



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par :**

Université Toulouse III Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

**Discipline ou spécialité :**

Maladies métaboliques et cardio-vasculaires

---

**Présentée et soutenue par :**

Vincent Blasco-Baque

**le :** lundi 8 juillet 2013

**Titre :**

Relation moléculaire bidirectionnelle entre diabète et maladie parodontale

---

**Ecole doctorale :**

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

**Unité de recherche :**

INSERM/I2MC et L.U 51 Faculté Chirurgie Dentaire Toulouse

**Directeur(s) de Thèse :**

Professeur Rémy Burcelin et Docteur Philippe Kémoun

**Rapporteurs :**

Professeur Jean-Christophe Farges

Professeur Pascal Ferré

**Membre(s) du jury :**

Professeur Rémy Burcelin, Professeur Jean-Christophe Farges

Professeur Pascal Ferré, Professeur Michel Sixou

Docteur Mireille Cormont, Docteur Philippe Kémoun



*A ma femme, mes parents et....  
pour votre amour et votre patience...  
et tellement de choses que je ne dis pas...*

## REMERCIEMENTS

*Monsieur le Professeur Rémy Burcelin je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir accompagné au cours de cette expédition dans le monde de la recherche. J'ai aimé me soumettre à votre expertise et vous remercie de votre stimulation intellectuelle.*

*Monsieur le Docteur Philippe Kémoun merci pour votre accompagnement et notre complicité particulière. J'apprécie travailler avec vous sur ces projets et j'espère continuer à partager ces moments remarquables. Trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.*

*Monsieur le Professeur Michel Sixou, je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée en m'ouvrant les portes de votre laboratoire et de la recherche. Vous m'avez fait découvrir un nouvel aspect de notre profession et je vous en suis très reconnaissant.*

*Messieurs les Professeurs Jean-Christophe Farges et Pascal Ferré je suis très honoré que vous ayez accepté de juger ce travail. Je vous remercie de votre correction et de votre investissement dans cette thèse. Veuillez trouver le témoignage de notre profonde gratitude.*

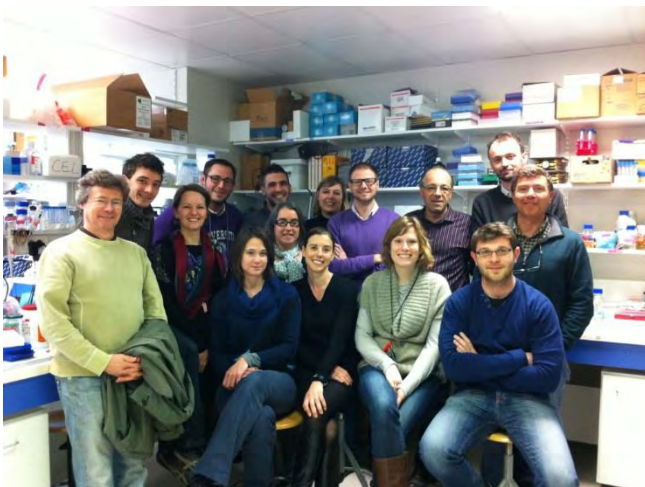
*Madame le Docteur Mireille Cormont je vous remercie d'avoir accepté de lire ce travail et de participer à cette soutenance.*

*Monsieur le Docteur Matteo Serino je vous remercie de cette coalition et de cette saine espièglerie qui nous poussent à nous surpasser*

*Madame Pascale Loubières merci d'avoir contribué à ce travail il est le fruit de notre complicité et de ta patience à me supporter ....merci*

*A ma famille tellement proche qui me permet de partager de belles tranches de vies et de joies familiales Tonton, Tata, Nathalie, Parrain, Jean, Marie-Christine, Philippe, Céline et Marc*

*A mes Amis tellement importants pour me sentir un homme heureux Antoine Arnaud Caillou Cédric Dédé Fabrice Fanny Fella Flavien Guillaume Laurie Mathieu Maxime et Pouet-Pouet*



*Merci à toute l'équipe 2 et à l'équipe de la faculté de chirurgie-dentaire de Toulouse car comme le Rugby, sans coéquipiers il n'y a pas de victoires.....*

*Le principe des remerciements c'est qu'on oublie toujours certains....alors Merci à Tous*

*« Si j'ai pu voir aussi loin, c'est parce que j'étais juché sur les épaules de géants »*

Isaac Newton (1676)



# SOMMAIRE

|  |         |
|--|---------|
| <b>Table des Figures et Tableaux</b> .....                               | page 9  |
| <b>Abréviations</b> .....  | page 11 |
| <b>1 Introduction</b> .....  | page 12 |
| <b>2 Le Diabète</b> .....  | page 14 |
| I Définition.....  | page 14 |
| II Epidémiologie.....  | page 14 |
| III Physiologie du métabolisme glucidique.....                           | page 16 |
| 3.1 Etat Absorptif.....  | page 16 |
| 3.2 A jeun.....  | page 17 |
| a) La Glycogénolyse.....   | page 17 |
| b) La lipolyse.....  | page 18 |
| c) La Néo-glucogénèse.....   | page 18 |
| IV Utilisation du Glucose.....   | page 18 |
| 4.1 Transport du glucose.....  | page 18 |
| 4.2 Transformation du Glucose : Glycolyse.....                           | page 19 |
| a) Etape cytosolique.....  | page 19 |
| b) Etape mitochondriale d'oxydation du pyruvate en CO <sub>2</sub> ..... | page 20 |
| V La Régulation de la glycémie.....                                      | page 20 |
| 5.1 Système Hypoglycémiant : Insuline.....                               | page 20 |
| a) Biosynthèse de l'Insuline .....                                       | page 23 |
| b) Récepteur à l'Insuline .....  | page 23 |
| c) Insuline et Métabolisme glucidique .....                              | page 27 |
| c.1) Foie et Insuline .....  | page 27 |
| c.2) Muscle et Insuline .....  | page 27 |
| c.3) Tissu adipeux et Insuline .....                                     | page 27 |
| 5.2 Systèmes Hyperglycémiant .....                                       | page 27 |
| a) Système d'urgence .....   | page 28 |
| a.1) Les catécholamines .....  | page 28 |
| a.2) Le glucagon .....   | page 28 |
| b) Système d'action prolongée .....                                      | page 28 |
| b.1) Le Cortisol .....   | page 28 |
| b.2) La Somathormone Hormone de Croissance...page 28                     |         |
| VI Physiopathologie du diabète .....                                     | page 29 |
| 6.1 Les troubles de sécrétion de l'Insuline .....                        | page 29 |
| 6.2 L'insulino-Résistance et ses conséquences .....                      | page 30 |

|  |         |
|--|---------|
| VII L'inflammation-Immunité-Microbiote : nouveau paradigme de l'IR ..... | page 32 |
|--|---------|

## **2 La maladie parodontale .....**

page 38

|  |         |
|--|---------|
| I Epidémiologie .....  | page 38 |
| 1.1 Prévalence et Incidence.....                             | page 38 |
| 1.2 Les facteurs de risques des maladies parodontales .....  | page 40 |
| a) Facteurs de risques généraux .....                        | page 40 |
| a.1) Hérité et Génétique.....                                | page 40 |
| a.2) Facteur nutritionnel .....                              | page 40 |
| a.3) Âge .....   | page 41 |
| a.4) Stress .....  | page 43 |
| a.6) Maladies Générales .....                                | page 43 |
| b) Facteurs de risques locaux .....                          | page 43 |
| b.1) Hygiène Bucco-Dentaire .....                            | page 43 |
| b.2) Tabac .....   | page 44 |
| b.3) Salive .....  | page 46 |
| b.4) Facteur de risque bactérien : rôle du biofilm.....      | page 46 |
| I Mécanisme d'adhésion .....                                 | page 46 |
| II Colonisation Spécifique .....                             | page 47 |
| 2.1) Bactéries à Gram – .....                                | page 49 |
| 2.2) Bactéries à Gram+ .....                                 | page 50 |
| II Physiopathologie de la maladie parodontale .....          | page 50 |
| 2.1 Etio-pathogénicité .....                                 | page 50 |
| 2.2 Inflammation locale et désordres systémiques .....       | page 51 |
| III Formes anatomo-cliniques de la Maladie Parodontale ..... | page 53 |
| 3.1) Gingivite .....   | page 53 |
| 3.2) Parodontite Chronique .....                             | page 53 |
| 3.3) Parodontite Agressive .....                             | page 53 |
| 3.4) Parodontite ulcéro-nécrotique .....                     | page 53 |
| IV Conclusion .....  | page 54 |

## **3 Résultats Expérimentaux/ Avant-propos .....**

page 55

|  |         |
|--|---------|
| Résultats Expérimentaux I .....  | page 56 |
| I Action du Diabète sur le développement de la maladie parodontale ..... | page 57 |
| II Modèle expérimental et Méthodes.....                                  | page 59 |
| III Résultats .....  | page 60 |
| IV Discussion .....  | page 78 |
| V Conclusion .....   | page 79 |



|  |                 |
|--|-----------------|
| Résultats Expérimentaux 2 .....  | page 80         |
| I Altération immunitaire et Maladie parodontale : un nouveau paradigme causal des<br>maladies métaboliques ..... | page 81         |
| II Modèle expérimental et Méthodes .....   | page 83         |
| III Résultats .....  | page 85         |
| IV Discussion et perspectives en cours .....   | page 101        |
| V Conclusion .....   | page 103        |
| <b>4 Conclusion er Perspectives Thérapeutiques .....</b>   | <b>page 105</b> |
| <b>5 Bibliographies.....</b>   | <b>page 108</b> |
| <b>6 Résumé.....</b>   | <b>page 115</b> |
| <b>7 Annexe Articles.....</b>  | <b>page 117</b> |

# Table des Figures et Tableaux

**Figure 1** Prévisions mondiales de prévalence du diabète dans le monde selon l’OMS (page 15)

**Figure 2** Schéma de la composition de l’insuline en acide aminé (page 21)

**Figure 3** Reconstruction en 3 dimensions du récepteur à l’insuline et son ancrage dans la membrane cellulaire (page 24)

**Figure 4** Cascade du récepteur à l’insuline impliqué dans la régulation de GLUT 4 (page 26)

**Figure 5** Mécanismes impliquant les acides gras dans le transport du glucose dans un contexte d’insulino-résistance (page 31)

**Figure 6** Schéma des cascades moléculaires impliquant l’inflammation dans l’IR (page 34)

**Figure 7** Schéma des hypothèses impliquant le microbiote dans le diabète (page 37)

**Figure 8** Analyse mondiale de la prévalence de la maladie parodontale dans le monde (page 39)

**Figure 9** Prévalence globale de la maladie parodontale en fonction des tranches d’âge de la population mondiale (page 42)

**Figure 10** Le tabac semble constituer un facteur de risque aux maladies parodontales (page 45)

**Figure 11** Organisation hiérarchique et complexité du biofilm parodontal pathologique (page 48)

**Figure 12** Mécanismes moléculaires impliquant la maladie parodontale dans les pathologies générales (page 52)

**Figure 13** Protocole expérimental utilisé lors de la première série d’expériences (page 59)

**Figure 14** L’administration d’E2 protège des troubles métaboliques induits par le HFD (page 61)

**Figure 15** Le HFD induit la maladie parodontale chez les souris WT: effet protecteur des E2 (page 63)

**Figure 16** E2 diminue l’expression de médiateurs de l’inflammation gingivale des souris Ovariectomies nourries par HFD (page 68)

**Figure 17** Le HFD induit un infiltrat inflammatoire cellulaire dans le tissu conjonctif gingival régulé par les E2 (page 71)

**Figure 18** Les souris CD14KO nourries par HFD ne présentent pas de troubles métaboliques par rapport aux souris WT (page 71)

**Figure 19** Les souris CD14KO nourries par HFD sont protégées du développement de la maladie parodontale par rapport aux souris WT (page 72)

**Figure 20** Les souris CD14KO sont protégées de l’inflammation parodontale induite par le HFD (page 73)

**Figure 21** La déplétion de CD14 réduit l’infiltration de cellules inflammatoires induite par le HFD dans le tissu conjonctif gingival (page 74)

**Figure 22** La Colonisation par les bactéries parodontales induit la lyse osseuse alvéolaire mandibulaire (page 86)

**Figure 23** La maladie parodontale aggrave l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance induites par le régime HFD (page 88)

**Figure 24** La maladie parodontale aggrave la proportion de masse grasse chez les souris nourries par HFD (page 89)

**Figure 25** La lyse osseuse et la sensibilité à l'insuline représentée par le GIR sont fortement corrélées (n=20) (page 90)

**Figure 26** La maladie parodontale influence le système immunitaire systémique (page 92)

**Figure 27** La maladie parodontale diminue le nombre d'IgG circulante chez la souris diabétique (page 93)

**Figure 28** La maladie parodontale diminue le nombre de cellules immunitaires dans la rate et augmente la proportion de cellules immunitaires acquises chez les souris diabétiques (page 94)

**Figure 29** La maladie parodontale diminue le nombre de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux et augmente la proportion de cellules immunitaires acquises chez les souris diabétiques (page 95)

**Figure 30** La diffusion systémique de LPS de *Porphyromonas gingivalis* influence la réponse immunitaire sanguine (page 98)

**Figure 31** La diffusion de LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) aggrave l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance induites après 1 mois de HFD (page 99)

**Figure 32** L'imprégnation de LPS-*Porphyromonas gingivalis* influence la réponse immunitaire sanguine des souris diabétiques (page 100)

**Figure 33** Schéma résumant les mécanismes moléculaires de l'impact de la maladie parodontale sur le diabète (page 104)

**Figure 34** Perspectives thérapeutiques dans la relation entre maladie parodontale et diabète (page 107)

**Tableau 1** Cultures bactériennes positives: comparaisons entre chaque groupe chez les souris ovariectomisées (page 65)

**Supp.Tableau 1** Pourcentage de cultures bactériennes positives chez les souris nourries par NCD (page 75)

**Supp.Figure 1.** Les souris CD14KO nourries par NCD ne présentent pas de désordres métaboliques (page 76)

**Supp.Figure 2.** Les souris CD14KO nourries par NCD ne présentent pas de maladie parodontale (page 77)

## Abréviations

**ABC** Crête Alvéolaire Osseuse  
**ACC** Acetyl-CoA Carboxylase  
**AMPK** AMP-activated protein kinase  
**ApoE** Apo-lipoprotéine E  
**CD14** Cluster of differentiation 14  
**CEJ** Jonction Email Cément  
**E2** 17 $\beta$ -estradiol  
**Fn** *Fusobacterium nucleatum*  
**GLUT4** Glucose Transporter 4  
**HFD** High-fat diet  
**IR** Insulino-Résistance  
**IRS** Insulin Receptor Substrate  
**KO** Knock Out  
**LBD** Ligand Binding Domain  
**LPL** LipoProtéine Lipase  
**LPS** LipoPolySaccharides  
**MP** Maladie Parodontale  
**NCD** Normal chow diet  
**NO** Monoxyde d'Azote  
**OVX** Ovariectomie  
**Pi** *Prevotella intermedia*  
**PRRs** pattern recognition receptors  
**RER** réticulum endoplasmique rugueux  
**TLR4** Toll-like receptor-4  
**TNF $\alpha$**  Tumor Necrosis Factor alpha  
**T2D** Type 2 diabetes  
**WHI** Women's Health Initiative  
**WT** Wild-type

# Introduction

Les modes de vie de nos sociétés modernes sont en profond changement avec une nette augmentation de la consommation de nourriture riche en carbohydrate de carbone et en matières grasses. Cette modification associée à la sédentarité est à l'origine d'une réelle épidémie de l'obésité et du diabète. Ce problème sociétal est aggravé par une incidence croissante de ces deux pathologies et un abaissement de l'âge moyen des personnes atteintes de dysglycémie et de surpoids. Les facteurs environnementaux tels que l'hygiène de vie et le régime alimentaire sont des éléments déterminants de l'apparition du diabète dans les pays industrialisés. Ainsi, le monde scientifique s'attend à court et moyen terme à une augmentation majeure des complications du diabète. La prise en charge du patient diabétique est donc un enjeu majeur de santé publique. En France, le nombre de diabétiques est d'environ 2,9 millions de personnes soit environ 4,4 % de la population et le coût lié au diabète est en perpétuelle augmentation. De ce fait, la prise en charge des patients diabétiques va prendre une part de plus en plus importante de l'activité médicale. Parallèlement, on constate un échec des moyens de prévention et de thérapeutiques mis en place pour contrer l'épidémie croissante. Cet échec s'explique car les médicaments actuels ont pour objectifs de traiter les complications et les conséquences des pathologies métaboliques plutôt que leurs causes. Ces thérapeutiques ciblent les paramètres du diabète comme l'augmentation de la glycémie sanguine, l'utilisation inadéquate du glucose ou l'altération de la sécrétion et de l'action de l'insuline. De ce fait, il n'existe pas de traitement étiologique des maladies métaboliques car ces paramètres biologiques sont issus de mécanismes moléculaires inconnus. Il est donc indispensable d'identifier de nouvelles stratégies pour un meilleur contrôle des maladies métaboliques.

Une nouvelle approche de prise en charge de ces pathologies pourrait passer par le microbiote intestinal, qui a été reconnu comme nouvel organe métabolique en 2006. Sa composition bactérienne est variable d'un individu à l'autre selon son statut métabolique. On peut logiquement envisager les systèmes biologiques symbiotiques composés de microbiotes bactériens comme de nouveaux facteurs de risque des maladies métaboliques. De ce fait, la maladie parodontale, maladie infectieuse bactérienne à manifestation immuno-inflammatoire, représente une nouvelle piste de recherche. De plus, les études épidémiologiques suggèrent une relation forte entre maladies métaboliques et parodontite.

Ainsi, l'objectif de notre travail est d'étudier la relation entre la maladie parodontale et le diabète. Dans une première partie, j'ai introduit les caractéristiques physiopathologiques principales du diabète de type 2 ainsi que les nouveaux acteurs des paramètres métaboliques. Dans une deuxième partie, j'ai présenté la maladie parodontale et la complexité de son biofilm bactérien. La partie expérimentale expose une vision bi-directionnelle de la relation entre maladie parodontale et diabète. Dans la première partie de mon protocole de recherche, j'ai étudié l'impact du diabète sur le développement de la maladie parodontale et le rôle régulateur des œstrogènes. Dans la seconde partie, j'ai pour objectif d'étudier la maladie parodontale comme un facteur de risque du diabète. Pour répondre à cet objectif, j'ai dû mettre au point un

nouveau modèle de maladie parodontale chez la souris pour notre laboratoire afin d'étudier l'impact de cette infection buccale sur les paramètres métaboliques.

Ainsi mon travail s'est organisé autour de deux objectifs : i) analyser le diabète comme facteur de risque du développement de la maladie parodontale dans un contexte de carence oestrogénique ii) proposer la maladie parodontale comme facteur de risque de l'émergence du diabète. Ainsi, il nous a été possible d'objectiver scientifiquement les relations bidirectionnelles entre ces deux pathologies à propos desquelles j'ai cherché à élucider les mécanismes physiologiques et moléculaires de cette interaction.

# Le Diabète

## I. Définition

Le diabète de type 2 est une affection chronique métabolique marquée par une hyperglycémie (taux de sucre dans le sang trop élevé). Ce désordre glycémique résulte d'une action en combinaison variable d'un défaut de sécrétion et d'action de l'insuline. Une glycémie à jeun faisant suspecter un diabète se situe au-delà 7 mmol/l (1.26g/l) et doit être confirmée à 2 reprises. Une valeur anormale exige confirmation [1].

## II. Epidémiologie

En France, le nombre de diabétiques est d'environ 2,9 millions de personnes soit environ 4,4% de la population [2]. La prévalence mondiale du diabète chez l'adulte devrait atteindre les 6,1% en 2030, alors que le nombre de malades devrait passer de 366,2 à 551,8 millions de 2011 à 2030. On prévoit donc une augmentation importante en 19 ans (51%) qui autorise l'OMS de qualifier le diabète de première pandémie non infectieuse de l'humanité [1]. Cette épidémie croissante pose le problème de la prise en charge. En effet, les médecins vont devoir gérer de plus en plus de patients diabétiques. Il existe à l'heure actuelle une impasse car les thérapeutiques médicales ne permettent pas d'endiguer la pandémie. Il faut donc rechercher de nouvelles pistes de recherche afin de répondre à ce problème épidémiologique mondial.

Map: IDF Regions and global projections of the number of people with diabetes (20-79 years), 2011 and 2030

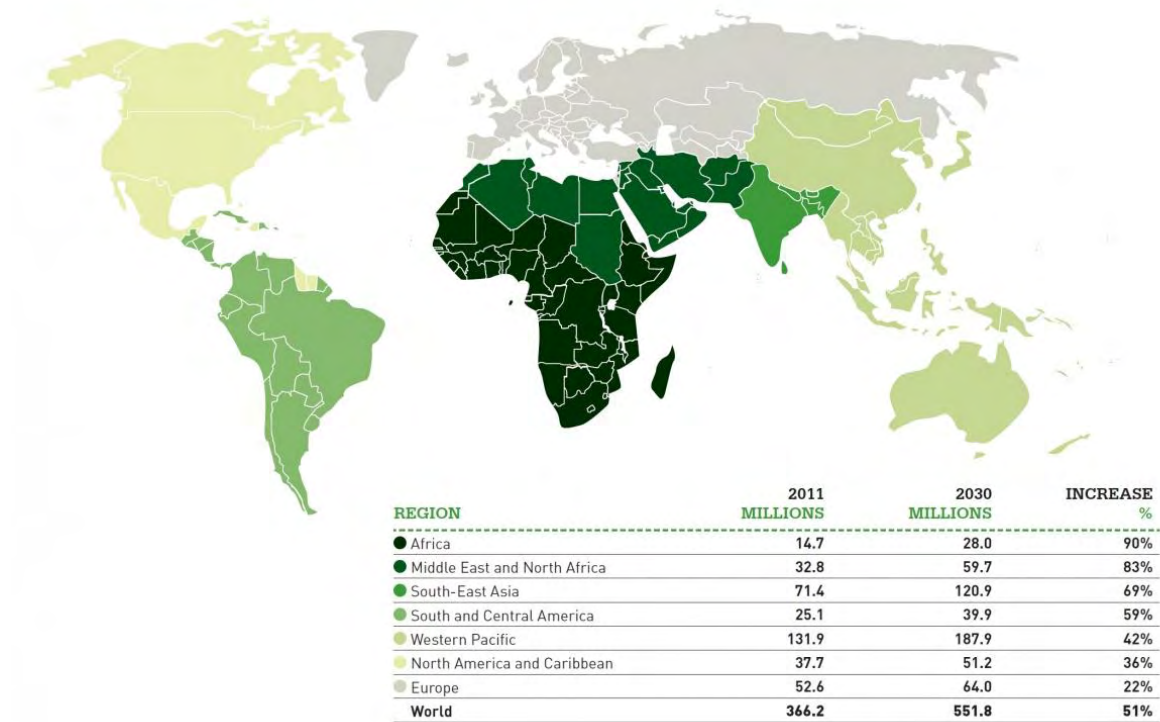


Figure 1 : Prévisions mondiales de prévalence du diabète dans le monde selon l’OMS



### III. Physiologie du métabolisme glucidique

La glycémie est définie par la concentration plasmatique en glucose. La glycémie moyenne à jeun est de 1 g/l ou 5.5 mmol/l [3]. Le maintien d'une glycémie normale permet d'assurer l'homéostasie énergétique de l'organisme. Ce maintien, appelé homéostasie glucidique, est un fin équilibre entre les apports exogènes et les apports endogènes. L'homéostasie est régulée par plusieurs facteurs : endocriniens, nerveux et métaboliques. On décrit 2 situations fonctionnelles bien distinctes : l'état absorptif et l'état post-absorptif.

