlen G, Hino T, Shiba H, Ogawa T, et al. (2000). Adherence of *Bacteroides forsythus* to host cells. *Microbios* 101(399):115-26.

O'Brien-Simpson NM, Veith PD, Dashper SG, Reynolds EC (2004). Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontol 2000* 35:101-34.

Offenbacher S (1996). Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1(1):821-78.

Okada H, Murakami S (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 9(3):248-66.

Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M (1995). Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(7):2489-93.

Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM (2007). Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med* 39(7):517-30.

Oleksy A, Banbula A, Bugno M, Travis J, Potempa J (2002). Proteolysis of interleukin-6 receptor (IL-6R) by *Porphyromonas gingivalis* cysteine proteinases (gingipains) inhibits interleukin-6-mediated cell activation. *Microb Pathog* 32(4):173-81.

Overall CM, Sodek J, McCulloch CA, Birek P (1991). Evidence for polymorphonuclear leukocyte collagenase and 92-kilodalton gelatinase in gingival crevicular fluid. *Infect Immun* 59(12):4687-92.

Ozaki M, Miyake Y, Shirakawa M, Takemoto T, Okamoto H, Suginaka H (1990). Binding specificity of *Fusobacterium nucleatum* to human erythrocytes, polymorphonuclear leukocytes, fibroblasts, and HeLa cells. *J Periodontol Res* 25(3):129-34.

Ozmeric N (2004). Advances in periodontal disease markers. *Clin Chim Acta* 343(1-2):1-16.

Paju S, Scannapieco FA (2007). Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 13(6):508-12.

Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, et al. (1997). Subgingival microbiota in adult Chinese: prevalence and relation to periodontal disease progression. *J Periodontol* 68(7):651-66.

Petersen SV, Thiel S, Jensen L, Vorup-Jensen T, Koch C, Jensenius JC (2000). Control of the classical and the MBL pathway of complement activation. *Mol Immunol* 37(14):803-11.

Petersilka GJ, Ehmke B, Flemmig TF (2002). Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontol 2000* 28:56-71.

Peyret-Lacombe A, Brunel G, Watts M, Charveron M, Duplan H (2009). TLR2 sensing of *F. nucleatum* and *S. sanguinis* distinctly triggered gingival innate response. *Cytokine* 46(2):201-10.

Philpott DJ, Girardin SE (2004). The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 41(11):1099-108.

Post TW, Liszewski MK, Adams EM, Tedja I, Miller EA, Atkinson JP (1991). Membrane cofactor protein of the complement system: alternative splicing of serine/threonine/proline-rich exons and cytoplasmic tails produces multiple isoforms that correlate with protein phenotype. *J Exp Med* 174(1):93-102.

Potempa J, Pike R, Travis J (1995). The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain. *Infect Immun* 63(4):1176-82.

Preiss DS, Meyle J (1994). Interleukin-1 beta concentration of gingival crevicular fluid. *J Periodontol* 65(5):423-8.

Presland RB, Dale BA (2000). Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(4):383-408.

Rambach G, Maier H, Vago G, Mohsenipour I, Lass-Flörl C, Defant A, et al. (2008a). Complement induction and complement evasion in patients with cerebral aspergillosis. *Microbes Infect* 10(14-15):1567-76.

Rambach G, Wurznner R, Speth C (2008b). Complement: an efficient sword of innate immunity. *Contrib Microbiol* 15:78-100.

Rautemaa R, Meri S (1996). Protection of gingival epithelium against complement-mediated damage by strong expression of the membrane attack complex inhibitor protectin (CD59). *J Dent Res* 75(1):568-74.

Rautemaa R, Jarvis GA, Marnila P, Meri S (1998). Acquired resistance of *Escherichia coli* to complement lysis by binding of glycosphosphoinositol-anchored protectin (CD59). *Infect Immun* 66(5):1928-33.

Rautemaa R, Rautelin H, Puolakkainen P, Kokkola A, Karkkainen P, Meri S (2001). Survival of *Helicobacter pylori* from complement lysis by binding of GPI-anchored protectin (CD59). *Gastroenterology* 120(2):470-9.

Renvert S, Wikstrom M, Dahlen G, Slots J, Egelberg J (1990). Effect of root debridement on the elimination of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* from periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 17(6):345-50.

Reynolds JJ, Meikle MC (1997). Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000* 14:144-57.

Rezcallah MS, Hodges K, Gill DB, Atkinson JP, Wang B, Cleary PP (2005). Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7(5):645-53.

Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP (2004). CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol* 25(9):496-503.

Rosen G, Nisimov I, Helcer M, Sela MN (2003). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b lipopolysaccharide mediates coaggregation with *Fusobacterium nucleatum*. *Infect Immun* 71(6):3652-6.