#### 3.1 Etat absorptif

En période absorptive, la digestion va permettre la transformation des sucres complexes en sucres simples afin d'être absorbables par la muqueuse intestinale. La digestion se réalise :

- par les glandes salivaires avec l'action de l'amylase buccale hydrolysant les longues chaînes d'amidon en oses simples [4]. La cavité buccale est le premier siège de la digestion. Les différentes pathologies altérant la physiologie buccale peuvent perturber le métabolisme glucidique. En effet, les patients atteints de maladie parodontale présentent une augmentation majeure de la concentration salivaire d'amylase [5]. De plus, le LPS des bactéries périopathogènes sont capables de se lier à l'amylase salivaire et d'altérer le fonctionnement de l'amylase salivaire [6]. Ainsi, les infections buccales comme la maladie parodontale peuvent affecter le métabolisme du glucose dès le début de son ingestion buccale [6].

- dans l'intestin : avec la transformation définitive en oses issus des polyosides et des diosides. Cette étape a principalement lieu dans le jéjunum et l'iléon de l'intestin grêle [7].

L'absorption intestinale est un phénomène actif dépendant de mécanismes enzymatiques. En effet, ce phénomène peut être variable en fonction de l'intégrité de la muqueuse intestinale, la température, le pH et les autres facteurs. Un nouveau paramètre pouvant modifier l'absorption du glucose est le microbiote intestinal [8]. En effet, les variations de composition de microbiote sont responsables d'une absorption différente entraînant une modification des phénotypes métaboliques comme la prise de poids et la glycémie à jeun. C'est ainsi que les explorations du microbiote deviennent une piste de recherche innovante pour la prise en charge des maladies métaboliques. Suite à leur absorption, les nutriments ingérés gagnent le sang à partir du tractus gastro-intestinal et assurent les besoins énergétiques de l'organisme. Les hydrates de carbone sont absorbés dans le sang sous forme de monosaccharides. Le réseau vasculaire du tractus digestif rejoint le tronc porte en direction du foie. Ce dernier, en présence d'hyper glycémie et d'hyper insulinémie stocke le glucose sous forme de glycogène (voie de la glycogénèse) et sous forme de lipides (voie de la lipogénèse). Dans ces conditions, le glucose et les lipides alimentaires représentent les sources majeures d'énergie de l'organisme [3]. Le glucose est donc très rapidement utilisé par les différents organes notamment les muscles et le tissu adipeux. Le glucose stocké sera redistribué aux tissus périphériques voie de la glycogénolyse tel que muscles tissus adipeux cerveau... en période postprandiale. Il est à noter que le stockage des lipides dans le foie lors du repas par la voie de la lipogénèse est une caractéristique spécifique des rongeurs qui est minoritaire chez l'homme.

Au cours d'un repas, le muscle squelettique est le consommateur principal de glucose qui stocke 80% des carbohydrates sous forme de glycogène. Ce dernier sera hydrolysé en glucose (voie de la glycogénolyse) en tant que première source d'énergie au cours d'un exercice physique.

Le tissu adipeux et notamment les adipocytes transforment principalement le glucose en acides gras (voie de la lipogénèse) qui se condensent avec le glycéro-phosphate pour donner des triglycérides. Ces derniers seront stockés puis mobilisés en cas de besoin prolongé : jeun prolongé ou exercice physique intense et prolongé. Cette voie est également caractéristique des rongeurs. Elle est minoritaire chez l'homme en effet, les triglycérides des adipocytes sont essentiellement la conséquence du stockage directe des acides gras issus de l'alimentation [9].

Lors d'un repas, la concentration de glucose dans le système porte est importante (10-15 mM). Ainsi, le foie réalise la capture du glucose via le transporteur GLUT2 . Après son transport dans l'hépatocyte, il existe 2 prises en charge anaboliques possibles : soit il est stocké sous forme de glycogène soit il est transformé en  $\alpha$ -glycérol phosphate et en acides gras pour la synthèse de triglycérides. Il peut être également catabolisé en pyruvate/lactate ou en CO<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O dans la mitochondrie.

La majorité du glucose au cours de la phase absorptive va être utilisée pour la fourniture énergétique de l'organisme, le stockage sous forme de glycogène dans le foie et le muscle squelettique appelée glycogénèse, et le stockage sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux appelé lipogénèse.

### 3.2 A Jeun

Comme son nom l'indique, il s'agit des situations à distance des prises alimentaires. Il n'existe plus d'apport de glucose par absorption intestinale. De plus, l'organisme doit maintenir une glycémie normale pour assurer les apports nutritifs aux différents organes notamment le cerveau ne consommant globalement que du glucose. Dans ce but, l'organisme met en jeu plusieurs phénomènes compensatoires à partir du foie et du tissu adipeux.

#### a) La Glycogénolyse

Le foie présente une activité majeure dans la régulation de la glycémie. C'est ainsi qu'à partir du glycogène il va fournir le glucose nécessaire aux besoins énergétiques des tissus. L'hydrolyse du glycogène met en jeu une cascade de réactions de phosphorylases et de clivage.

A jeun, la glycogénolyse est stimulée par les mécanismes de contre-régulation impliquant sécrétion de glucagon, catécholamines glucocorticoïdes et système nerveux autonome. Le glucagon permet entre autre une activation de l'adénylcyclase hépatique assurant une augmentation de l'AMPcyclique intra-cellulaire. Ce dernier métabolite active la protéine kinase A qui active la glycogène-phosphorylase B par phosphorylation. La kinase b va phosphoryler la phosphorylase A devenant active après ajout d'un phosphate. Cette phosphorylase va contribuer à la transformation du glycogène en Glucose 1-phosphate en présence de phosphate inorganique. Le glucose 1-phosphate est transformé en Glucose 6-

Phosphate par la phosphogluco-mutase. Le Glucose 6-Phosphate sera transformé en glucose par la Glucose 6-phosphatase pour être libéré dans le plasma afin de compenser l'hypoglycémie.

#### b) La lipolyse

La lipolyse est stimulée entre autre par les catécholamines et par défaut par déficit d'insuline. Les triglycérides sont hydrolysés par des mécanismes impliquant différentes lipases, en acides gras et en glycérol relargués dans le sang circulant. Ces 2 sources d'énergies seront utilisées par les tissus de l'organisme. Les lipides sont oxydés par les muscles. Le glycérol sera transformé en glucose par le foie (voie de la néo-glucogénèse).

#### c) La Néo-glucogénèse

La voie de la néo-glucogénèse synthétise du glucose à partir des substrats comme le pyruvate, le lactate, le glycérol et les acides aminés. Il s'agit de la synthèse de glucose à partir de précurseurs non glucidiques. La néo-glucogénèse est augmentée au cours du diabète de type 2. En condition physiologique, elle est stimulée par le glucagon, les catécholamines et les corticoïdes et inhibée par l'insuline.

Ces actions présentent la source majeure de glucose pour les organes consommateurs exclusivement de glucose comme le cerveau en période de jeûne.

### IV. Utilisation du Glucose

Le glucose va contribuer à assurer les différentes fonctions de l'organisme. Les différentes réactions de transformation du glucose ont pour objectif de fournir à chaque organe l'énergie nécessaire sous forme d'ATP ainsi que de la chaleur.

#### 4.1 Transport du glucose

L'entrée du glucose dans les cellules est assurée par 2 mécanismes :

- a) Transport par perméases du glucose. Il est dénombré à l'heure actuelle 5 transporteurs membranaires de glucose (GLUT-1 à GLUT-5). Ces protéines ont un poids moléculaire d'environ 54kDa et sont formées de 12 hélices  $\alpha$  emménageant un pore central hydrophile. Ces protéines ont une homologie de séquences mais présentent aussi des séquences spécifiques permettant l'ancrage aux membranes. De ce fait, il existe des différences de répartition des divers transporteurs : GLUT-4 est abondant dans les adipocytes et les cellules musculaires et GLUT-1 est surtout présent dans les érythrocytes. GLUT-4 est régulé en nombre et en activité par l'Insuline (confer paragraphe sur Insuline) [10].
- b) Transport actif ou Cotransport. Le transport est effectué par Na<sup>+</sup>-Glucose (SGLT-1) qui est abondant dans l'épithélium du tube digestif et du rein. Le glucose est transporté du milieu à concentration faible vers l'intérieur de la cellule où la concentration est élevée.

## 4.2 Transformation du Glucose : Glycolyse

La glycolyse peut se faire soit en condition aérobie soit en condition anaérobie. L'énergie produite sera donc sous forme d'ATP substrat majeur de l'organisme.

La glycolyse aérobie va réaliser l'oxydation d'une molécule de glucose en utilisant des liaisons phosphates sous forme d'ATP à partir d'ADP. Cette glycolyse permet une production importante d'énergie permettant d'assurer les fonctions principales de la cellule. La glycolyse aérobie produit également du pyruvate qui sera transformé dans la mitochondrie via le cycle de Krebs.

Il existe 2 étapes :

### a) Etape cytosolique [11] :

On assiste à une série de 10 réactions enzymatiques régulées par 10 enzymes aboutissant à la transformation du glucose en pyruvate.

La première série de réactions est une succession de phosphorylations aboutissant à un intermédiaire le glycéraldéhyde 3-phosphate. Cette phase est une phase de consommation de molécule d'ATP. La deuxième série de réactions est un enchaînement de réactions qui conduisent à la formation d'un pyruvate et de 2 molécules d'ATP suite à l'oxydation d'un glycéraldéhyde-3-P.

A ce stade, le bilan énergétique de cette étape est donc 4 molécules d'ATP produites pour 2 molécules d'ATP consommées car il y a :

Consommation de 2 molécules d'ATP pour la transformation du glucose en dérivés phosphorylés et chaque molécule de glucose produit 2 glycéraldéhyde-3-P qui donneront chacune 1 pyruvate+ NADH,H<sup>+</sup> + 1 ATP.

A la fin de l'étape cytosolique, il existe donc pour chaque molécule de glucose :

- 2 molécules d'ATP
- 2 molécules de NADH,H<sup>+</sup>
- 2 pyruvates

Le pyruvate est métabolisé de différentes façons selon les conditions cellulaires suivantes :

- Présence ou absence d'oxygène dans l'environnement de la cellule
- Le bilan énergétique de la cellule
- Le matériel enzymatique de la cellule permettant d'oxyder le pyruvate. Les globules rouges ne disposent pas de matériel pour oxyder le pyruvate.

## b) Etape mitochondriale d'oxydation du pyruvate en CO<sub>2</sub> [11]:

Le pyruvate est oxydé par la pyruvate déshydrogénase (PDH) dans la mitochondrie en acétyl-CoA et CO<sub>2</sub>. L'acétyl-CoA va être le substrat premier pour le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs est une suite de réactions de déshydrogénations et de décarboxylations aboutissant au relargage d'ions hydrogène et de molécules de CO<sub>2</sub>. C'est une étape limitant du métabolisme énergétique de la cellule fortement contrôlée par l'insuline, les catécholamines, les glucocorticoïdes et le glucagon. La PDH est particulièrement dérégulée au cours du diabète.

## Etape cytosolique de réduction du pyruvate en lactate :

En l'absence de mitochondries (hématies) ou en situation d'exercice prolongé du tissu musculaire, le pyruvate sera transformé en lactate par le NADH,H<sup>+</sup> formé au cours de la glycolyse. Le lactate représente ainsi le produit final de la dégradation du glucose. Le lactate diffuse à l'extérieur de la cellule et sera acheminé dans le foie via le sang afin de contribuer à la néoglucogénèse.

## V. La Régulation de la glycémie

L'homéostasie glycémique est indispensable au maintien de la physiologie. La rupture de l'équilibre glycémique entraîne l'arrêt de la physiologie et le passage vers la fin de l'adaptation physiologique. La glycémie est soumise successivement à des hausses suite à la prise alimentaire et à des baisses après une activité physique ou une période de jeûne. Pour rétablir l'homéostasie, l'organisme a mis en place un système hypoglycémiant et un système hyperglycémiant. La théorie Darwinienne ayant fait son œuvre, l'humanité a été plus souvent en situation de carence alimentaire donc il existe plusieurs systèmes hyperglycémiant alors qu'il n'existe globalement qu'un système hypoglycémiant : l'insuline.

### 5.1 Système Hypoglycémiant : Insuline

L'insuline est une protéine de 6 KDa composée de deux chaînes polypeptidiques : la chaîne A (21 Acides aminés) et la chaîne B (30 acides aminés) reliées entre elles par 2 ponts disulfures. La structure de l'insuline est codée par le bras court du chromosome 11 chez l'homme mais la structure ne varie que de quelques acides aminés chez les mammifères. C'est donc une molécule universelle dans le règne des mammifères [12]. L'insuline présente une cinétique extrêmement bien régulée en réponse à son principal stimulant : l'augmentation de glycémie. Après une augmentation transitoire et aigue de glucose, le pic maximal de sécrétion d'insuline est atteint très rapidement en quelques minutes. En revanche, lors d'une augmentation prolongée de concentration de glucose, on assiste à une réponse sécrétoire en 2 phases. On assiste à un

premier pic précoce avec une grande amplitude suivi d'une libération d'insuline plus prolongée mais moins intense. Cette deuxième réponse est maintenue jusqu'à la fin de l'augmentation de la glycémie. Cette réponse à 2 phases trouve son explication au niveau de la physiologie cellulaire de l'insuline. La première réponse est le fruit de la libération d'insuline immédiatement mobilisable car présente dans les granules au contact de la membrane. La deuxième phase est liée à la libération d'insuline par des granules plus immatures ainsi que par la mise en jeu de la machinerie de synthèse de l'insuline [12].

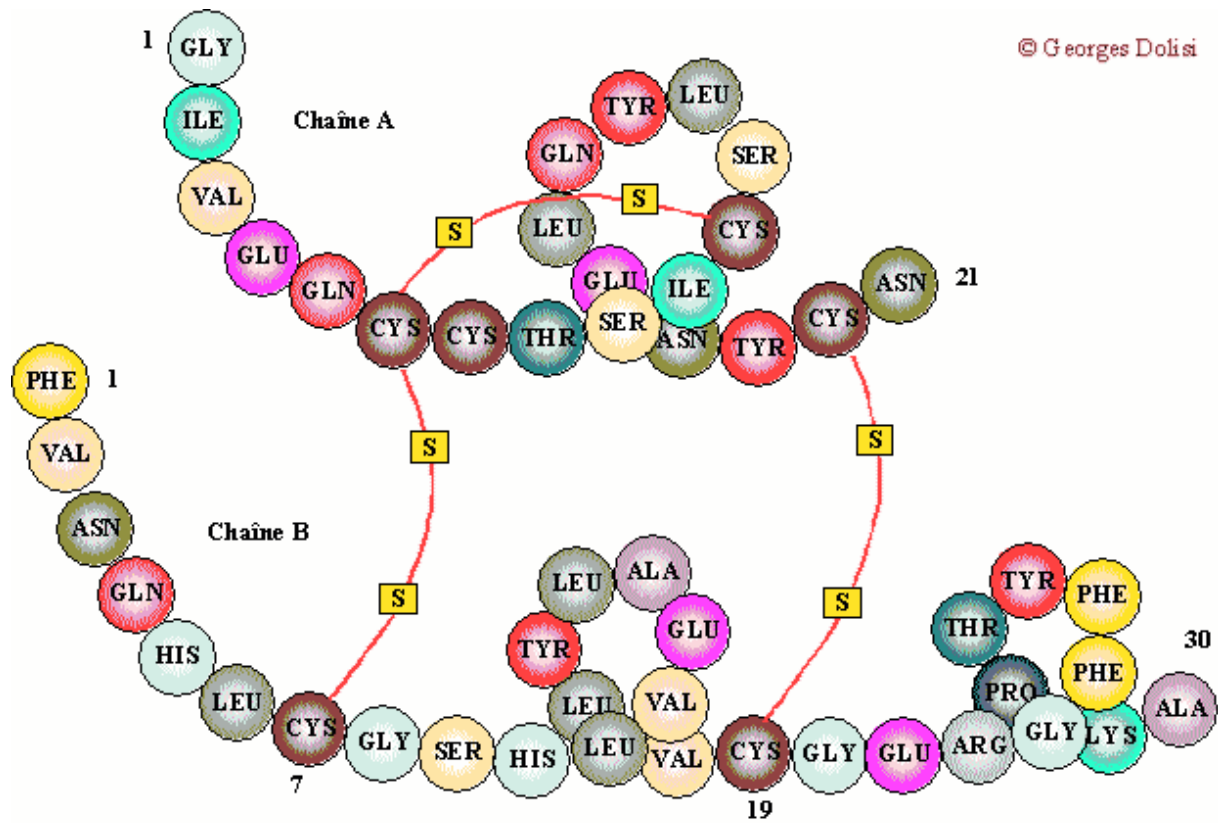


Figure 2 : Schéma de la composition de l'insuline en acide aminé

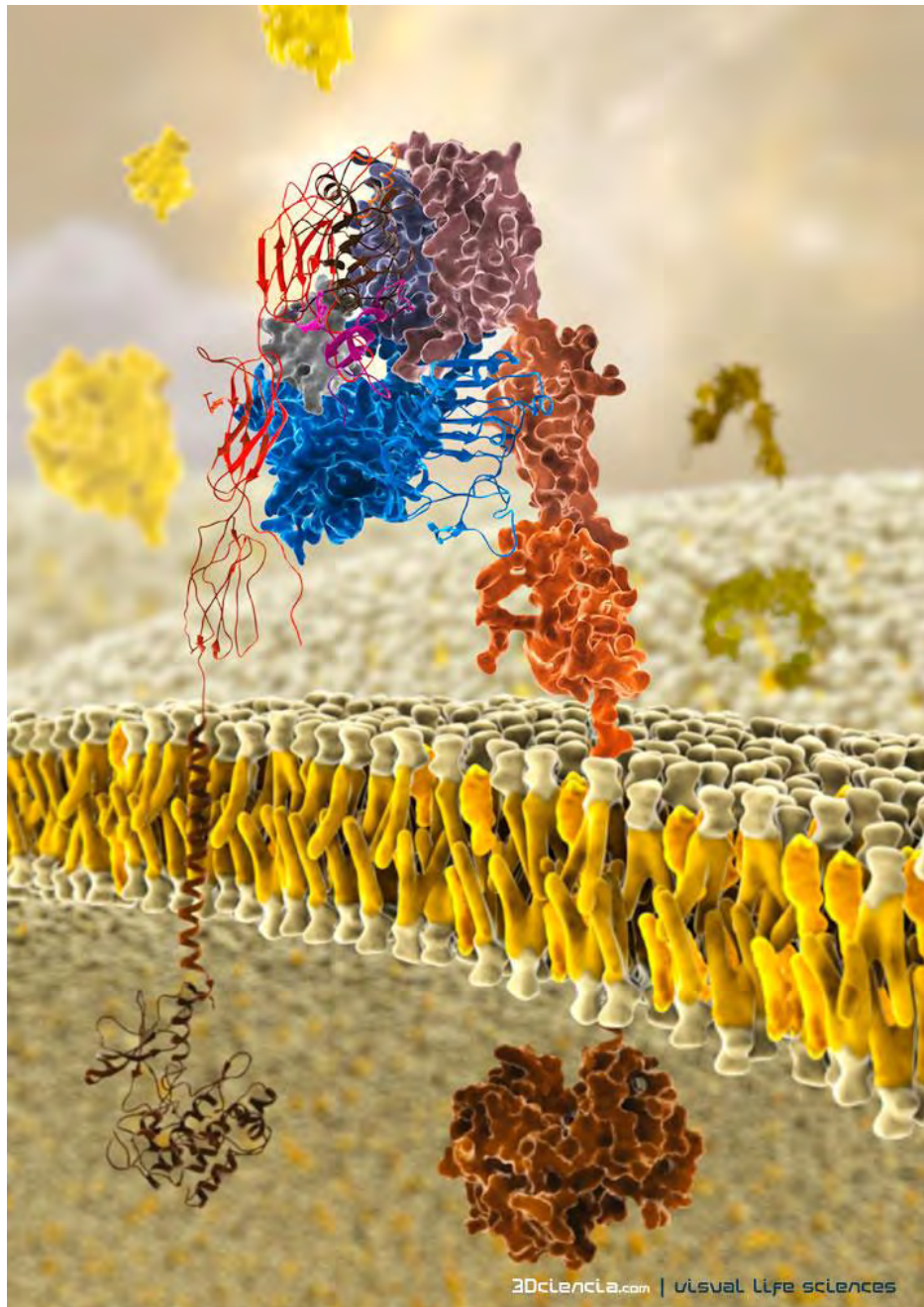
#### a) Biosynthèse de l'Insuline

L'organe responsable de la sécrétion de l'insuline est le pancréas et plus spécifiquement les cellules  $\beta$ . Cette cellule va synthétiser une macromolécule : la pré-pro-insuline (11.5 kDa). Il s'agit de la pro-insuline avec un rajout d'un peptide de 2800Da sur l'extrémité amino-terminale de la chaîne A. Cette molécule sera synthétisée dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) et plus spécifiquement dans les ribosomes. Cette séquence peptidique de 2500 Da sera éliminée par des peptidases spécifiques donnant ainsi la pro-insuline composée de : une molécule d'insuline 6 kDa et une autre partie peptidique (peptide C 3 kDa) reliant l'extrémité N-terminale de la chaîne A et l'extrémité C-terminale de la chaîne B. Les ponts di-sulfures reliant les 2 chaînes seront eux aussi formés dans le RER [13].

#### b) Récepteur à l'Insuline

Le récepteur à l'insuline appartient à la famille des récepteurs à Tyrosines Kinases. Il s'agit d'un hétéro dimère constitué de 2 paires de sous-unités : 1 paire de sous-unités transmembranaires  $\beta$  (80kDa) portant l'activité tyrosine kinase et 1 paire de sous-unités  $\alpha$  (120 kDa) positionnées à la surface de la membrane pour fixer l'hormone avec une partie glucidique. La liaison de l'hormone active le récepteur et entraîne une auto-phosphorylation du récepteur. De plus, la liaison de cette hormone modifie la sous-unité  $\alpha$  et active la sous-unité  $\beta$  afin d'activer le de conformation de la sous-unité regroupement des récepteurs [10].





**Figure 3 : Reconstruction en 3 dimensions du récepteur à l'insuline et son ancrage dans la membrane cellulaire**

Cette nouvelle conformation permet l'activation de l'activité kinase de la sous-unité  $\beta$ . Les récepteurs regroupés vont se phosphoryler mutuellement sur leurs résidus tyrosine. Le motif Tyrosine en position 960 est d'un intérêt particulier car sa phosphorylation autorise la fixation des IRS-1 et IRS-2. Ces molécules sont à l'origine de la voie de signalisation intra-cellulaire de l'insuline. En leur partie C-Terminale, elles présentent des sites tyrosines phosphorylables permettant la fixation d'autres molécules effectrices comme Gab1, SH2, Shc. Il existe 2 voies de signalisation dont 2 modes distincts: voie PI-3 kinase et voie des MAP kinase. La voie PI-3 Kinase présente un intérêt particulier en métabolisme car elle régule l'expression de GLUT-4 (transporteur du glucose). IRS-1 phosphorylé par le récepteur se fixe à la kinase PI3 via le domaine SH2 de IRS-1. PI3 Kinase phosphoryle les lipides membranaires PIP2 en PIP3. PIP3 sera reconnu par Akt2 et PDK1 et il existe une phosphorylation et une activation d'Akt2 par PDK1. PDK1 phosphoryle les isoformes de la protéine Kinase  $\zeta$  et  $\lambda$  [12]. Ces protéines jouent un rôle pilote dans la translocation du transporteur GLUT4 dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux. Quant à elle, Akt2 réalise la phosphorylation des effecteurs TBC1D1 et AS160. Cette phosphorylation inhibe l'activité GTPase via « GTPase-activating domain » - GAP et augmente ainsi l'hydrolyse du GTP par les protéines Rab. Ceci permet une augmentation de la forme Rab-GTP connue pour favoriser la translocation des vésicules de stockage de GLUT4 ainsi que l'exocytose des vésicules. Ainsi, cette voie PI-3 kinase contribue doublement à l'expression de GLUT4 sur la membrane plasmique [14].

La voie MAP kinase (mitogen-activated protein) entraîne l'activation de Grb2 pour activer les effecteurs ERK-1 et ERK-2 (extracellular signal regulated kinase). Cette cascade de phosphorylation est responsable des effets endothéliaux ainsi que des effets sur la croissance cellulaire de l'insuline.

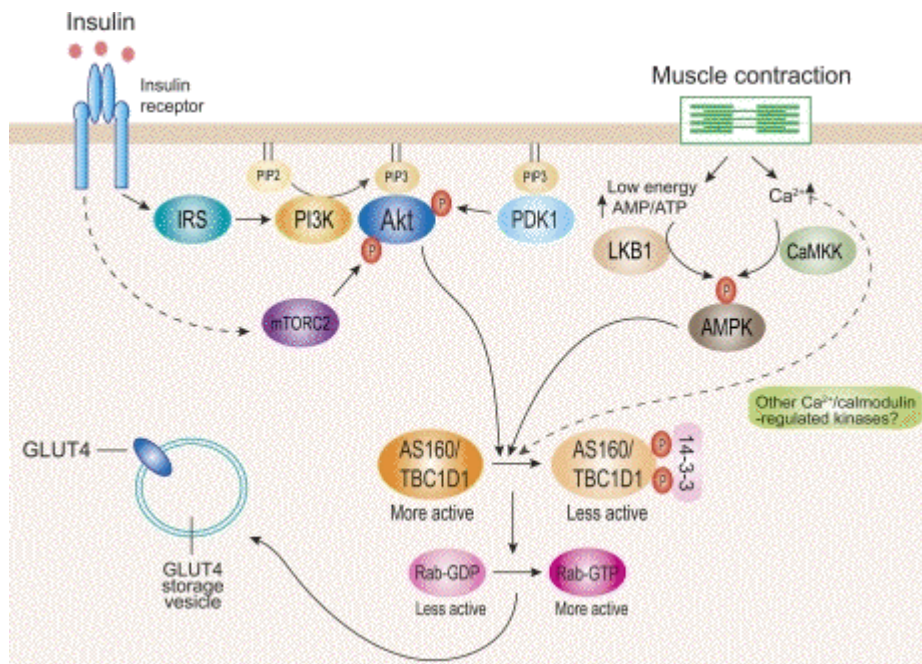


Figure 4 : Cascade du récepteur à l'insuline impliqué dans la régulation de GLUT 4 [14]

### c) Insuline et Métabolisme glucidique

L'insuline est l'hormone pilote de la régulation glucidique mais joue un rôle dans la régulation des autres nutriments comme les lipides et les protéines. L'activité principale de l'insuline est d'assurer l'entrée du glucose dans les tissus. Comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, son action régule l'exocytose de GLUT4 transportant le glucose dans la cellule. Ceci permet une meilleure entrée du glucose dans les cellules régulées par l'insuline. Il existe 3 tissus majeurs cibles de l'insuline : le foie, le muscle et le tissu adipeux.

#### c.1) Foie et Insuline

L'insuline stimule la glycogénèse permettant le stockage du glucose dans le foie sous forme de glycogène. Parallèlement, elle inhibe la néoglucogénèse en bloquant la fabrication du glucose à partir de précurseurs non glucidiques comme les protéines. Elle inhibe également la glycogénolyse hépatique en bloquant l'action de la phosphorylase du glycogène[15].

#### c.2) Muscle et Insuline

Le muscle comme le cerveau est un des organes majeurs de consommation du glucose. Sous la stimulation de l'insuline, le muscle comme tous les organes insulino-sensibles, va favoriser l'entrée du glucose dans ses cellules. En effet, l'insuline favorise la translocation de GLUT4 permettant un transport accru de glucose. De plus, l'insuline active la glucose 1 phosphate uridyl-tranferase pour convertir le glucose en glycogène permettant un meilleur stockage intracellulaire [10].

#### c.3) Tissu adipeux et Insuline

L'insuline présente une activité spécifique sur le tissu en assurant la lipogénèse. En effet, l'insuline via la stimulation de GLUT-4 stimule la pénétration du glucose dans les adipocytes. De plus, elle stimule la transformation du glucose en acides gras et inhibe les enzymes comme la triglycéride-lipase permettant la lipolyse. En revanche, l'insuline active la voie de la lipogénèse en stimulant la lipoprotéine-lipase [16].

### 5.2 Systèmes Hyperglycémiantes :

La majorité des systèmes hyperglycémiantes est de nature hormonale. Leur action est centralisée sur les organes pilotes du métabolisme glucidique comme le foie et le muscle. Elles vont pouvoir agir :

- soit dans des temps très courts : système d'urgence
- Soit dans des temps plus longs : système d'usage

## a. Système d'urgence

### a.1) Les catécholamines

Les catécholamines impliquées sont l'adrénaline et la noradrénaline. L'adrénaline trouve son origine dans les médullo-surrénales alors que la noradrénaline vient du système nerveux. De ce fait, le système sympathique stimule la sécrétion de glucagon par un effet  $\alpha$  et  $\beta$  adrénergique alors qu'elle inhibe celle de l'insuline par un effet  $\alpha$ -adrénergique. Elles vont donc agir en synergie avec le glucagon après stimulation par une hypoglycémie. Les catécholamines vont mobiliser le stock de glycogène en stimulant la Glycogénolyse au niveau du foie. De plus, elle stimule la néo-glycogénèse. Au niveau adipocytaire, elles activent la Lipase Hormono-sensible responsable de l'hydrolyse des triglycérides et donc de la lipolyse [17].

### a.2) Le glucagon

Il est sécrété principalement par les cellules  $\alpha$  des îlots de Langerhans du pancréas. Il s'agit d'une hormone peptidique de 29 acides aminés et d'un poids de 3500Da. Sa sécrétion est régulée à la fois par l'hypoglycémie via les catécholamines mais aussi par l'effort physique. De plus, c'est un puissant stimulant de la sécrétion d'insuline. D'autre part, il s'oppose aux effets de l'insuline et trouve son action principalement dans le foie. Le glucagon provoque une augmentation du taux de l'AMPc dans les cellules hépatiques et entraîne une augmentation de la glycogénolyse et de la néo-glycogénèse. De plus, il présente une action sur le tissu adipeux en stimulant la lipolyse [18].

## b. Système d'action prolongée

### b.1) Le Cortisol

Le cortisol est une hormone glucocorticoïde produite par le cortex surrénal responsable d'une hyperglycémie. Le cortisol est sécrété lors des périodes de jeûne et entraîne une stimulation dans la néo-glycogénèse hépatique et de la lipolyse. Il présente aussi un effet spécifique dans le tissu adipeux et le muscle en diminuant le nombre de récepteurs à l'insuline ainsi que leur affinité[19].

### b.2) La Somathormone ou Hormone de Croissance

Il s'agit d'une hormone sécrétée par l'hypophyse agissant sur la croissance et l'anabolisme protéique. Elle est constituée de 191 acides aminés. Elle présente une action paradoxale car à faible dose elle stimule la sécrétion d'insuline alors qu'à forte dose elle est inhibitrice. Elle est donc hyperglycémiant à forte dose. Elle diminue la capture du glucose dans le tissu adipeux et dans le muscle [20].

## VI. Physiopathologie du diabète

Le diabète de type 2 touche 5% de la population mondiale mais tous les patients diabétiques ne présentent pas les mêmes anomalies métaboliques. On constate 3 paramètres isolés ou combinés chez ces patients : une intolérance au glucose, une insulino-résistance et une diminution de la sécrétion d'insuline à terme. Cette triade pathologique est à l'origine d'un défaut d'efficacité de l'insuline sur les organes périphériques comme le foie, le muscle et le tissu adipeux.

### 6.1 Les troubles de sécrétion de l'insuline

Les troubles de sécrétion de l'insuline sont étroitement liés aux patients diabétiques de Type II. Au cours de la maladie, on constate une altération progressive du système de l'insuline ce qui permet d'affirmer qu'il existe une atteinte des cellules  $\beta$  du pancréas dans la majorité des diabètes. Dans un premier temps, la charge corporelle augmentée de glucose va être compensée par une expansion de masse des cellules  $\beta$ . A terme, il existe un épuisement des cellules  $\beta$  du pancréas responsable de la survenue de l'hyperglycémie. Ainsi, le patient rentre dans un cercle vicieux où l'hyperglycémie contribue également à l'atteinte pancréatique en entraînant une apoptose des cellules  $\beta$  [21]. Ainsi, le diabète de type II s'aggrave au cours de la vie des patients. Le contrôle glycémique est étroitement corrélé à la survenue des complications. L'étude UKPDS a montré que l'aggravation inévitable du diabète de type II était associée à l'épuisement du potentiel de sécrétion d'insuline. Cette affirmation fut posée par dosage du peptide C après stimulation par le glucagon.

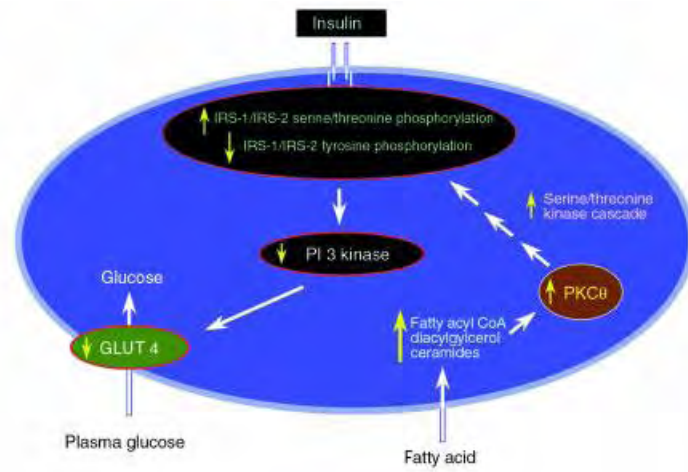
Cependant, l'étiologie moléculaire responsable de l'altération de la sécrétion à l'insuline reste à déterminer. L'hypothèse génétique fut proposée à travers le gène de l'insuline mais les mutations du chromosome 11 restent rares. D'autre part, des mutations du gène porté sur le chromosome 7 codant pour la glucokinase présente une fréquence de 10 % chez les patients diabétiques [22]. A l'heure actuelle, les études ne permettent pas d'affirmer l'imputabilité unique de ces mutations à l'hyperglycémie. L'hypothèse rencontrant un consensus propose le concept de glucotoxicité [23] et de lipotoxicité [24]. L'hyperglycémie altère la réponse des cellules  $\beta$  au stimulus d'augmentation de glucose sanguin. De plus, l'alimentation trop grasse augmente les acides gras libres dans l'organisme. Ce désordre systémique retentit sur le débit hépatique et diminue l'entrée du glucose dans les tissus périphériques. En réponse, on assiste à une oxydation accrue des acides gras entraînant une augmentation d'acétyl CoA stimulant la néoglucogénèse et une diminution de la glycolyse. De ce fait, les acides gras contrebalancent l'action de l'insuline et contribuent à l'altération de l'insulino-sécrétion [23]. On assiste donc à un cycle vicieux aboutissant à la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas entraînant une altération de la sécrétion d'insuline.

## 6.2 L'insulino-Résistance et ses implications

L'insulino résistance est définie par l'altération de la sensibilité à l'insuline de l'organisme [25]. Elle est caractéristique du diabète et touche préférentiellement les tissus cibles de l'insuline comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Elle possède une genèse complexe. La concentration sanguine d'insuline élevée dans les cas de désordres métaboliques participe elle-même à la sensibilité à l'insuline.

L'insulino-résistance impact l'organisme sur différents effecteurs et notamment au niveau des récepteurs à l'insuline. Les altérations de la concentration sanguine d'insuline et de glucose interagissent avec l'activité de ces récepteurs à l'insuline. Ainsi, l'insulino-résistance trouve son origine dans plusieurs altérations des récepteurs :

- Endocytose destructrice des récepteurs à l'insuline. L'hyper insulinémie prolongée exerce un rétrocontrôle négatif sur le nombre et la densité des récepteurs à la surface des cellules [26]
- Modification du site de liaison à l'insuline des récepteurs. Il a été mis en évidence des mutations du récepteur chez les patients diabétiques perturbant la fixation de l'insuline et l'ancrage du récepteur à la surface des cellules [27]
- Altération du signal de l'insuline. La fixation ligand-récepteur s'effectue correctement mais il existe une altération de la cascade des kinases en aval du récepteur [12].
- Les acides gras sont également responsables d'une insulino-resistance en altérant l'homéostasie glucidique du muscle, du foie et du tissu adipeux. En effet, les acides gras au cours de leur métabolisme sont transformés en acyl-CoA et en diacylglycérol qui activent la protéine kinase C. Cette kinase va phosphoryler IRS impliqué dans la voie de signalisation de l'insuline sur son résidu Sérine au lieu du résidu tyrosine. Cette phosphorylation inadéquate entraîne une baisse de recrutement de la PI3-Kinase régulant le transport à l'insuline. Il existe donc un défaut de transport du glucose induit par les acides gras via la diminution de GLUT4 [28] (Figure 5)
- D'autre part, les acides gras stimulent la néoglucogenèse hépatique. L'oxydation des acides gras induit la production des cofacteurs de la néoglucogenèse (NADH, acétyl-CoA et ATP). Ces facteurs orientent le métabolisme du pyruvate vers la voie du glucose en stimulant la pyruvate carboxylase et en inhibant la pyruvate déshydrogénase. Cela entraîne une augmentation de production de glucose [29].
- Les acides gras sont également impliqués dans le cycle de Randle. Ils sont métabolisés en acétyl-CoA qui rentre dans le cycle de Krebs pour devenir du citrate. L'augmentation de la concentration de citrate inhibe la phosphofructokinase entraînant l'accumulation de fructose-6-phosphate et de glucose-6-phosphate. Cette augmentation entraîne la diminution du transport de glucose et donc une augmentation de la concentration de glucose intracellulaire [30].



**Figure 5 : Mécanismes impliquant les acides gras dans le transport du glucose dans un contexte d'insulino-résistance**



L'insulino-résistance trouve son origine à plusieurs niveaux et on assiste à une cascade de dysfonctionnements entraînant une hyperglycémie chronique et donc un diabète. L'insulino-résistance touche préférentiellement les organes du métabolisme comme le foie, tissu adipeux et muscle.

Dans le foie, on assiste à une augmentation de la production hépatique de glucose de près de 20% par rapport à un sujet sain. Parallèlement, on constate une augmentation de la néoglucogénèse basale au cours du jeûne. Il existe également une altération du métabolisme des acides gras liée à leur concentration sanguine élevée. Cette concentration sanguine élevée contribue à stimuler la production hépatique de glucose via la néo-glucogénèse. Ces perturbations métaboliques contribuent à entretenir l'hyperglycémie à jeun constatée au cours du diabète de type II [31].

Dans le tissu adipeux, à jeun on constate une lipolyse accrue chez le patient diabétique. Comme nous venons de le dire, cette concentration en acide gras augmente l'hyperglycémie via le métabolisme glucidique du foie. Ce cycle vicieux est entretenu par le fait que l'obésité est un facteur de risque du diabète et un grand pourcentage des diabétiques est obèse.

Le muscle squelettique est le tissu périphérique le plus atteint par l'IR. Il existe des dysfonctionnements de la protéine-tyrosine phosphatase. Elle est impliquée dans la déphosphorylation de la sous-unité  $\beta$  du récepteur à l'insuline et d'autres effecteurs de la cascade cytosolique notamment les IRS-1 et 2 [32]. Ces protéines sont préférentiellement liées aux fibres du cytosquelette afin de se fixer plus facilement à la partie cytoplasmique du récepteur à l'insuline. L'hyper-insulinémie est responsable d'une délocalisation des IRS dans le cytoplasme sous forme libre. Cette nouvelle conformation altère la capacité de liaison des IRS aux récepteurs. Ces mécanismes contribuent à altérer le signal induit par la fixation de l'insuline à son récepteur. De plus, il existe un défaut de synthèse du glycogène lié à un défaut de captation du glucose de la périphérie vers la cellule musculaire. En effet, on constate une diminution de l'exocytose de GLUT4 chez les sujets diabétiques [10]. Le phénomène physiopathologique altérant la translocation de GLUT 4 reste encore mal connu mais des hypothèses proposent l'implication du défaut de signal de l'insuline.

## VII. L'inflammation-Immunité-Microbiote : nouveau paradigme de l'IR

Depuis quelques années, un nouveau concept propose que le diabète soit caractérisé par une inflammation chronique de bas grade [33]. En effet, les patients diabétiques présentent une augmentation des taux sériques des molécules pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 signant l'activation des voies de l'inflammation [20]. La preuve épidémiologique fut apportée par l'implication de l'augmentation des médiateurs de l'inflammation dans l'incidence de la survenue de diabète [31].

Les études scientifiques ont eu pour but de disséquer les mécanismes moléculaires liant l'inflammation au diabète. La première observation fut la sur-expression du TNF- $\alpha$  à la fois

dans le sang mais aussi dans le tissu adipeux de souris obèses [34]. D'autre part, le traitement par anti-TNF- $\alpha$  améliorerait significativement la capture du glucose dans le tissu adipeux en réponse à l'insuline mais aussi la glycémie sanguine [20]. On comprend donc le rôle crucial du TNF- $\alpha$  dans la régulation de la sensibilité à l'insuline. Parallèlement, ces études furent confirmées chez l'homme où le tissu adipeux et le muscle issus de patients obèses sont fortement concentrés en TNF- $\alpha$  [35].

L'autre cytokine très impliquée dans les atteintes métaboliques est l'IL-6. Comme le TNF- $\alpha$ , les sujets obèses présentent une augmentation forte de la concentration d'IL6 dans le tissu adipeux viscéral et sous-cutané [36]. Il existe donc une augmentation des cytokines pro-inflammatoires chez les diabétiques. Naturellement, la question fut de comprendre comment ces cytokines peuvent altérer la sensibilité à l'insuline. Les cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou l'IL-6 mais également les acides gras vont activer les kinases JNK. Ces kinases vont phosphoryler les effecteurs cruciaux du signal insulinémique IRS-1 et 2 sur leur résidu serine. IRS-1 et 2 phosphorylés en serine ont une difficulté à se fixer au récepteur à l'insuline et entraînent une altération de la transcription du signal. De plus, JNK régule également le facteur de transcription AP-1 responsable d'une inhibition du signal à l'insuline. Parallèlement, les cytokines et les acides gras activent la voie IKK inhibant l'action de l'insuline en activant le facteur de transcription NF- $\kappa$ B [33].