Russell S (2004). CD46: a complement regulator and pathogen receptor that mediates links between innate and acquired immune function. *Tissue Antigens* 64(2):111-8.

Schenkein HA, Genco RJ (1977). Gingival fluid and serum in periodontal diseases. II. Evidence for cleavage of complement components C3, C3 proactivator (factor B) and C4 in gingival fluid. *J Periodontol* 48(12):778-84.

Schenkein HA (2006). Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontol 2000* 40:77-93.

Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V (1995). Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol* 25(4):976-84.

Schumaker VN, Zavodszky P, Poon PH (1987). Activation of the first component of complement. *Annu Rev Immunol* 5:21-42.

Sela MN (2001). Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med* 12(5):399-413.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 38(135-87).

Soell M, Elkaim R, Tenenbaum H (2002). Cathepsin C, matrix metalloproteinases, and their tissue inhibitors in gingiva and gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Dent Res* 81(3):174-8.

Sooriyamoorthy M, Gower DB (1989). Phenytoin stimulation of testosterone metabolism in inflamed human gingival fibroblasts. *Biochem Soc Trans* 17(6):1020-1.

Sorsa T, Ingman T, Suomalainen K, Haapasalo M, Konttinen YT, Lindy O, et al. (1992). Identification of proteases from periodontopathogenic bacteria as activators of latent human neutrophil and fibroblast-type interstitial collagenases. *Infect Immun* 60(11):4491-5.

Super M, Thiel S, Lu J, Levinsky RJ, Turner MW (1989). Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *Lancet* 2(8674):1236-9.

Tatakis DN, Kumar PS (2005). Etiology and pathogenesis of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 49(3):491-516, v.

Teng YT, Taylor GW, Scannapieco F, Kinane DF, Curtis M, Beck JD, et al. (2002). Periodontal health and systemic disorders. *J Can Dent Assoc* 68(3):188-92.

Tinoco EM, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, et al. (1998). Clinical and microbiological effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 69(12):1355-63.

Tobiason DM, Seifert HS (2001). Inverse relationship between pilus-mediated gonococcal adherence and surface expression of the pilus receptor, CD46. *Microbiology* 147(Pt 8):2333-40.

Tonetti MS, Mombelli A (1999). Early-onset periodontitis. *Ann Periodontol* 4(1):39-53.

Tuttle RS, Strubel NA, Mourad J, Mangan DF (1992). A non-lectin-like mechanism by which *Fusobacterium nucleatum* 10953 adheres to and activates human lymphocytes. *Oral Microbiol Immunol* 7(2):78-83.

Ueda N, Koide M, Ohguchi M, Ishihara Y, Noguchi T, Okahashi N, Nishihara T (1998). Involvement of prostaglandin E2 and interleukin-1 alpha in the differentiation and survival of osteoclasts induced by lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *J Periodontal Res* (33):509-515.

Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Putnins EE, et al. (2005). *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. *Infect Immun* 73(2):1171-9.

Umeda M, Takeuchi Y, Noguchi K, Huang Y, Koshy G, Ishikawa I (2004). Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontol 2000* 36:98-120.

Van Lint P, Libert C (2006). Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(4):217-23.

Vogt W (1986). Anaphylatoxins: possible roles in disease. *Complement* 3(3):177-88.

Walport MJ (2001). Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344(14):1058-66.

Wennstrom J, Heijl L, Lindhe J, Socransky S (1980). Migration of gingival leukocytes mediated by plaque bacteria. *J Periodontal Res* 15(4):363-72.

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbrander PE (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* 50:513-52.

Wiebe CB, Putnins EE (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update. *J Can Dent Assoc* 66(11):594-7.

Xie H, Gibbons RJ, Hay DI (1991). Adhesive properties of strains of *Fusobacterium nucleatum* of the subspecies *nucleatum*, *vincentii* and *polymorphum*. *Oral Microbiol Immunol* 6(5):257-63.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol* 22:181-215.

Yilmaz O, Verbeke P, Lamont RJ, Ojcius DM (2006). Intercellular spreading of *Porphyromonas gingivalis* infection in primary gingival epithelial cells. *Infect Immun* 74(1):703-10.

Yu GH, Holers VM, Seya T, Ballard L, Atkinson JP (1986). Identification of a third component of complement-binding glycoprotein of human platelets. *J Clin Invest* 78(2):494-501.

Zhou J, Windsor LJ (2006). *Porphyromonas gingivalis* affects host collagen degradation by affecting expression, activation, and inhibition of matrix metalloproteinases. *J Periodontal Res* 41(1):47-54.