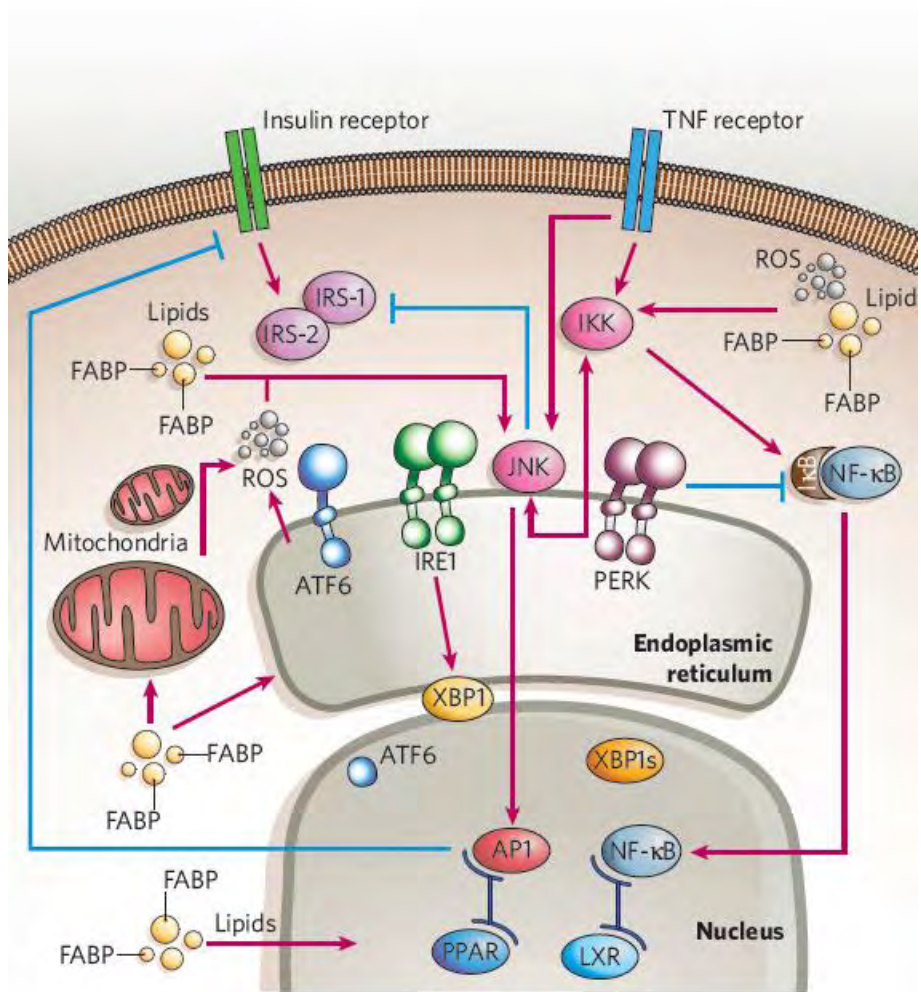


Figure 6 : Schéma des cascades moléculaires impliquant l'inflammation dans l'IR [33]

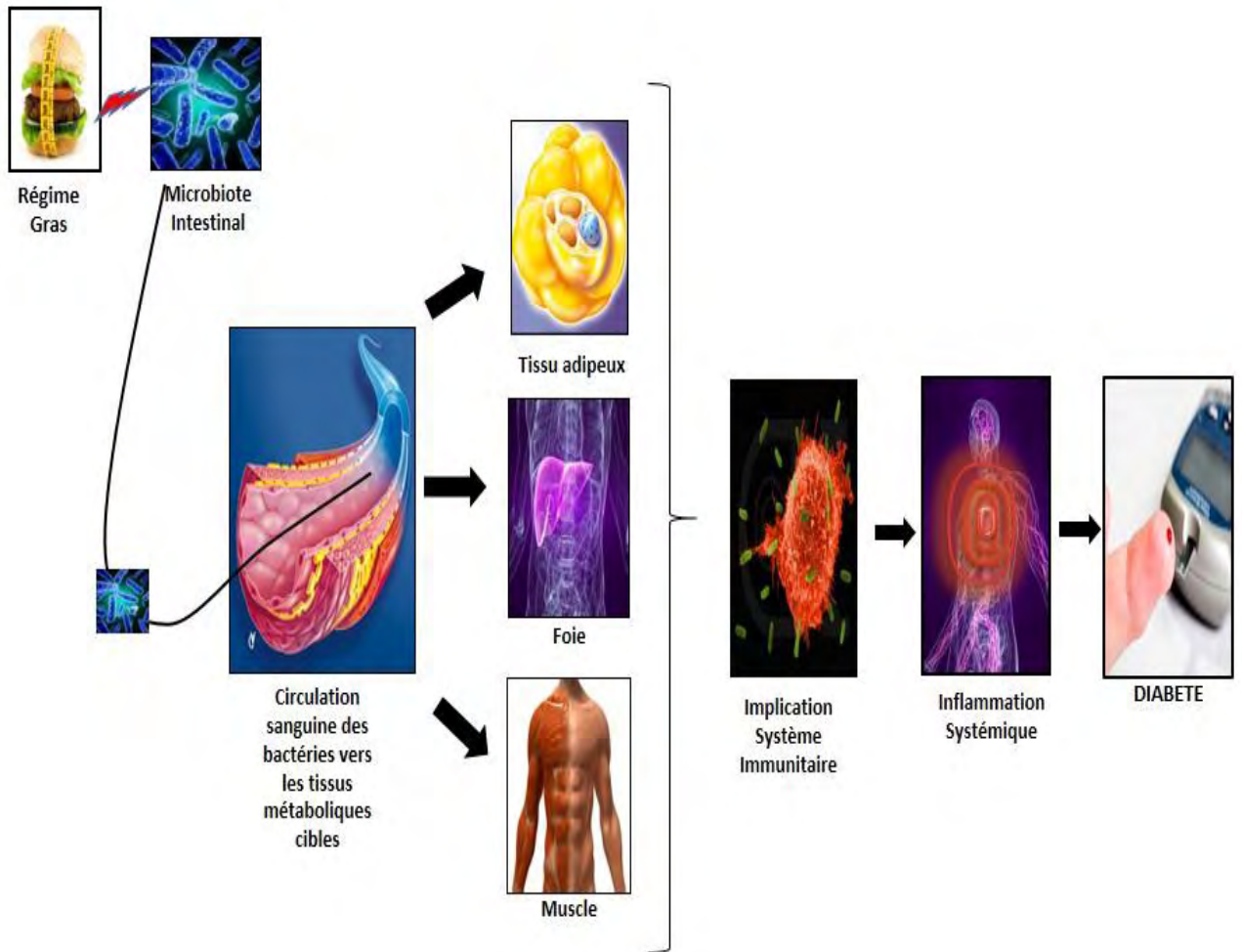
Après avoir compris les mécanismes, les scientifiques ont voulu travailler sur les acteurs de l'inflammation impliqués dans l'insulino-résistance. Les biopsies du tissu adipeux de patients obèses montraient une infiltration majeure de macrophages [37]. De plus, il existe une polarisation différente de ces macrophages en fonction de l'état diabétique. En effet, les macrophages infiltrant le tissu adipeux présentent des caractéristiques pro-inflammatoires [38]. D'autre part, on constate un switch de polarisation des macrophages d'un profil anti-inflammatoire M2 vers un profil pro-inflammatoire M1 dans les désordres métaboliques [39]. Cette activation M1 est induite par des antigènes comme le LPS des bactéries Gram- ou l'IFN- $\gamma$  [40]. Ce profil pro-inflammatoire augmente la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12 et active iNOs et donc la production de réactifs de l'oxygène. Ainsi, les tissus périphériques des patients diabétiques présentent un infiltrat de macrophages [41] propice à une réaction immuno-inflammatoire inappropriée. Donc, il existe une activation de la réponse du système immunitaire innée dans un contexte dysmétabolique.

Un autre concept propose le système immunitaire acquis et notamment les lymphocytes comme nouvel acteur. Le tissu adipeux de sujets obèses présente une modification de profil des lymphocytes T vers un profil Th1 propice au recrutement des macrophages et de leur polarisation en type M1 [42]. Un traitement par anticorps dirigés contre les lymphocytes T permet de diminuer l'infiltration macrophagique chez la souris nourrie par régime gras [37]. Cette modification du potentiel immunitaire acquis pourrait signer le stade premier du développement de l'insulino-résistance [37]. De plus, ces lymphocytes CD4+ et CD8+ présents dans le tissu adipeux hypertrophié sont à l'origine d'une sécrétion d'IFN $\gamma$  et de molécules pro-inflammatoires connus pour altérer les voies métaboliques [43]. Parallèlement, Winer et coll. ont proposé également l'implication des lymphocytes B dans le tissu adipeux de souris mangeant gras [44]. L'infiltrat lymphocytaire du tissu adipeux présente un effet délétère sur le métabolisme glucose via l'activation des voies pro-inflammatoires des macrophages [45]. L'immunité adaptative présente donc également un intérêt particulier dans le contrôle des maladies métaboliques.

Ainsi, l'altération de la réponse immuno-inflammatoire est constatée dans les désordres métaboliques mais l'étiologie de cette activation reste à déterminer. Des concepts modernes proposent que la composition des microbiotes bactériens diffère entre patient diabétique et patient sain [46]. Il est à l'heure actuelle admis que le microbiote intestinal soit un nouvel organe métaboliquement actif. Ce microbiote est constitué d'un génome riche de millions de gènes appelés: le microbiome pouvant évoluer en fonction de l'alimentation et des facteurs environnementaux. Chaque individu possède au moins 160 espèces bactériennes partagées et il s'établit une relation de symbiose entre hôte et espèces microbiennes. Le microbiote intestinal humain est principalement composé de deux phyla dans les modèles humains et rongeurs : les *Bacteroidetes* et les *Firmicutes* [41]. Les auteurs ont donc proposé qu'une composition ou un rapport différent entre les espèces bactériennes entraînent des réponses variables aux divers apports alimentaires. La première preuve de ce concept est que le microbiote intestinal est différent entre les individus obèses et minces [47]. De plus, les patients obèses présentent des ratios différents entre *Bacteroidetes* et *Firmicutes* par rapport à des sujets maigres. Les patients obèses sont également caractérisés par une réduction de la diversité bactérienne et une altération de la représentation des gènes bactériens [48]. L'imputabilité du microbiote intestinal fut apportée par le développement de l'obésité chez des souris sans germes pathogènes après avoir

été colonisées par la flore microbienne issue de souris obèses [49]. Les études actuelles suggèrent qu'une alimentation riche en graisse impacte directement sur le microbiote intestinal et modifie l'expression des molécules antigéniques bactériennes [46]. Ainsi, cette dysbiose est à l'origine d'un nouveau rapport entre hôte et microbiote pouvant présenter un facteur de risque de développement des maladies métaboliques [50]. Les travaux récents de notre laboratoire ont démontré que la concentration en facteurs d'origine bactérienne les lipopolysaccharides (LPS) est augmentée dans le sang chez l'homme et les modèles animaux de diabète et d'obésité [25]. Ce phénomène est appelé « endotoxémie métabolique ». Elle était notamment corrélée avec la proportion de graisses dans l'alimentation et avec les variations du ratio *Bacteroidetes* et *Firmicutes* dans le microbiote intestinal [51]. Il est admis que le régime riche en graisse modifiait la flore intestinale en favorisant un enrichissement en bactéries riches en LPS les Gram négatives [52]. Le traitement par des antibiotiques diminuait la composition du microbiote et l'endotoxémie métabolique améliorant le contrôle métabolique [53].

Ainsi, l'inflammation métabolique trouve son étiologie dans les microbiotes bactériens pouvant perturber la réponse inflammatoire innée et acquise (résumé en Figure 7).



**Figure 7 : Schéma des hypothèses impliquant le microbiote dans le diabète**

# La maladie Parodontale

Les maladies parodontales sont décrites comme des infections bactériennes associées à une inflammation des tissus de soutien de la dent. Ces atteintes intéressent dans un premier temps la gencive marginale et sont appelées gingivites. Dans un deuxième temps, elles peuvent s'étendre à l'ensemble du parodonte profond (os-ligament-cément) et portent le nom de parodontites [54].

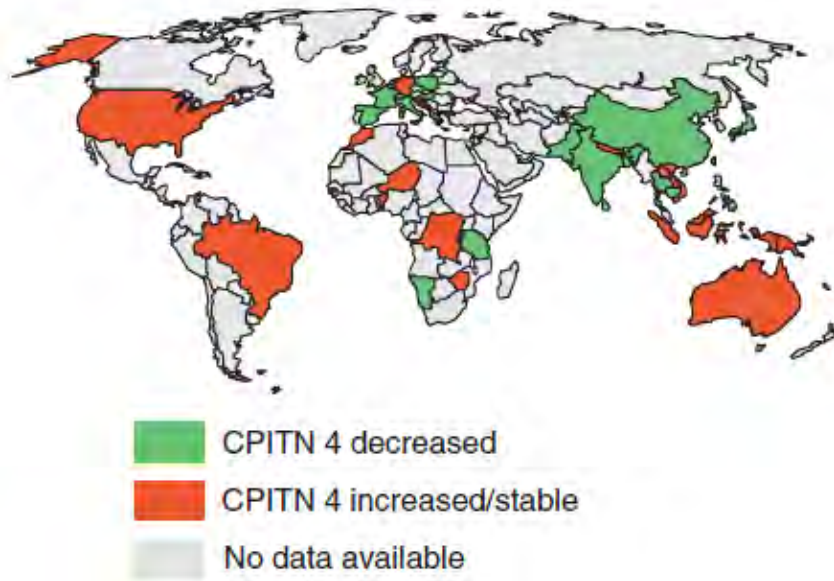
## I. Epidémiologie

### 1.1 Prévalence et Incidence

La prévalence et l'incidence de la maladie parodontale dans la population sont en relation directe avec certains facteurs de risque. Les données épidémiologiques montrent que la prévalence et la sévérité de la maladie parodontale augmentent avec l'âge [55].

La parodontologie est une médecine dentaire récente et il existe des difficultés d'évaluation précises quant à la prévalence des maladies parodontales en France [56]. En 2002 et 2003, la première enquête nationale française (NPASES I) a étudié la prévalence de la maladie parodontale sur un échantillon représentatif de la population française adulte (2144 sujets). Les résultats montrent une importante prévalence de la gingivite liée à la plaque, puisque 51.7% de nos compatriotes ont un ou plusieurs signes de cette affection. On observe également une importante prévalence des parodontites, 20 % des sujets examinés présentant au moins une perte d'attache et 50% des sujets examinés présentent une perte d'attache  $> 3\text{mm}$  et  $< 5\text{mm}$ . Les parodontites dans leur ensemble intéressent 19 388 000 français entre 35 et 65 ans [57].

Ces chiffres sont à confronter aux évaluations mondiales. La prévalence est stable au cours du temps voire augmentée dans les continents comme l'Asie, l'Amérique et l'Europe bien que la morbidité reste très élevée [58].



**Figure 8 : Analyse mondiale de la prévalence de la maladie parodontale dans le monde [58]**



## 1.2 Les facteurs de risques des maladies parodontales

### a) Facteurs de risques généraux

#### a.1) Hérité et Génétique

Le rôle de l'hérédité en tant que facteur de risque reste encore incertain mais des études suggèrent l'existence d'un caractère familial commun à la maladie parodontale avec une similitude de lésions cliniques et d'âge de développement de la maladie dans une même famille. Ces observations aident à la prise en charge thérapeutique. D'autre part, de nombreuses études ont montré l'implication du polymorphisme génétique dans le développement et la sévérité des parodontites. Il existe des évidences sur le rôle du polymorphisme des gènes pour l'IL1- $\beta$ , FcyRIIIb et TLR 4 dans la susceptibilité à la parodontite agressive. D'autre part, les polymorphismes des gènes l'IL1- $\beta$ , récepteur à l'IL1- $\beta$ , IL-6, IL-10, CD14 et TLR-4 semblent associés à la susceptibilité à la parodontite chronique [59] avec un effet sur le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et des macrophages [60].

#### a.2) Facteur nutritionnel

Le rôle de la nutrition dans le développement des maladies parodontales reste à définir. Cependant, la majorité des études porte sur l'impact de la malnutrition sur le tissu parodontal et le système immunitaire.

C'est ainsi que nous pouvons mettre en évidence les conséquences de différentes carences :

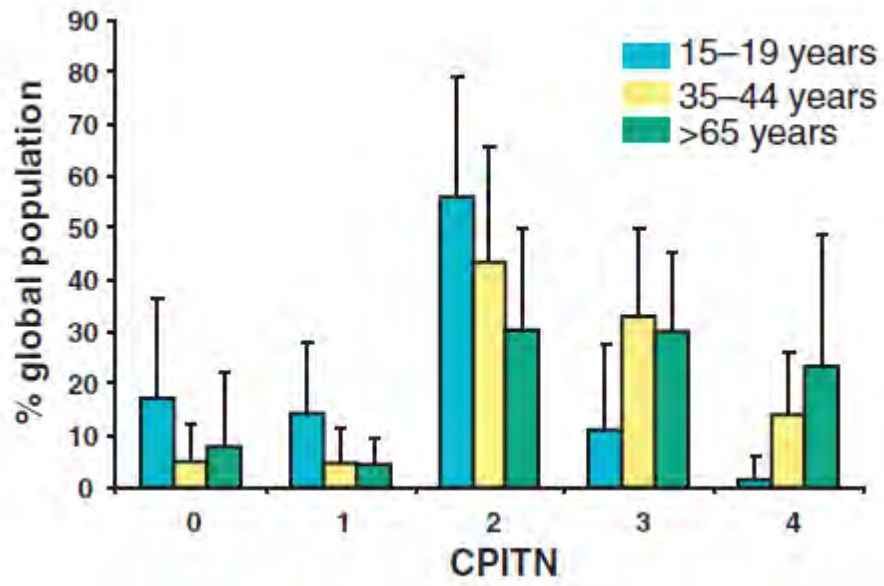
- La carence en calcium ou en zinc altère le métabolisme osseux et ligamentaire entraînant une diminution de la résistance à l'agression des tissus parodontaux chez l'animal [61],
- La carence en vitamine A modifie le métabolisme des fibroblastes et altère la cicatrisation du tissu conjonctif et épithélial [62],
- La carence en vitamine D impacte le métabolisme phospho-calcique osseux et entraîne des phénomènes de résorptions [63],
- La carence en vitamine B perturbe le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et des macrophages et pourrait être responsable d'une diminution du nombre des lymphocytes T CD4, CD8 et des lymphocytes B sur le site infectieux [64].

Une seule étude a démontré que l'hyperlipidémie entraîne une diminution des défenses immunitaires orales responsable de la prolifération de *Porphyromonas gingivalis* dans le biofilm parodontal [65]. Pour notre part, nous avons étudié l'implication de la nutrition riche en graisse dans le développement de la maladie parodontale (Article 1).

### a.3) Âge

Il existe une corrélation forte entre le vieillissement et la prévalence des maladies parodontales comme on peut le voir sur le schéma ci-dessous. De plus, on constate une augmentation de la sévérité avec l'âge [58].

Dès les premières études épidémiologiques, l'âge est apparu comme un facteur de risque important de la maladie parodontale [60] [66]. Il existe de nombreuses explications biologiques (perturbation du système immunitaire et potentiel de cicatrisation compromis chez le sujet âgé). On constate également une acidification de la cavité buccale au cours de la vie consécutive à une diminution du pouvoir tampon de la salive et à sa raréfaction. Cette perturbation de l'écosystème oral est à l'origine d'une augmentation de la présence de nombreuses bactéries paropathogènes comme *Porphyromonas gingivalis* ou *Prevotella intermedia* [55].



**Figure 9 : Prévalence globale de la maladie parodontale en fonction des tranches d'âge de la population mondiale [58].**

#### a.4) Stress

On a constaté une augmentation de la prévalence des maladies parodontales chez les sujets anxieux [67]. Cette relation est d'autant plus forte avec une forme particulière de parodontite : la parodontite ulcéro-nécrotique [68].

Le stress est responsable d'une altération du système immunitaire, première barrière vis-à-vis du biofilm parodontal agressif [69]. D'autre part, le stress entraîne une décharge de catécholamines induisant une vasoconstriction. Cette vasoconstriction est à l'origine d'une perturbation de la physiologie du tissu parodontal [67].

#### a.5) Maladies Générales

De nombreuses maladies systémiques sont associées à la maladie parodontale. Elles sont à l'origine de perturbations du fonctionnement du système immunitaire ou de l'homéostasie tissulaire.

Les maladies suivantes peuvent être considérées comme des facteurs de risque des maladies parodontales:

- Les maladies endocriniennes : hyperthyroïdie, hyperparathyroïdie, hypoparathyroïdie [70]
- Le diabète [71]
- Les leucémies et maladies de la lignée hématopoïétique [72]
- Le syndrome d'immunodéficience acquise, surtout pour la parodontite ulcéro-nécrotique [73]

Afin de définir les relations maladies générales – maladies parodontales d'un point de vue biologique, certains auteurs proposent le concept de relations bi-directionnelles. En effet, la maladie parodontale à travers son facteur bactérien et ses paramètres inflammatoires peuvent affecter les pathologies générales, mais l'inverse est vrai également. Nous développerons dans la troisième partie la relation maladie parodontale - diabète.

#### b) Facteurs de risques locaux :

##### b.1) Hygiène Bucco-Dentaire

L'absence ou le déficit d'hygiène bucco-dentaire est un élément déterminant dans la survenue des pathologies parodontales [54]. En effet, l'hygiène assure un contrôle de plaque optimal et évite la prolifération bactérienne au contact des surfaces dentaires. Dawes a défini la plaque dentaire comme un dépôt de matériaux mous sur les surfaces dentaires ne pouvant être éliminé par un spray air-eau [74]. Ce dépôt est un biotope idéal pour les bactéries impliquées dans la maladie parodontale. Comme nous le décrirons ultérieurement, il présente des conditions spécifiques pour la vie des bactéries, dont certaines espèces sont pathogènes pour les tissus de soutien de la dent. La formation de plaque est un élément dynamique en perpétuel

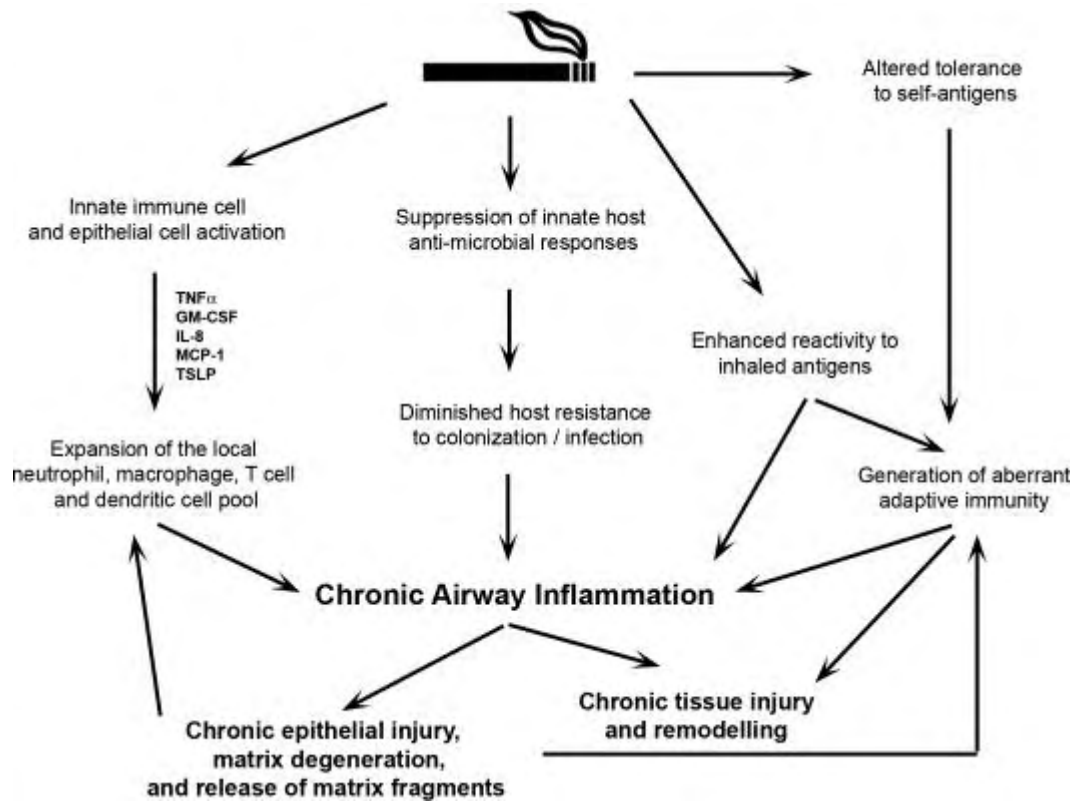
remaniement. L'accumulation excessive de plaque dentaire est à l'origine d'une réaction inflammatoire [54].

## b.2) Tabac

Le tabac est un facteur de risque majeur de la maladie parodontale. Même avec un bon contrôle de plaque, le tabac est capable à lui seul d'induire une pathologie des tissus de soutien de la dent. De plus, les fumeurs présentent des lésions plus sévères que les non-fumeurs [75].

La figure 10 montre que le tabac est à l'origine d'une augmentation de chaleur dans la cavité buccale. Cette perturbation altère les tissus de soutien de la dent. Le tabac présente des effets directs sur le tissu parodontal via la nicotine qui augmente le taux d'adrénaline dans le sang provoquant une vasoconstriction responsable de la réduction des apports nutritionnels. Ces changements métaboliques pourraient expliquer la perturbation de la réponse tissulaire fréquemment observée chez les fumeurs. De plus, le tabac présente des effets spécifiques sur le système immunitaire. On constate une diminution du nombre de polynucléaires neutrophiles ainsi que de leurs capacités de chimiotactisme et de phagocytose [25].

De plus, les fumeurs présentent des variations qualitatives et quantitatives de la flore sous-gingivale pigmentée en noir (*Porphyromonas gingivalis* et *Prevotella intermedia*) [76].



**Figure 10 : Le tabac semble constituer un facteur de risque aux maladies parodontales**

### b.3) Salive

La salive est un élément indispensable au maintien de l'homéostasie buccale. En effet, elle présente plusieurs actions essentielles :

- Action mécanique nettoyante (effet de chasse salivaire par la déglutition, effet de dilution, saturation en humidité,...),
- Action chimique par son effet tampon de salive assurant le maintien d'un pH physiologique malgré les nombreuses variations liées à la prise alimentaire,
- Action anti-microbienne à travers ses différents composants non spécifiques immunitaires (lysozyme, système peroxydase, lactoferrine, protéines riches en histidine...) [77]

De ce fait, le rôle protecteur de la salive comme rempart premier vis-à-vis des agents infectieux est donc patent. En pathologie, toute altération de la quantité ou de la qualité de la salive est susceptible de favoriser l'apparition ou l'aggravation de l'atteinte parodontale.

### b.4) Facteur de risque bactérien : rôle du biofilm

#### I. Mécanisme d'adhésion

L'influence du facteur bactérien dans la maladie parodontale est un élément particulier lié à la plaque dentaire. La plaque dentaire est le résultat de l'accumulation hétérogène de bactéries aérobies et anaérobies au sein d'une matrice intercellulaire mucoprotéique constituant un dépôt adhérent à la surface des dents et des matériaux dentaires appelé biofilm [58].

Le biofilm parodontal possède deux localisations principales supra ou sous-gingivale. En effet, les bactéries présentes sous forme planctonique circulent dans le milieu buccal. Lors de leur maturation, les bactéries vont s'attacher à la surface dentaire pour constituer le stade premier de formation du biofilm : la Pellicule Exogène Acquisée (PEA). Il s'agit de protéines salivaires se liant aux surfaces dentaires et entre elles.

Les bactéries planctoniques contenues dans la salive vont alors adhérer de façon réversible grâce aux forces électrostatiques et aux forces de Van Der Waals à la PEA. Ensuite, on constate une adhésion irréversible des bactéries pionnières comme *Streptococcus gordonii*, *oralis* ou *mitis*, sur la PEA. Cette étape est essentielle car ces bactéries vont réaliser les ponts initiaux d'adhésion pour les bactéries plus spécifiques de la maladie parodontale [78].

Au cours de la croissance, on observe une spécialisation du biofilm composé alors d'une matrice de polysaccharides et d'électrolytes. Il existe une minéralisation de cette matrice par des dépôts de carbonate d'apatite, de carbonate de calcium, d'hydroxyapatite et de phosphate de calcium amorphe. La colonisation bactérienne pathogène spécifique survient dans un deuxième temps par la création de microenvironnements avec des conditions spécifiques de vie (anaérobiose, flux hydrique faible, protection contre les agents anti-infectieux...) [79].

## II. Colonisation spécifique :

La majorité des bactéries présentent à leur surface des pili ou fimbriae, appendices de 0,2 à 20  $\mu\text{m}$ , qui vont permettre leur adhérence aux différentes surfaces buccales et la co-agrégation avec d'autres bactéries [78]. D'autre part, l'adhésion entre les bactéries est assurée par des adhésines interagissant avec des récepteurs spécifiques de la membrane [80]. C'est par ce phénomène qu'on explique la hiérarchisation et l'hyper spécialisation du biofilm parodontal pathogène (fig. 11 [81]). Sa prédominance et la rupture d'équilibre en faveur des bactéries Gram- signent le passage vers un biofilm pathologique.



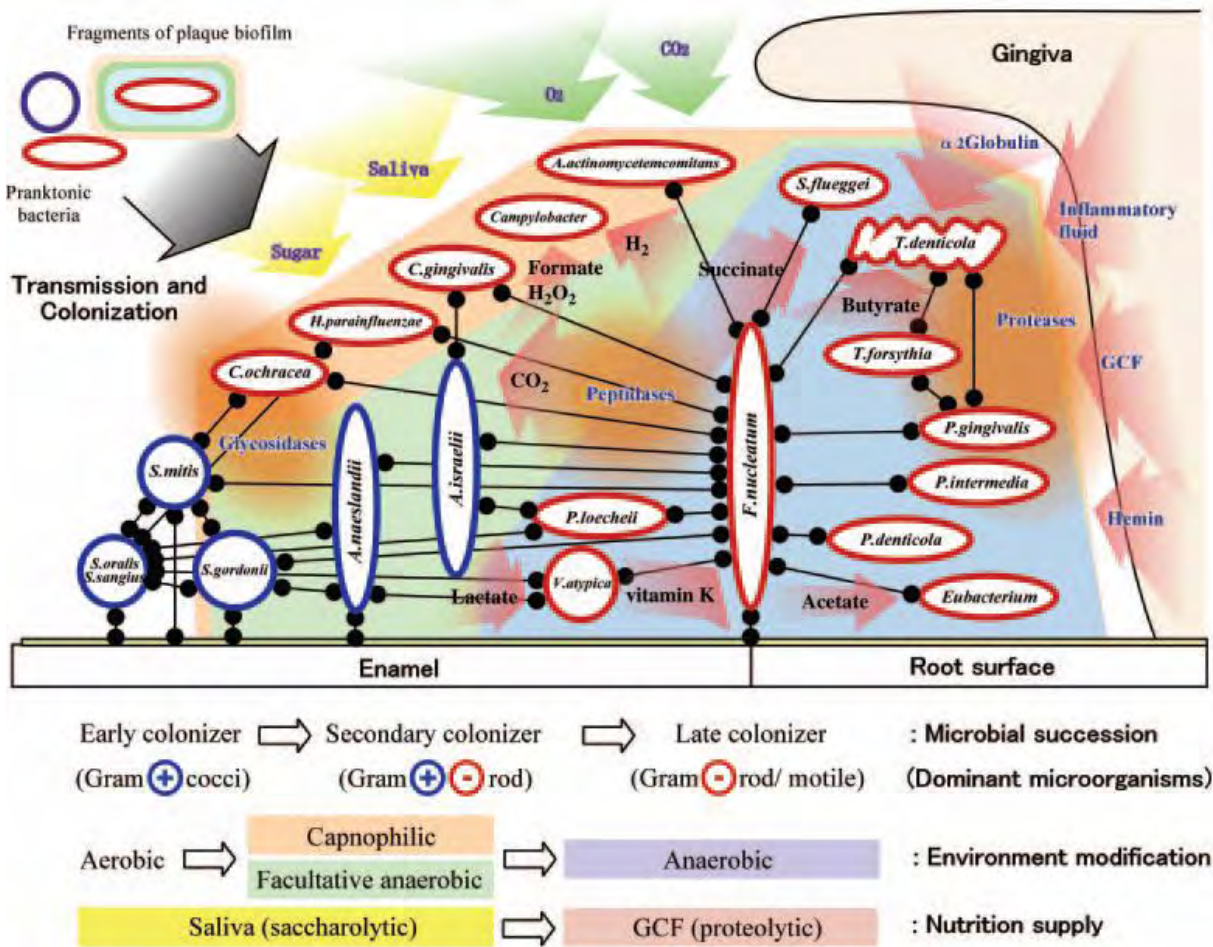


Figure 11 : Organisation hiérarchique et complexité du biofilm parodontal pathologique [81]

## 2.1 Bactéries à Gram –

Les bactéries à Gram- sont principalement dans les parties profondes du biofilm au contact du sillon gingival pouvant être à l'origine des stades cliniques initiaux. La majorité des Gram- présente des caractéristiques anaérobies strictes. La famille des Bacteroidaceae est la plus fréquemment retrouvée dans les pathologies parodontales. Cette famille comprend les genres *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* et *Prevotella* [82].

### LES BACILLES À GRAM-

- *Bacteroides* sp. Le principal représentant dans la pathologie parodontale est: *B. forsythus* reclassé en *Tannerella forsythia* [83]. Il a été démontré qu'il était particulièrement présent dans des lésions parodontales en phase de destruction active.
- *Porphyromonas* sp. La principale espèce du genre *Porphyromonas* identifiée dans les pathologies parodontales est : *P. gingivalis*. Cette espèce montre un intérêt particulier dans l'implication des parodontites sur les maladies générales. Elle est anaérobie stricte et est le sujet de beaucoup de recherches sur l'implication de la maladie parodontale sur les pathologies systémiques [84]. *P. gingivalis* présente une activité protéolytique très importante permettant sa translocation dans les tissus environnementaux [85].
- *Prevotella* sp. dont l'espèce d'intérêt dans la maladie parodontale est *P. intermedia*. Elle est anaérobie stricte et pigmentée. *P.intermedia* est un colonisateur terminal du biofilm et présente une activité agressive sur l'épithélium parodontal. *P. intermedia* est considéré comme un pathogène important dans les parodontites et les infections buccales [86]
- *Fusobacterium* sp. *F. nucleatum* est une espèce très impliquée dans la construction des biofilms. Elle est anaérobie stricte et présente une forme allongée avec une taille plus importante que les autres paro-pathogènes. Elle est non mobile. Son incidence augmente dans les parodontites de l'adulte ou les gingivites. *F. nucleatum* est un colonisateur pionnier du biofilm. Elle participe à la co-agrégation entre les différentes bactéries et assure la colonisation terminale des espèces comme *P.intermedia* et *P.gingivalis*. En effet, *P.gingivalis* résiste plus longtemps à des conditions aérobies lorsqu'il est associé à *F.nucleatum* [87].
- *Actinobacillus* sp. La seule espèce du genre *Actinobacillus* présente dans la cavité buccale humaine est *A. actinomycetemcomitans*. C'est une bactérie capnophile pouvant supporter des gradients différentiels d'oxygène [82]. Elle est décrite comme la bactérie impliquée dans la parodontite agressive juvénile précoce localisée [88].

Il existe une réelle coopération entre ces différentes bactéries à la fois organisationnelle (fig. 10) mais aussi de production d'exotoxines dans le biofilm. En effet, *P.gingivalis* possède des vésicules libérant des toxines permettant d'externaliser les fimbriae des autres bactéries du

biofilm. Ces fimbriae assurent une co-agrégation des bactéries entre elles permettant une adhésion au collagène et une translocation bactérienne [54]

Cette organisation en biofilm confère des super-résistances vis à vis des antimicrobiens par rapport aux mêmes bactéries sous forme planctonique (non incluses dans le biofilm). D'autre part, cette organisation spatiale particulière est responsable d'un défaut de diffusion des antibiotiques à l'intérieur des biofilms qui les rend inefficaces [78].

## 2.2 Bactéries à Gram+

Les bactéries à Gram+ ne sont pas des agents pathogènes majeurs de la maladie parodontale mais permettent l'adhésion initiale des bactéries aux surfaces dentaires, étape initiale essentielle assurant la colonisation terminale par les bactéries paro-pathogènes. Un parodonte sain présente une flore dominée par des bactéries Gram+ (85%) [78].

# II. Physiopathologie de la maladie parodontale

## 2.1 Etio-pathogénicité

Les bactéries de la plaque supra- et sous-gingivale sont des éléments essentiels pour l'apparition et le développement des gingivites et des parodontites. L'interruption des mesures d'hygiène bucco-dentaires entraîne une accumulation de la plaque dentaire au contact du tissu parodontal. La charge bactérienne parodontale est donc augmentée. Comme nous l'avons expliqué, le changement de proportion de bactéries Gram- dans le microbiote parodontal est une condition nécessaire mais pas suffisante à la survenue d'une parodontopathie. En effet, la susceptibilité interindividuelle à la présence de ces bactéries est variable [79]. Ces bactéries paropathogènes à Gram- vont produire des exo-toxines comme des enzymes de dégradation (collagénase, hyaluronidase, peroxidase...) entraînant des atteintes des tissus environnementaux. De plus, les bactéries activent les défenses innées via les PAMPs («Pathogen- associated molecular patterns) reconnus par les PRRs « pattern recognition receptors » des cellules de l'immunité innée [89]. Les PAMPs sont représentées par différentes molécules de surface conservées comme les LPS (spécifiques des GRAM-) ou l'acide lipotéichoïque (spécifiques des Gram +) ou les peptidoglycanes et flagellines (communs aux deux groupes). Les PRRs présents à la surface des cellules de l'immunité innée comprennent un groupe particulier de récepteurs : les Toll-like récepteurs (TLR) [90]. Il en existe 9 et on retiendra les plus impliqués dans la réponse immunitaire parodontale : le TLR-2 (ligand du peptidoglycane), le TLR-4 (ligand du LPS avec co-récepteur extra-cellulaire CD14) et le TLR-5 (ligand de la flagelline). L'interaction entre les TLRs et les PAMPs entraîne l'activation de MyD88 et du facteur nucléaire kappa B (NFkB). NFkb est responsable de la transcription de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires comme TNF- $\alpha$  ou IL1- $\beta$  [33]. La réaction inflammatoire développée face aux bactéries paropathogènes est donc au centre de la régulation de la physiopathologie parodontale.

## 2.2 Inflammation locale et désordres systémiques

L'activation des TLR est responsable des phénomènes de dégranulation des PNNs et macrophages résidents. Ces granules contiennent à la fois des molécules aspécifiques antibactériennes (lysozyme, lactoferrine...) mais aussi des enzymes de dégradation (peroxydase, collagénase, hyaluronidase...). La dégranulation induit la présence des enzymes protéolytiques non spécifiques au contact du tissu parodontal. On assiste donc à une dégradation de l'ensemble du tissu parodontal due à la fois à la production bactérienne et à la fois au système immunitaire aspécifique. En effet, il existe un auto-entretien de la maladie parodontale par le système immunitaire.

Ainsi, la rencontre entre bactéries paro-pathogènes et cellules immunitaires est à l'origine d'une réaction inflammatoire [91]. Cette inflammation modifie l'homéostasie parodontale avec une augmentation de la perméabilité de l'épithélium parodontal et de l'endothélium. Ce phénomène permet le chimiotaxisme et le recrutement des cellules immunitaires circulantes suivant le gradient de concentration de cytokines et chimiokines dans le milieu. On assiste donc à une amplification de la réaction néfaste pour le tissu parodontal entraînant l'apparition des premières lésions cliniquement observables. Certains auteurs ont proposé que l'orientation de la réaction inflammatoire vers certains profils immunitaires puisse prévenir ou ralentir la survenue de lésions. En effet, un infiltrat inflammatoire composé majoritairement par des lymphocytes T et macrophages permettrait un meilleur contrôle de la maladie [92]. Inversement, un infiltrat avec une majorité de lymphocytes B serait fortement destructeur pour le tissu parodontal [93].

L'altération progressive du tissu parodontal est caractérisée par une augmentation de la perméabilité tissulaire et de l'infiltrat immunitaire, et peut évoluer à bas bruit, avec des alternances de stades sub-aigus. Il s'agit donc de l'installation d'un état inflammatoire chronique, qui de local, peut intéresser l'ensemble du système immunitaire et devenir propice à un déséquilibre systémique. En effet, comme l'a proposé Saito [71], la maladie parodontale est une source de molécules inflammatoires et antigéniques comme les LPS (figure 12), qui vont transloquer dans la circulation sanguine générant une inflammation systémique susceptible d'initier ou interagir avec certaines pathologies générales [94]. De ce fait, de nombreuses études proposent que la maladie parodontale contribue à la dérégulation des maladies systémiques.

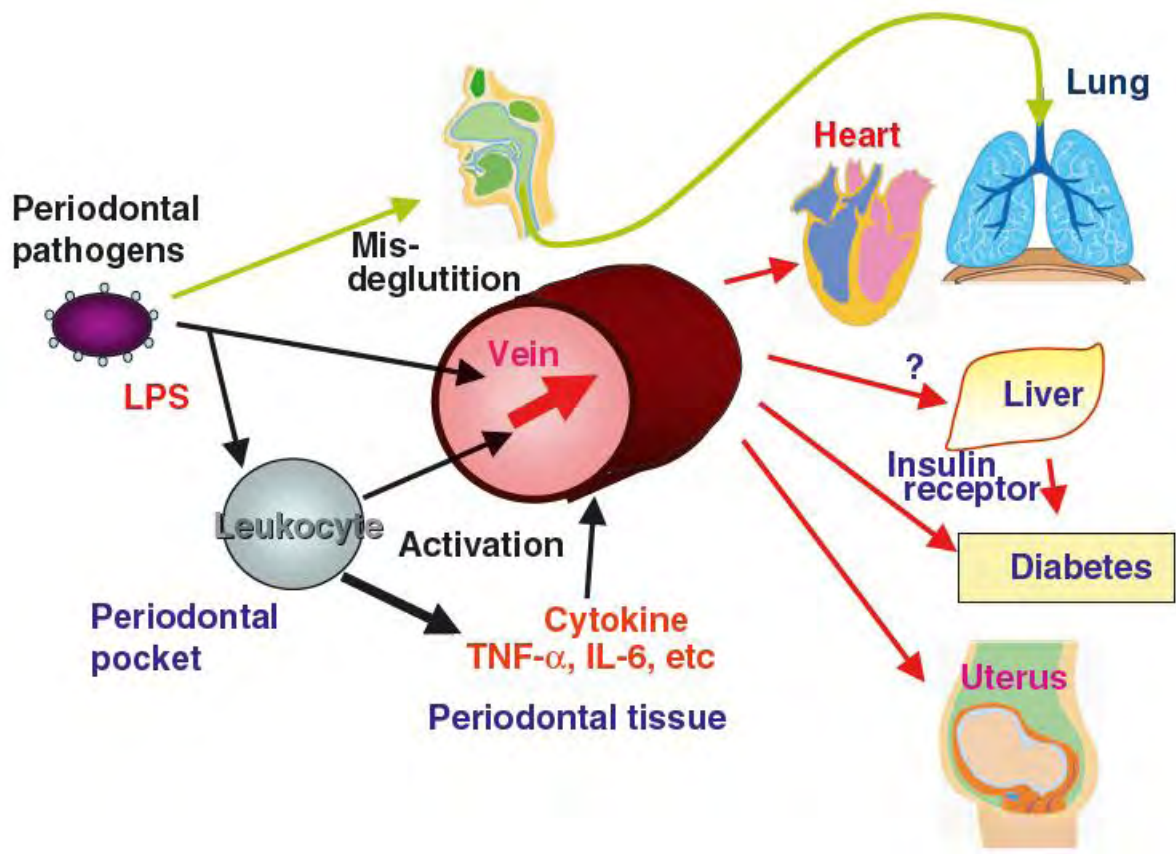


Figure 12 : Mécanismes moléculaires impliquant la maladie parodontale dans les pathologies générales [71]

### III. Formes anatomo-cliniques de la Maladie Parodontale

En 1999, l'American Academy of Periodontology a présenté une classification des pathologies parodontales fondée sur l'interaction entre infection bactérienne et réponse immunitaire [95].

#### 3.1) Gingivite

Il s'agit de la forme la plus répandue et peut toucher jusqu'à 95% de la population adulte. Elle présente essentiellement une étiologie bactérienne mais peut trouver aussi son origine dans les troubles hormonaux (grossesse, puberté...) ou dans la prise de médicaments (traitement antiépileptique, ciclosporine...). Elle est décrite comme une inflammation du parodonte superficiel (la gencive) avec une couleur rouge, œdémateuse et avec saignement spontané ou provoqué. La suppression de l'étiologie associée à un contrôle de plaque correct assure le retour à la physiologie.

#### 3.2) Parodontite chronique

Le terme de parodontite de l'adulte est utilisé pour décrire la forme chronique la plus commune des parodontites [20]. Les premières études épidémiologiques (Hugoson 1998) montrent une prévalence de 80% dans la population âgée de plus de 30 ans. On décrit 2 formes principales : la localisée touchant moins de 30% des sites potentiels ou la généralisée avec atteinte supérieure à 30% des sites.

L'étiologie reconnue et retrouvée est une rupture d'équilibre du biofilm parodontal avec une augmentation du ratio de bactéries anaérobies strictes Gram- (90% d'anaérobies et 75% de Gram-) comme *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia...*) [78].

#### 3.3) Parodontite agressive

Ce terme représente une forme très spécifique de pathologie parodontale. Elle possède une faible prévalence mais c'est une forme très destructive imposant une prise en charge rapide. On constate des lésions inhabituelles et destructives en inadéquation avec l'indice de plaque de la maladie parodontale [22]. Comme la parodontite chronique, elle peut être localisée ou généralisée. La flore bactérienne des parodontites agressives est dominée par *Porphyromonas gingivalis* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Elle touche préférentiellement des sujets en bonne santé, avec un bon contrôle de plaque et vers 30 ans [81].

#### 3.4) Parodontite ulcéro-nécrotique

Un consensus international propose que la « gingivite ulcéro-nécrotique » (GUN) et la « parodontite ulcéro-nécrotique » (PUN) soient regroupées sous le terme « maladies parodontales ulcéro-nécrotiques ».

Cette maladie est une forme très spécifique avec des atteintes cliniques caractéristiques : ulcération et nécrose des papilles inter-dentaires, gingivorragies avec une forte douleur et une réponse ganglionnaire loco-régionale, une asthénie et une halitose acide. Elle est généralement associée à une atteinte systémique comme le SIDA, la Corticothérapie à long terme, un traitement immuno-supresseur, un état anxieux majeur ... Chung a montré une prédominance de *P.intermedia* et *T.denticola* de la famille des Spirochetes [68].

#### IV. Conclusion

Les maladies parodontales sont des pathologies très répandues dans la population générale. Leurs étiologies bactériennes sont à l'origine d'une réaction inflammatoire entraînant un désordre local. Les maladies parodontales à travers leurs facteurs bactériens et leur désordre immunitaire sont également à la source de perturbations de maladies systémiques comme les maladies cardiaques, les insuffisances rénales, les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Crohn) et les maladies métaboliques comme le diabète.

# Résultats Expérimentaux

## Avant-propos

L'objet de nos travaux fut d'étudier la relation bi-directionnelle entre maladie parodontale et diabète. Cette partie expérimentale a eu pour but de proposer des protocoles de recherche fondamentale susceptibles de valider dans des modèles murins les hypothèses épidémiologiques concernant les liens entre parodontites et diabète.

Nous rapportons dans une première partie les résultats d'un protocole de recherche fondamentale destiné à montrer, comme le suggère nombres d'études épidémiologiques, que la parodontite peut participer à la physiopathologie de l'état diabétique.

La deuxième partie fait état d'un travail plus complexe, centré sur les mécanismes biologiques et physiopathologiques susceptibles d'expliquer, comme certains auteurs le rapportent dans des études chez l'homme, qu'une parodontite peut constituer un état prédisposant au diabète. Ainsi, nous avons travaillé sur des hypothèses novatrices qui nous ont conduit à la mise en place d'un nouveau modèle parodontal murin. Ce travail est à l'heure actuelle en voie de finalisation et nous ouvre de nombreuses perspectives.

A travers les différentes techniques expérimentales que nous avons mises en œuvre, les relations entre pathologies parodontales et désordres métaboliques ont pu être matérialisées par la mise en évidence de mécanismes physiopathologiques spécifiques.



## Résultats Expérimentaux 1 :

Le régime gras induit une parodontite chez la souris via le récepteur aux LPS : Action protectrice par les Œstrogènes

**High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens.**

Vincent Blasco-Baque, Matteo Serino, Jean-Noël Vergnes, Elodie Riant, Pascale Loubieres, Jean-François Arnal, Pierre Gourdy, Michel Sixou, Rémy Burcelin & Philippe Kemoun

PLoS One. 2012;7(11):e48220. doi: 10.1371/journal.pone.0048220. Epub 2012 Nov 2

## I. Action du Diabète sur le développement de la maladie Parodontale

La prévalence du diabète de type 2 (DT2) augmente considérablement et présente un enjeu majeur pour les pays développés [91]. Le diabète de type 2 est caractérisé par une inflammation chronique de bas grade avec une altération du système immunitaire inné. On constate une libération accrue de cytokines inflammatoires par les cellules immunitaires innées comme les macrophages et les cellules dendritiques [20]. Ces effecteurs inflammatoires sont délétères pour l'action de l'insuline [33]. De plus, l'hyperglycémie altère les fonctions effectrices du système immunitaire inné. On constate un défaut du chimiotactisme et de la diapédèse des PNNs. Une fois sur le site, les PNNs exercent également une phagocytose incomplète propice au maintien des infections chez les sujets diabétiques. D'autre part, on constate un "switch" de polarisation des macrophages d'un profil anti-inflammatoire M2 vers un profil pro-inflammatoire M1 dans les désordres métaboliques [39]. Ces profils présentent un intérêt particulier dans les réponses tissulaires aux antigènes bactériens. Le profil M2 apparaît après une exposition aux cytokines IL-4 and IL-13 [96] et présente une production accrue de cytokines anti-inflammatoires comme l' IL-10 et l'IL-1. De plus, les macrophages polarisés M2 augmentent la production d'arginase responsable d'une diminution de l'activité iNOs [40]. Le profil M2 des macrophages facilite la réparation tissulaire en bloquant une réaction inflammatoire exacerbée [97]. Cependant, les maladies métaboliques orientent vers un profil M1 des macrophages. Cette activation M1 est induite par des antigènes comme le LPS des bactéries Gram- ou l'IFN- $\gamma$  [40]. Ce profil pro-inflammatoire augmente la sécrétion de TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-12 et active iNOs et donc la production de réactifs de l'oxygène. Ainsi, les tissus périphériques des patients diabétiques présentent un infiltrat de macrophages [41] propice à une réaction immune inappropriée vis-à-vis de fragments bactériens comme les LPS [98]. Les résultats de notre laboratoire ont suggéré que le microbiote intestinal soit étroitement lié à l'obésité et à l'insulino-résistance [25]. Ce changement dans l'écologie de la flore intestinale avec une augmentation des bactéries gram-négatives est associé au passage d'un régime normal vers un régime enrichi en matières grasses [48,49]. Ces bactéries présentent des molécules antigéniques PAMPs identifiées par des récepteurs spécifiques de reconnaissance de ces motifs (PRR) comme le CD14/TLR4 spécifique des LPS [90]. Cette reconnaissance est à l'origine de l'activation du système immunitaire. D'autre part, des souris knock-out pour CD14/TLR4 sont protégées contre les effets métaboliques d'un régime riche en graisses et d'un changement de microbiote intestinal [25]. Par conséquent, l'interaction entre les pathogènes gram-négatifs et le système immunitaire est un facteur clé pour le développement des maladies métaboliques [25,52].

Parallèlement, la maladie parodontale est définie comme une infection chronique à manifestation inflammatoire causée par une augmentation de bactéries Gram- anaérobies [82]. La majorité des pathogènes de la parodontite sont impliqués dans les maladies métaboliques [71] et dans des pathologies systémiques [99,100]. *Prevotella intermedia* (Pi) est un colonisateur terminal du biofilm parodontal et un agent pathogène puissant. Il induit une réponse immunitaire innée impliquée dans la destruction des tissus parodontaux profonds [86]. Sa détection est plus fréquente dans les poches parodontales de patients diabétiques que dans celles de patients sains [101]. Un autre paropathogène important, *Fusobacterium nucleatum*

(Fn), fut isolé de biopsies de plaque d'athérome carotidienne humaine et pourrait présenter un effet athéromatogène [102]. En effet, des souris KO pour l'Apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) infectées par Fn présentent un dépôt de lipide plus important dans leurs artères que les souris contrôles [103]. De plus, l'infection systémique de Fn augmente le taux sanguin de cholestérol et de LDL [104]. La réponse immunitaire est au carrefour de l'interaction entre maladie parodontale et diabète [91]. D'autre part, on retrouve une altération de la réponse immunitaire dans les tissus parodontaux des sujets diabétiques. En effet, les profils M1 présentent une destruction accrue de l'ensemble du tissu parodontal [89]. L'hyperglycémie se retrouve dans le fluide gingival et favorise la colonisation des surfaces dentaires et donc la croissance du biofilm parodontal [105]. Ainsi, de nombreux auteurs ont proposé que la maladie parodontale soit la sixième complication du diabète [91] et on peut supposer aussi l'impact délétère des maladies métaboliques sur le développement de la maladie parodontale [71].

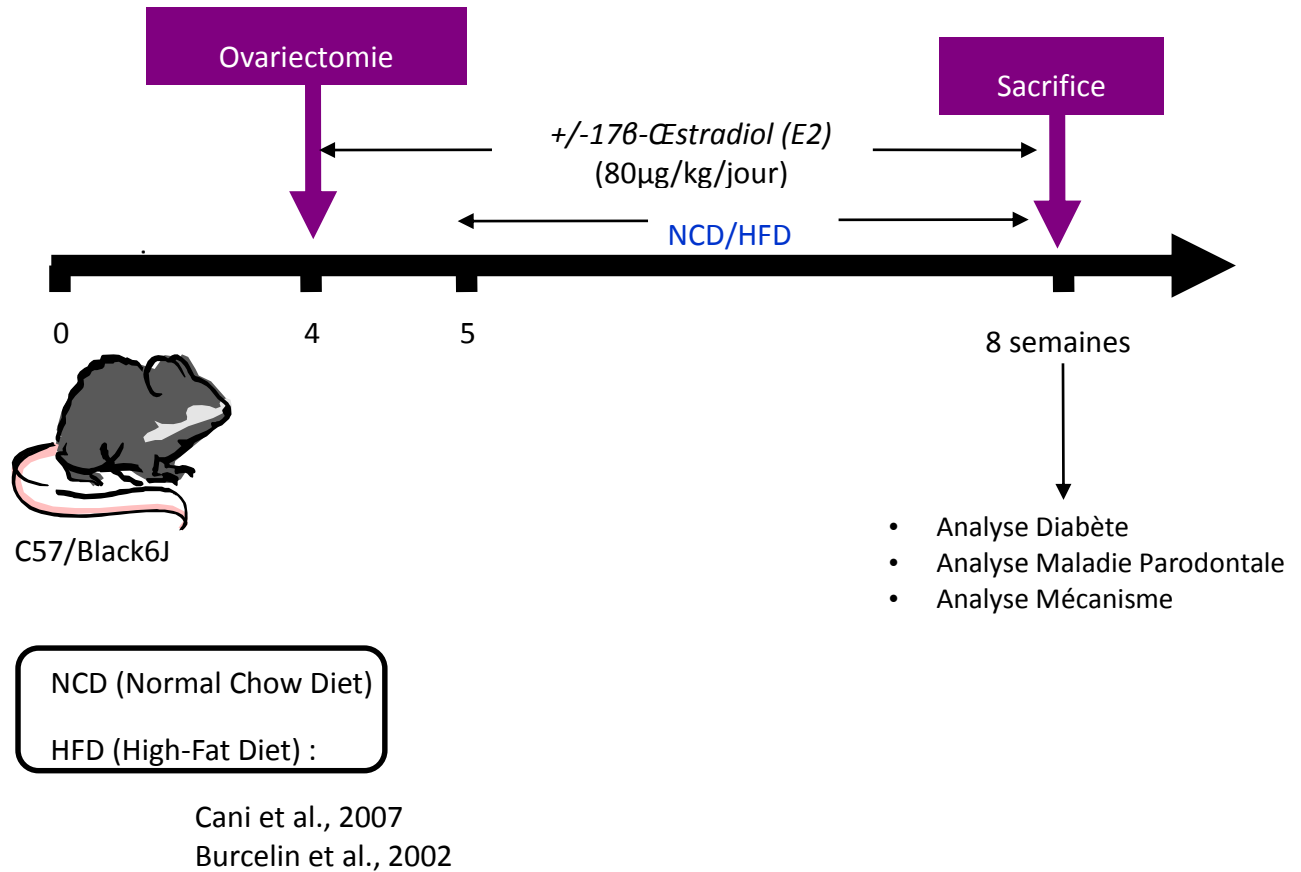
Notre laboratoire a récemment montré que les œstrogènes jouent un rôle pilote dans le contrôle des maladies métaboliques et leur caractère immuno-inflammatoire [106]. Par ailleurs, de nombreuses études épidémiologiques suggèrent fortement que la carence en œstrogènes est associée à l'apparition des maladies parodontales [107]. La ménopause, cause physiologique de carence en œstrogène, peut donc être considérée comme un facteur de risque de la maladie parodontale [108]. En outre, il a été suggéré que la thérapie de substitution hormonale peut protéger les femmes ménopausées contre le développement de la parodontite [109]. Cependant, l'influence de ces hormones sexuelles stéroïdes sur le développement de la maladie parodontale dans un contexte dysmétabolique avec désordres immuno-inflammatoires n'a pas été abordée à ce jour.

Dans cette étude, l'objectif a été d'étudier si un régime alimentaire riche en matières grasses, connu pour induire une inflammation systémique médiée par l'insulino-résistance et l'intolérance du glucose, favoriserait le développement de la maladie parodontale chez les souris ovariectomisées, et si l'administration d'œstrogènes présenterait un effet protecteur.

## II. Modèle expérimental et Méthodes

Pour répondre à notre objectif, nous avons réalisé un protocole (Figure 13) avec souris WT ou CD14KO ovariectomisées à 4 semaines. Ensuite, nous avons mis en place un stress nutritif (HFD 72% [25]) et nous avons réalisé une analyse des paramètres diabétiques et parodontaux .

Protocole expérimental 1 (article PlosOne Novembre 2012) :



**Figure 13 : Protocole expérimental utilisé lors de la première série d'expériences**

### Analyse du Diabète

Après 6 heures de jeûne, nous réalisons un test intra-péritonéal de tolérance (1 g/kg ) au glucose après 4 semaines de régime et un prélèvement sanguin. Nous analysons la concentration plasmatique d'insuline par un kit ELISA (Mercodia, Uppsala, Sweden).

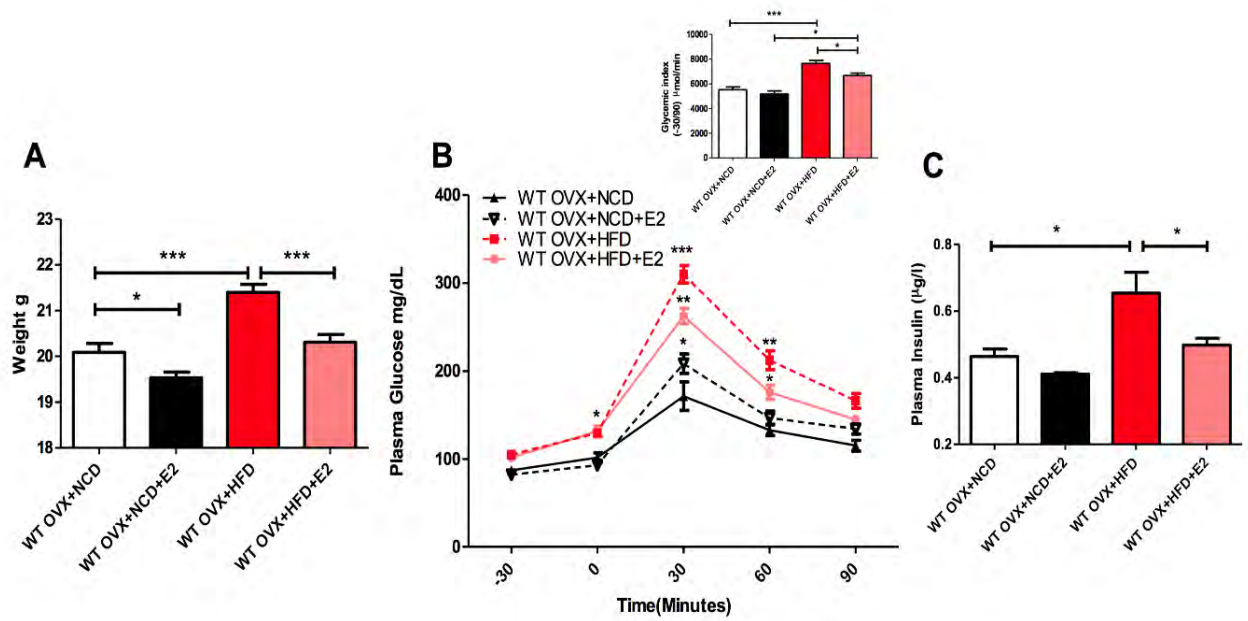
### Analyse de la Maladie Parodontale :

Nous avons analysé la composition du microbiote parodontal par culture bactérienne [82] et analyse biomoléculaire [110]. De plus, nous avons réalisé des coupes histologiques du parodonte superficiel des molaires colorées par Hématoxyline/Eosine. Nous avons également analysé l'état inflammatoire de ces tissus parodontaux par RT-PCR. D'autre part, nous avons réalisé une évaluation de la lyse osseuse alvéolaire mandibulaire par micro-scanner [111].

## III. Résultats

### **L'estradiol (E2) prévient les troubles métaboliques induits chez les souris WT ovariectomisées et nourries avec un régime riche en gras (Figure 13).**

Comme montré dans les études précédentes du laboratoire, les souris nourries avec un HFD pendant quatre semaines présentent un phénotype dysmétabolique caractérisé par une augmentation du poids, des troubles de la glycémie à jeun, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose. Il est à noter que le traitement par les E2 est protecteur vis-à-vis des effets néfastes induits par le HFD sur le poids corporel, l'insuline à jeun et l'homéostasie du glucose plasmatique (**Figure 14 A-C**). Au vu de ces résultats, je confirmais le modèle diabétique de souris régulé par les oestrogènes. Pour répondre à notre objectif, nous avons voulu phénotyper les parodontes de chaque groupe de souris.

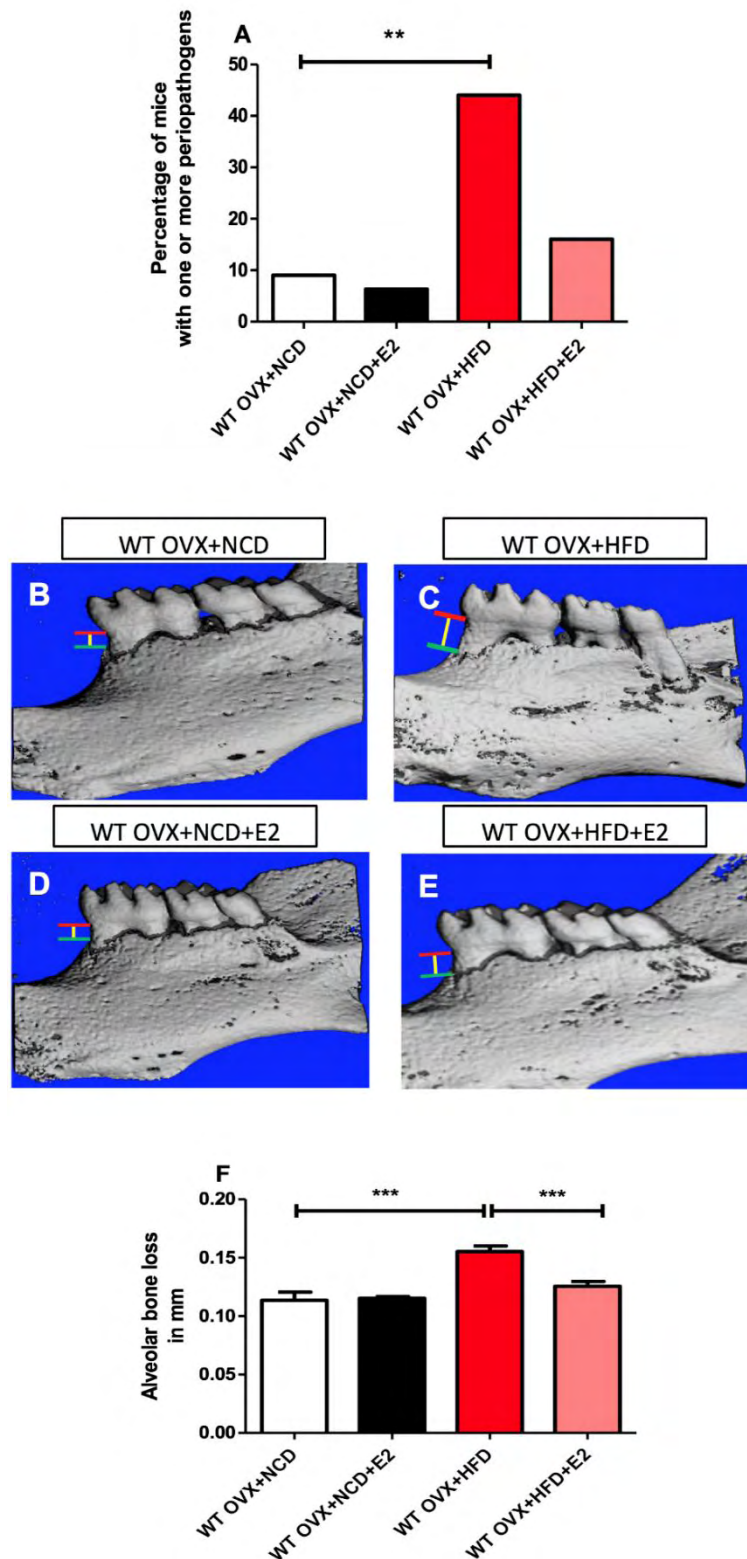


**Figure 14 L'administration d'E2 protège des troubles métaboliques induits par le HFD**

**A)** Les souris sont pesées à 8 semaines dans chaque groupe après 4 semaines de régime: WT OVX + MNT (n = 27), WT OVX + MNT + E2 (n = 16), WT OVX + HFD (n = 15) et WT OVX + HFD + E2 (n = 15). **B)** Évolution de la glycémie (mg / dl) dans le temps au cours d'une IPGTT. L'encart représente l'index glycémique pour chaque groupe. **C)** Concentration insuline plasmatique à jeun (mg / l) après 4 semaines de régime: WT OVX + MNT (n = 6), WT OVX + MNT + E2 (n = 6), WT OVX + HFD (n = 6) et WT OVX + HFD + E2 (n = 6) \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* P <0,001 (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey pour A et C; et Two-Way ANOVA avec post Bonferroni -test pour B). Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM.

### **Le HFD favorise la parodontite en l'absence d'oestrogènes (Figure 14 et Tableau 1)**

Sans supplémentation en œstrogènes, le HFD augmente de façon significative le pourcentage d'animaux présentant au moins un et jusqu'à deux espèces de paropathogènes (comme Pi et Fn), par rapport aux souris témoins sous régime alimentaire normal (NCD) (**Fig. 15A, tableau 1**). Par ailleurs, le HFD favorise la présence de l'association Pi / Fn dans le microbiote parodontal des souris ovariectomisées (**tableau 1**) induit une lyse osseuse parodontale mandibulaire (**Fig. 15C et 15F**). De plus, l'administration de E2 protège les souris des effets délétères du HFD sur le tissu parodontal (**Fig. 15E-15F**) et modifie le microbiote parodontal en réduisant le pourcentage de souris positives pour l'association Pi/Fn (**tableau 1**). Ces résultats mettent en évidence l'apparition d'une flore pathogène et d'une lyse osseuse parodontale. Pour compléter l'analyse des morphotypes parodontaux, j'ai réalisé l'analyse des cytokines dans le tissu gingival par analyse de l'expression génique. Pour mettre en évidence l'infiltrat inflammatoire, j'ai réalisé des coupes histologiques du tissu gingival.



**Figure 15 Le HFD induit la maladie parodontale chez les souris WT: effet protecteur des E2.** **A)** La présence de pathogènes parodontaux a été analysée à 8 semaines après 4 semaines de régime: WT OVX + MNT (n = 27), WT OVX + MNT + E2 (n = 16), WT OVX + HFD (n = 15) et WT OVX + HFD + E2 (n = 15). **B-E)** Les Hémimandibules de chaque groupe reconstruites par le micro-CT. **F)** Lyse osseuse représentée par la distance (ligne jaune) entre



le JAC (ligne rouge: la jonction émail-cément) et le ABC (ligne verte: crête osseuse alvéolaire) (n = 8 pour chaque groupe). \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* P <0,001 (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.

| Bactéries cultures                         | Effet du Régime  |                  |                        | Effet de la supplémentation en E2 |                            |                | Effet de la déplétion du corécepteur CD14 |                      |                |
|--|------------------|------------------|------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------|---|----------------------|----------------|
|  | WT<br>OVX<br>NCD | WT<br>OVX<br>HFD | p <sup>1</sup>         | WT<br>OVX<br>HFD                  | WT<br>OV<br>X<br>HFD<br>E2 | p <sup>1</sup> | WT<br>OVX<br>HFD                          | CD14KO<br>OVX<br>HFD | p <sup>1</sup> |
|  | n=27<br>(%)      | n= 25<br>(%)     |                        | n=25<br>(%)                       | n=25<br>(%)                |                | n=25<br>(%)                               | n=12<br>(%)          |                |
| <b><i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn)</b> | 0<br>(0)         | 1<br>(4.0)       | 0.48                   | 1<br>(4.0)                        | 7<br>(28.0)                | <b>* 0.04</b>  | 1<br>(4.0)                                | 0<br>(0)             | 1.0<br>0       |
| <b><i>Prevotella intermedia</i> (Pi)</b>   | 1<br>(3.7)       | 4<br>(16.0)      | 0.18                   | 4<br>(16.0)                       | 0<br>(0)                   | 0.11           | 4<br>(16.0)                               | 1<br>(8.3)           | 1.0<br>0       |
| <b>Both Fn + Pi</b>                        | 1<br>(3.7)       | 6<br>(24.0)      | <b>* 0.04</b>          | 6<br>(24.0)                       | 0<br>(0)                   | <b>** 0.02</b> | 6<br>(24.0)                               | 3<br>(25.0)          | 1.0<br>0       |
| <b>Fn and/or Pi</b>                        | 2<br>(7.4)       | 11<br>(44.0)     | <b>**<br/>&lt;0.01</b> | 11<br>(44.0)                      | 7<br>(28.0)                | 0.37           | 11<br>(44.0)                              | 4<br>(33.3)          | 0.7<br>2       |

**Tableau 1.**

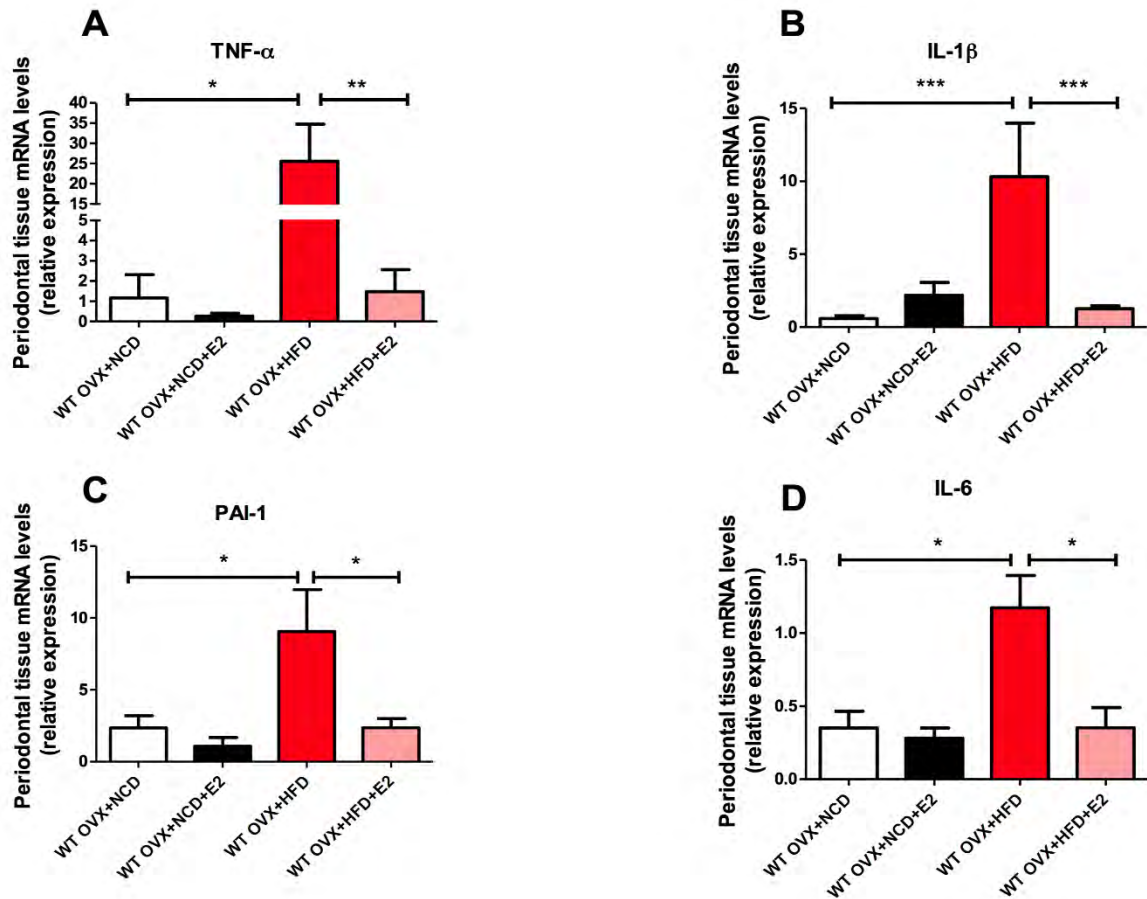
**Cultures bactériennes positives: comparaisons entre chaque groupe chez les souris ovariectomisées**

Le tableau montre l'analyse qualitative du microbiote parodontal dans chaque groupe: WT OVX + MNT (n = 27), WT OVX + HFD (n = 25), WT OVX + HFD + E2 (n = 25) et CD14KO OVX + HFD (n = 12). \* P <0,05, \*\* P <0,01 (tests de Fischer exact).

**Le traitement par œstrogène protège les tissus parodontaux de l'inflammation induite par le régime gras (Fig. 15 et 16).**

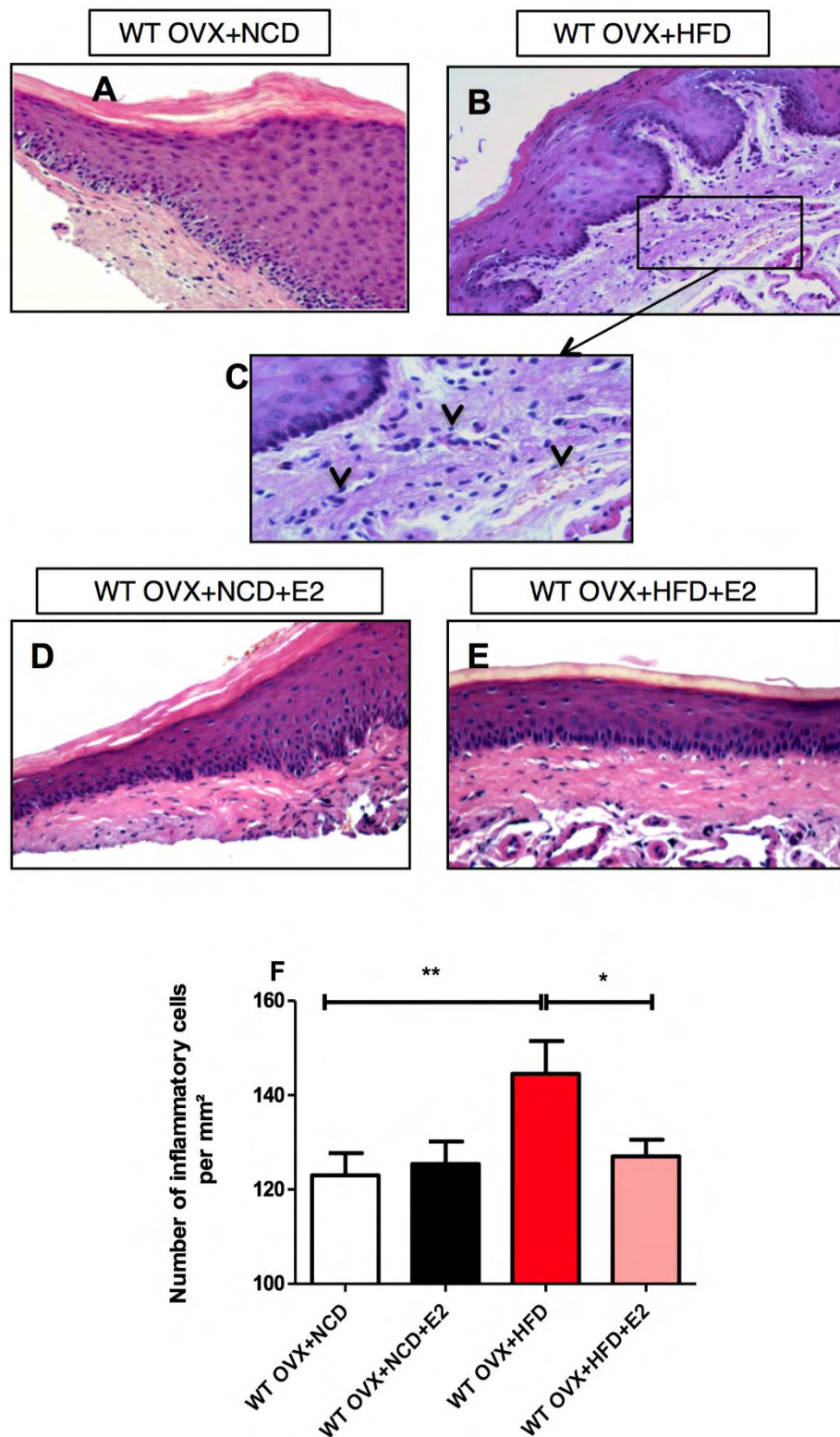
Pour déterminer l'effet de l'E2 sur l'inflammation parodontale induite par le HFD, nous avons dosé les concentrations d'ARNm de plusieurs médiateurs inflammatoires dans la gencive. L'expression de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 et IL-6 est significativement augmentée dans le tissu conjonctif gingival de souris ovariectomies nourries par HFD par rapport à celles nourries par NCD. En revanche cet effet pro-inflammatoire du HFD a été aboli par la supplémentation en E2 (**Fig. 16A-D**).

L'examen microscopique du tissu conjonctif gingival des souris nourries par HFD met en évidence une infiltration de cellules inflammatoires et une extravasation de globules rouges, par rapport aux souris contrôles (**Fig. 17A-F**). Fait intéressant, la supplémentation présente un effet protecteur vis-à-vis de l'inflammation gingivale induite par HFD (**Fig. 17F**).



**Figure 16 E2 diminue l'expression de médiateurs de l'inflammation gingivale des souris Ovariectomisées nourries par HFD.**

Expression de ARNm TNF- $\alpha$  (A), IL1- $\beta$  (B), le PAI-1 (C) et de l'IL-6 (D) dans le tissu gingival. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.



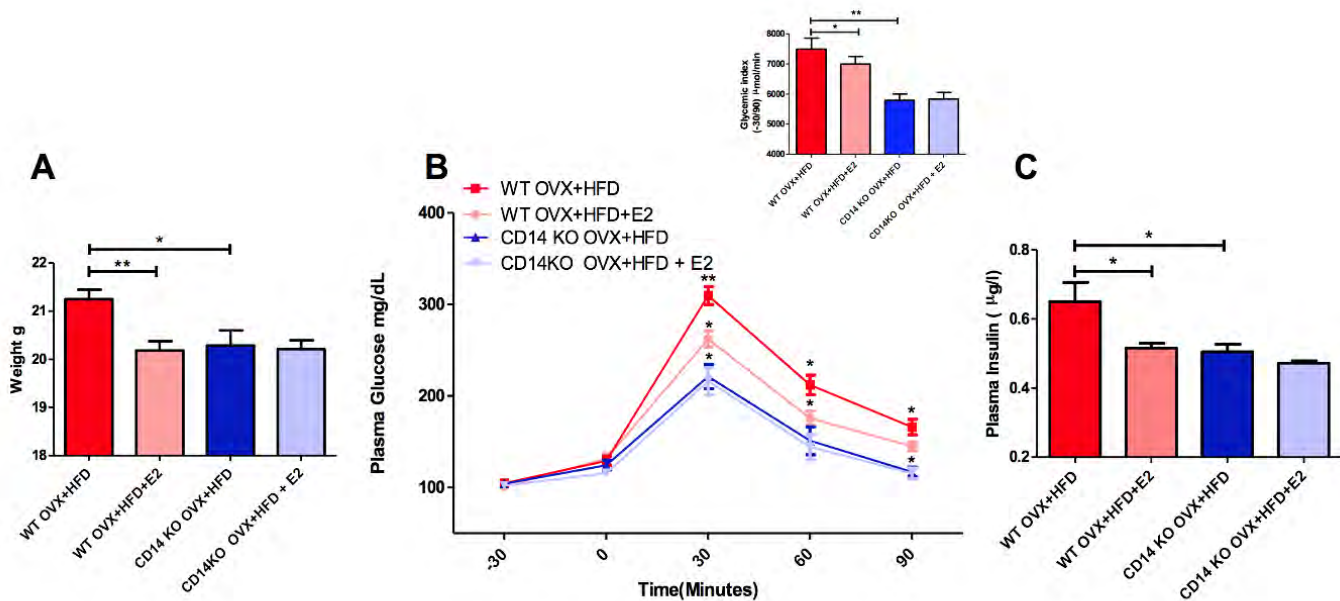
**Figure 17 Le HFD induit un infiltrat inflammatoire cellulaire dans le tissu conjonctif gingival régulé par les E2**  
 Aspect histologique des tissus gingivaux avec H / E coloration de WT OVX + MNT (A, n = 10), WT OVX + HFD (B, n = 10), WT OVX + MNT + E2 (D, n = 10), et WT OVX + HFD + E2 (E, n = 10). Grossissement © du tissu gingival inflammatoire de souris nourries par HFD F.

Nombre de cellules inflammatoires pour chaque groupe. \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* P <0,001 (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.

Nos résultats mettent en évidence l'impact du diabète sur le développement de la maladie parodontale. Les œstrogènes régulent les effets métaboliques et parodontaux induits par le régime gras. Nous avons voulu disséquer le mécanisme moléculaire qui était impliqué. Le récepteur CD14 est un régulateur clef du métabolisme et de la relation entre microbiote et maladie métabolique. Dans ce but, nous avons émis l'hypothèse de l'implication des LPS et des récepteurs CD14 dans la relation entre diabète et maladie parodontale. Nous avons donc réalisé les expériences chez des souris dépourvues de récepteur au LPS.

### **Les souris ne présentant pas de récepteur aux LPS (CD14KO) sont protégées du développement de la parodontite induite par le HFD**

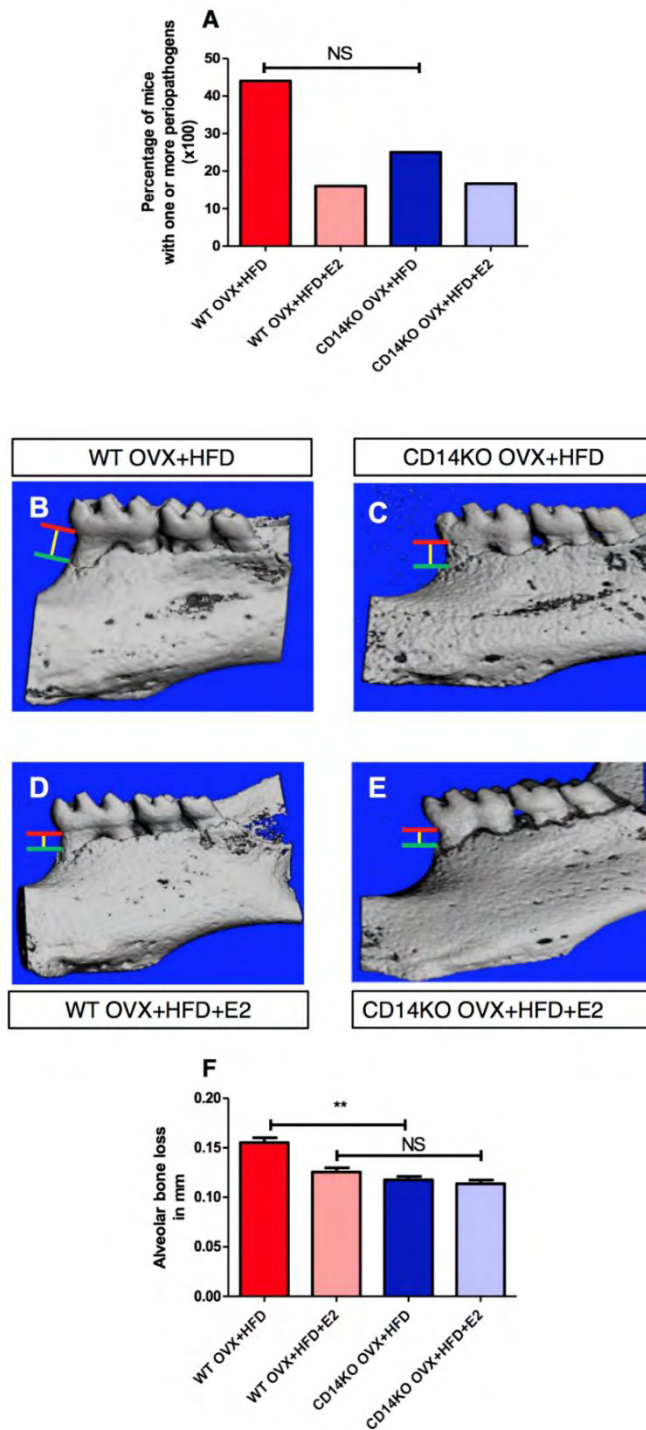
Agissant en synergie avec le TLR 4, le CD14 est un important modulateur de la réponse inflammatoire induite par les bactéries Gram -. Nous avons donc évalué l'impact de la suppression du CD14 sur les troubles métaboliques et parodontaux induits par le HFD. Contrairement aux souris WT, les souris CD14KO ne présentent pas d'augmentation de leur poids corporel, de leur glycémie à jeun et de leur concentration plasmatique d'insuline ou d'intolérance au glucose, lorsqu'elles sont nourries par HFD (**Fig.18 A-C**) ou par NCD (**Suppl.Fig.1A**) pendant quatre semaines. Fait intéressant, la déplétion du co-récepteur CD14 a également empêché la perte osseuse induite par le HFD (**Fig. 18B-F**), bien que l'association Pi / Fn soit toujours présente chez les souris CD14KO nourries par HFD (WT OVX + HFD 25% vs CD14KO OVX + HFD 24% **Tableau 1**). Comme les souris sauvages nourries par NCD, les souris CD14KO nourries par NCD ne présentent pas de modification de la flore bactérienne parodontale (**Suppl. Tableau 1**). Le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 et IL-6 dans le tissu parodontal des souris CD14KO nourries par HFD présentent le même niveau d'expression que dans les souris témoins (**Fig. 20 A-D**). De plus, l'infiltration de cellules immunitaires dans le tissu gingival des souris CD14KO nourries par HFD a été considérablement réduite comparé aux souris WT alimentées par HFD (**Fig. 21 A-E**).



**Figure 18 Les souris CD14KO nourries par HFD ne présentent pas de troubles métaboliques par rapport aux souris WT**

**A)** Les souris sont pesées à 8 semaines dans chaque groupe après 4 semaines de régime: WT OVX + HFD (n = 10), WT OVX + HFD + E2 (n = 10), CD14KO OVX + HFD (n = 12) et CD14KO OVX + HFD + E2 (n = 12). **B)** Évolution de la glycémie (mg / dl) dans le temps au cours d'une IPGTT. L'encart représente l'index glycémique pour chaque groupe. **C)** Concentration insuline plasmatique à jeun (mg / l) après 4 semaines de régime: WT OVX + HFD (n = 6), WT OVX + HFD + E2 (n = 6), CD14KO OVX + HFD (n = 6) et CD14KO OVX + HFD + E2 (n = 6) \* P <0,05, \*\* P <0,01 (test one-way ANOVA à un facteur suivie par Tukey post-test pour A et C, et Two-Way ANOVA avec correction de Bonferroni post-test pour B). . Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM.

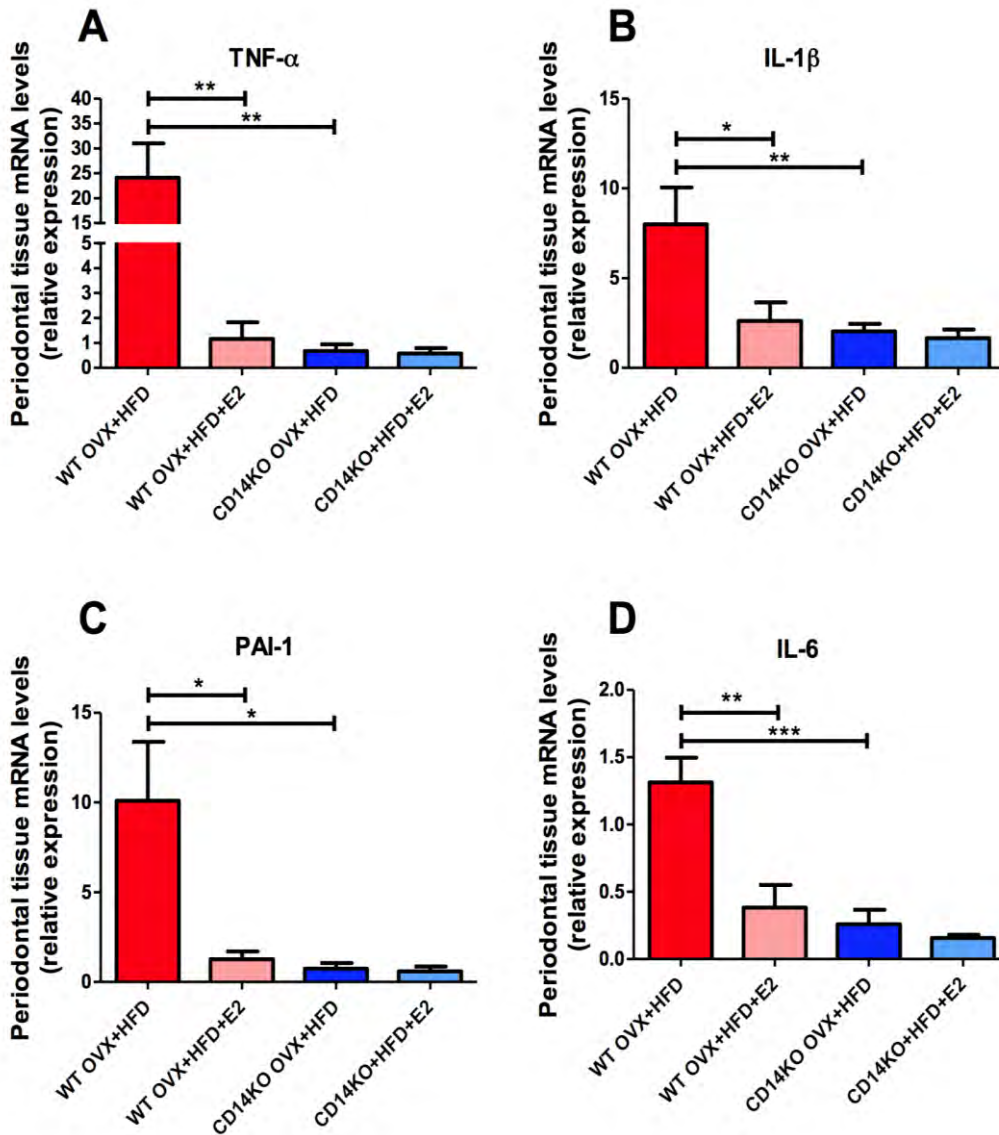




**Figure 19** Les souris CD14KO nourries par HFD sont protégées du développement de la maladie parodontale par rapport aux souris WT

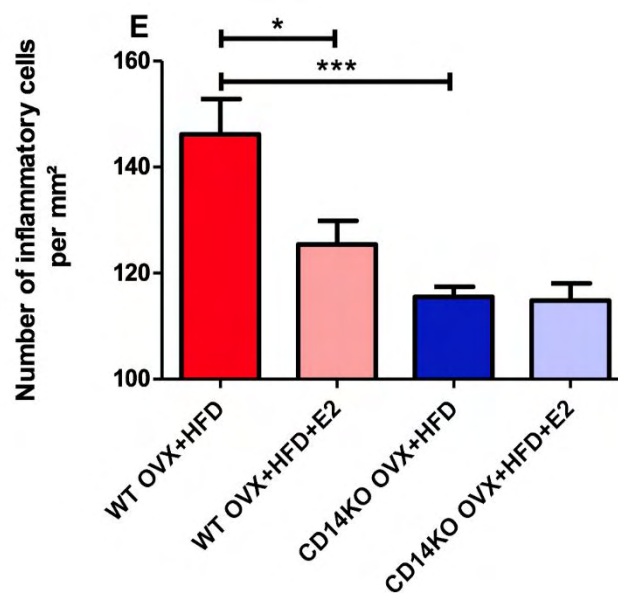
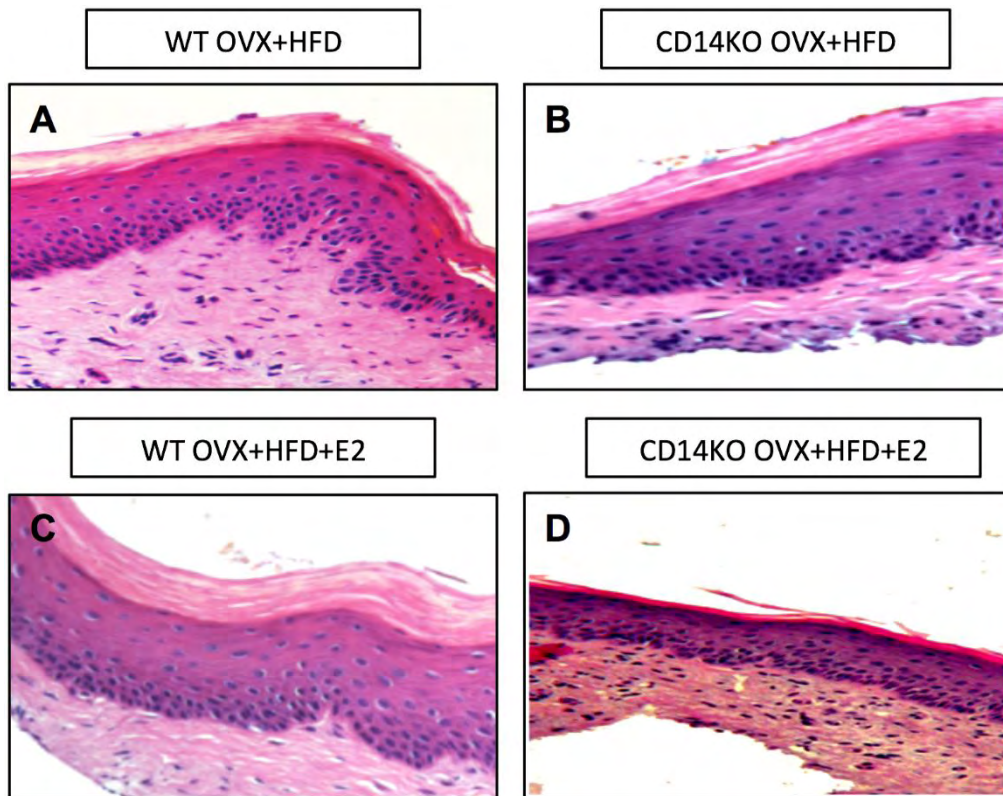
A) La présence de pathogènes parodontaux a été analysée à 8 semaines après 4 semaines de régime: WT OVX + HFD (n = 10), WT OVX + HFD + E2 (n = 10), CD14KO OVX + HFD (n = 12) et CD14KO OVX + HFD + E2 (n = 12). B-E) Les Héli-mandibules de chaque groupe reconstruites par le micro-CT. F) Lyse osseuse représentée par la distance (ligne jaune) entre le JAC (ligne rouge: la jonction émail-cément) et le ABC (ligne verte: crête osseuse alvéolaire) (n

= 8 pour chaque groupe). \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* P <0,001 (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM



**Figure 20 Les souris CD14KO sont protégées de l'inflammation parodontale induite par le HFD**

Expression de l'ARNm de TNF- $\alpha$  (A), IL1- $\beta$  (B), le PAI-1 (C) et de l'IL-6 (D) dans le tissu gingival. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p < 0,001 (test one-way ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne ± SEM.



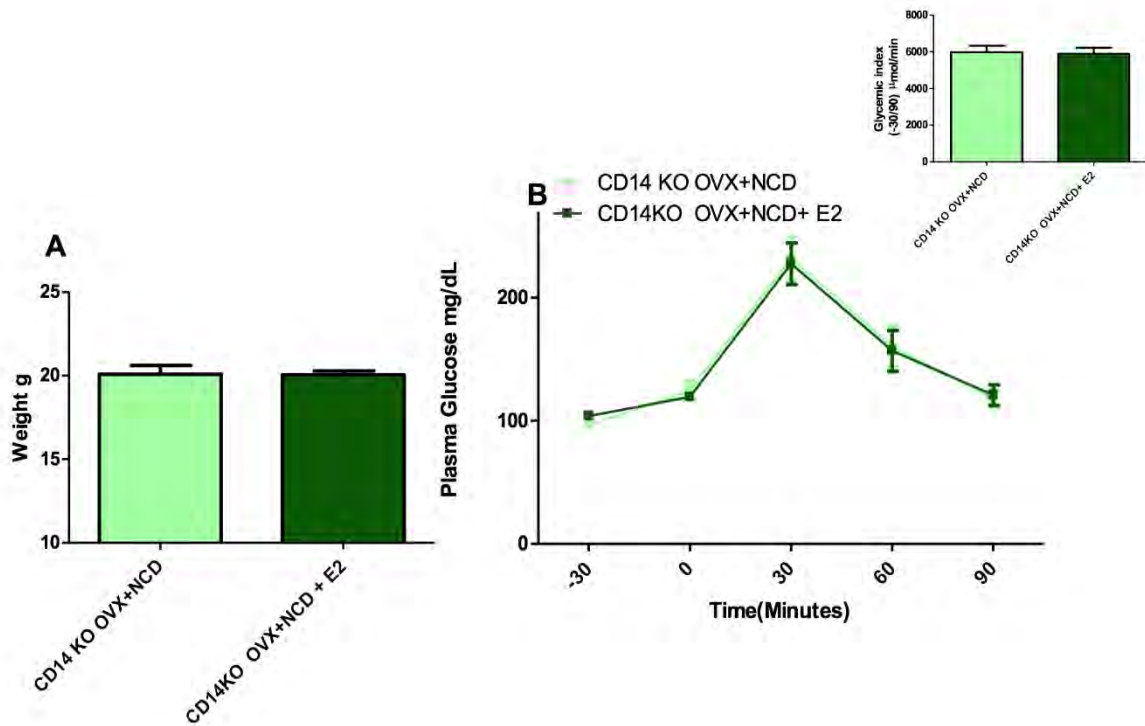
**Figure 21 La déplétion de CD14 réduit l'infiltration de cellules inflammatoires induite par le HFD dans le tissu conjonctif gingival** Aspect histologique des tissus gingivaux avec H / E coloration de WT OVX + HFD (A, n = 6), CD14KO OVX + HFD (B, n = 6) WT OVX + HFD + E2 (C, n = 6), et CD14KO OVX + HFD + E2 (D, n = 6) E. Nombre de cellules inflammatoires pour chaque groupe. \* P <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* P <0,001 (test one-way

ANOVA à un facteur suivie d'un test de Tukey) . Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.

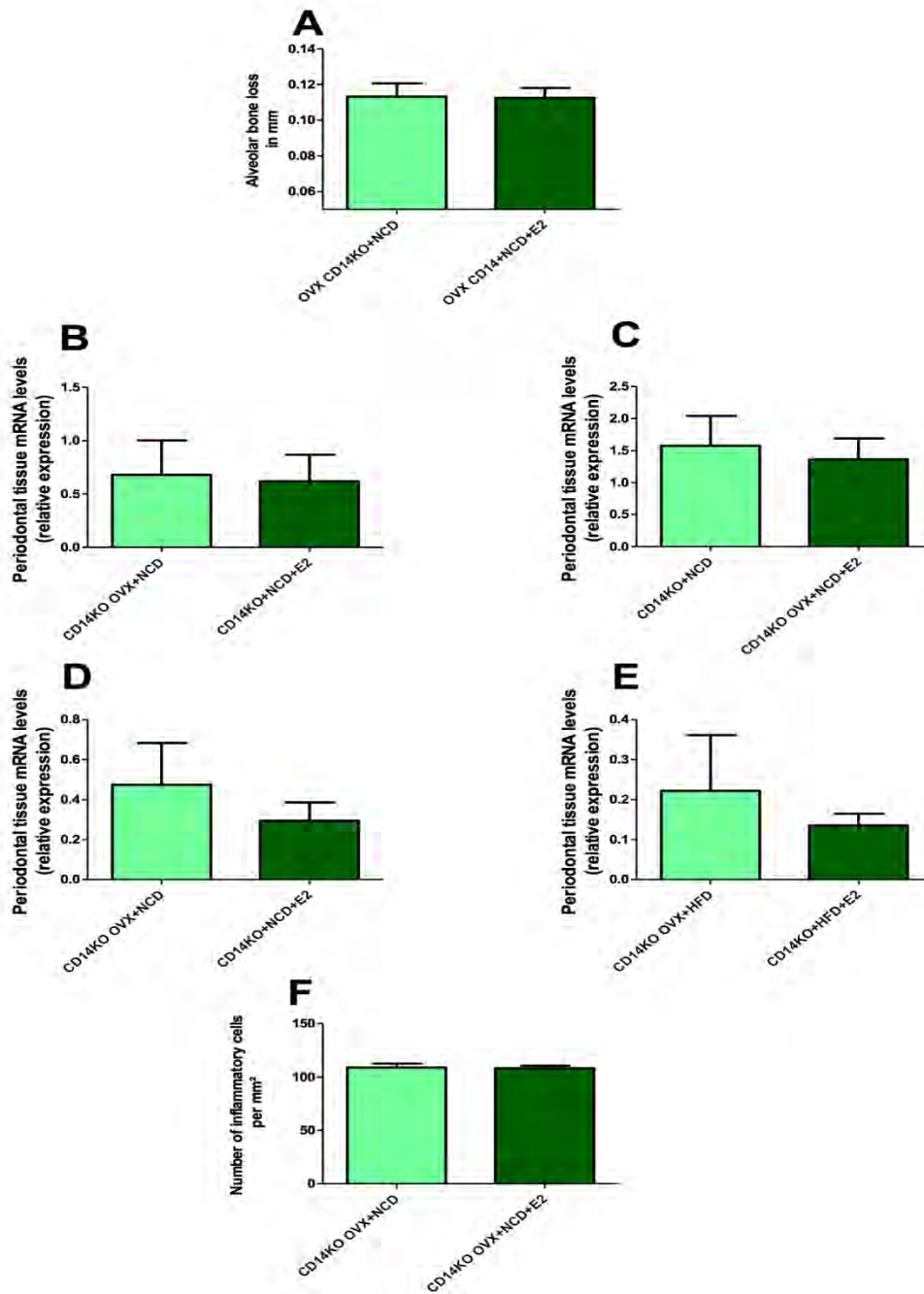
**Résultats supplémentaires :**

| <b>Bactéries cultures</b>                  |             |               |               |
|--|-------------|---------------|---------------|
|  | <b>WT</b>   | <b>CD14KO</b> | <b>CD14KO</b> |
|  | <b>OVX</b>  | <b>OVX</b>    | <b>OVX</b>    |
|  | <b>NCD</b>  | <b>NCD</b>    | <b>NCD</b>    |
|  | <b>E2</b>   |               | <b>E2</b>     |
|  | n=16        | n= 12         | n=12          |
|  | (%)         | (%)           | (%)           |
| <b><i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn)</b> | 0<br>(0)    | 0<br>(0)      | 1<br>(8.33)   |
| <b><i>Prevotella intermedia</i> (Pi)</b>   | 1<br>(6.25) | 0<br>(0)      | 0<br>(0)      |
| <b>Both Fn + Pi</b>                        | 0<br>(0)    | 1<br>(8.33)   | 0<br>(0)      |
| <b>Fn and/or Pi</b>                        | 1<br>(6.25) | 1<br>(8.33)   | 1<br>(8.33)   |

**Supp.Tableau 1 Pourcentage de cultures bactériennes positives chez les souris nourries par NCD** Le tableau met en évidence une analyse qualitative du microbiote parodontal de chaque groupe: WT OVX+NCD+E2 (n=16), CD14KO OVX+NCD (n=5) and CD14KO OVX+NCD+E2 (n=5). \*P<0.05,\*\*P<0.01 (Fischer exact tests).



**Supp.Figure 1** Les souris **CD14KO** nourries par **NCD** ne présentent pas de désordres **métaboliques** **A)** Poids des souris mesuré à 8 semaines pour chaque groupe après 4 semaines de régime: **CD14KO OVX+NCD** (n=12) and **CD14KO OVX+NCD+E2** (n=12). **B)** Glycémie au cours d'un IPGTT



**Supp.Figure 2. Les souris CD14KO nourries par NCD ne présentent pas de maladie parodontale** A) Lyse Alvéolaire osseuse de l'Hemi-mandibule de chaque groupe: CD14KO OVX+NCD (n=5) and CD14KO OVX+NCD+E2 (n=5). L'expression de mRNA de TNF- $\alpha$  (B), IL1- $\beta$  (C), PAI-1(D) et IL-6 (E) dans le tissu gingival in gingival tissue. Nombre de cellules inflammatoires dans le tissu gingival (F).

#### IV. Discussion

Les données présentées dans cet article montrent qu'un régime riche en graisses associé à une carence en œstrogènes induit une maladie parodontale chez la souris. En outre, nos résultats montrent que la supplémentation en œstrogène joue un rôle protecteur vis-à-vis des troubles métaboliques et parodontaux induits par le HFD.

Au cours de leur vie, les patients diabétiques vont présenter des complications dégénératives de certains organes et même du tissu parodontal dans son ensemble [66]. En effet, ces patients sont sujets à des formes plus sévères et une fréquence plus élevée de la maladie parodontale [91]. À ce jour, les mécanismes liant le diabète aux maladies parodontales sont encore mal compris. Nos données montrent que le régime diabétogène augmente la proportion de souris positives aux pathogènes parodontaux tels que *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella intermedia* [29,30]. En effet, il avait été suggéré qu'un régime riche en graisses pouvait augmenter l'apparition d'agents pathogènes oraux chez des patients diabétiques [112]. De plus, une modification de régime alimentaire en faveur d'un régime riche en matières grasses entraîne une nouvelle écologie intestinale et, par conséquent, une nouvelle écologie parodontale [32]. Cette modification augmente la proportion de bactéries gram-négatives produisant des LPS inflammatoires, au sein de l'intestin [53]. En outre, la diversité de composition des microbiotes pourrait expliquer les différents phénotypes métaboliques [113] et les différences interindividuelles de réponse aux anti-diabétiques [114]. Il est à noter que notre modèle animal ne présente pas d'hyperglycémie majeure mais représente un modèle de facteurs de risques. Les données doivent être interprétées en fonction d'un facteur de risque, le régime gras, sur la parodontite. Les mécanismes doivent être à explorer comme le rôle des lipides et d'une alimentation grasse sur le système immunitaire. Par conséquent, une fonction immunitaire inappropriée face aux antigènes de certaines bactéries générerait une inflammation métabolique et une perturbation de la balance cytokinique pouvant affecter et maintenir les troubles métaboliques [33]. D'autre part, une flore muqueuse composée de bactéries gram-négatives produit des LPS susceptibles de transloquer directement dans le sang [51] et aggraver l'inflammation et les maladies systémiques [33]. En effet, l'endotoxémie métabolique induite par un régime riche en graisse (avec une augmentation des taux plasmatiques de LPS) est considérée comme initiatrice de maladies métaboliques en aggravant l'inflammation systémique [20]. Par conséquent, l'inflammation systémique élevée chez les patients diabétiques pourrait être liée à la maladie parodontale [115] [36], ce qui suggère une relation bilatérale basée sur l'immunité entre ces deux pathologies [91]. C'est la raison pour laquelle nous étudierons dans une deuxième partie l'effet de la maladie parodontale sur le diabète. Cependant, l'inflammation apparaît comme un élément clé pouvant cibler la parodontite [71] et on peut postuler qu'un régime enrichi en matières grasses peut être un régulateur de la relation entre le microbiote et l'hôte humain [115].

Le microbiote paropathogène induit une réaction immuno-inflammatoire locale et systémique [116], une caractéristique commune avec les maladies métaboliques [2]. Comme indiqué plus haut, la parodontite se caractérise par la présence d'un biofilm complexe composé de LPS abritant des bactéries pathogènes gram-négatives. Le CD14, co-récepteur aux LPS impliqué dans l'immunité innée, est un modulateur systémique des troubles métaboliques

induits par le LPS [53]. Dans ce contexte, nous avons montré dans cette étude que l'absence de CD14 protège contre les effets délétères du HFD sur la parodontite. En effet, les souris CD14KO ovariectomisées nourries par HFD n'ont pas toutes montré des signes de parodontite comme la perte osseuse alvéolaire ou l'inflammation du tissu gingival. Néanmoins, le nombre de souris présentant une flore paropathogène s'est avéré être augmenté. Ce résultat peut suggérer qu'une HFD induit une modification du microbiote parodontal et une production accrue de LPS. Cette altération peut générer des troubles métaboliques et des atteintes parodontales médiées par l'activation de l'immunité innée via le CD14. En accord avec nos constatations, des études antérieures ont fait état de relations entre CD14, l'inflammation et la maladie parodontale chez l'homme [117].

L'homéostasie parodontale est sous le contrôle de plusieurs facteurs dont les variations de concentration sanguines d'hormones sexuelles [107]. De nombreuses études ont récemment montré que l'augmentation du statut oestrogénique pendant les cycles menstruels [118], la puberté [119] et la grossesse [120], pourrait être liée à l'apparition d'inflammation des tissus parodontaux superficiels. En revanche, la carence en œstrogène est considérée comme un facteur de risque de parodontites [108]. Dans notre laboratoire, nous avons récemment démontré que le traitement par œstrogène protège des désordres métaboliques induits par le HFD. Nous montrons ici un effet bénéfique des E2 sur la composition du microbiote parodontal [109]. Cet effet des E2 avait été confirmé chez les femmes ménopausées utilisant un traitement hormonal substitutif. Alors que *in vivo*, l'administration d'E2 réduit l'inflammation systémique chez la souris [121], nos résultats suggèrent que la supplémentation en œstrogènes puisse avoir un effet protecteur spécifique sur les tissus parodontaux en régulant l'inflammation induite par le régime gras. Les œstrogènes sont connus pour augmenter l'épaisseur des épithélia en stimulant la kératinisation [122]. Nous suggérons que cette hormone pourrait renforcer l'épithélium gingival face à la colonisation des paropathogènes [120]. De plus, les E2 stimulent la réponse immunitaire innée [123] assurant une meilleure réactivité des macrophages vis-à-vis des bactéries agressives [124]. Comme déjà suggéré [125], nos résultats démontrent que la supplémentation en E2 possède des effets anti-inflammatoires sur les tissus parodontaux de souris diabétiques. A la vue de ces résultats, nous pouvons espérer la mise en place d'essais expérimentaux sur l'hormonothérapie oestrogénique substitutive ciblant un meilleur contrôle glycémique pour maintenir la santé parodontale.

## V. Conclusion

Ce travail réalisé au cours de notre année de Master 2 et nos premières années de thèse suggère un lien de causalité entre l'activation de la voie des LPS (CD14 récepteur) de l'immunité innée par le microbiote parodontal et l'apparition de lésions parodontales induites par le HFD. Les œstrogènes pourraient être une des hormones régulatrices de ce mécanisme physiopathologique. On peut ainsi envisager les œstrogènes comme une nouvelle perspective thérapeutique pour contrer l'inflammation parodontale induite par HFD et de ce fait le développement de la maladie parodontale chez le sujet diabétique.



## **Résultats Expérimentaux 2:**

### La maladie Parodontale facteur de risque de l'Insulino- Résistance

En cours de finalisation

## I. Altération immunitaire et Maladie parodontale : un nouveau paradigme causal des maladies métaboliques

L'évolution du mode de vie, et précisément l'augmentation prépondérante d'une alimentation enrichie en matières grasses, contribue à l'incidence croissante du diabète de type 2 dans le monde entier [126]. Une des composantes majeures des maladies métaboliques est le défaut d'action de l'insuline définie par l'insulino-résistance. Cet état est caractérisé par une résistance des tissus à l'action de l'insuline sur la production et le transport du glucose ayant pour conséquence une augmentation pathologique de la glycémie [20]. L'origine de l'insulino-résistance n'est pas parfaitement définie d'un point de vue étiologique mais est associée à une réaction inflammatoire à « bas bruit » chronique et permissive [33]. Les cellules du système immunitaire, macrophages, cellules dendritiques, ainsi que les lymphocytes tissulaires, sont activés par l'état métabolique. Ces cellules libèrent des cytokines et chémokines pro-inflammatoires. Ces dernières altèrent l'action de l'insuline ce qui contribue à l'entretien de la maladie métabolique. La production anormale de cytokines inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), l'IL1 $\beta$  (Interleukine 1 beta), l'IL6 (Interleukine 6) et PAI1 (Plasminogen Activator Inhibitor) participeraient au développement de l'insulino-résistance [31]. Les cytokines ont un effet délétère sur les voies de signalisation de l'insuline. En effet, elles inhibent la signalisation du récepteur à l'insuline en activant des phosphatases et des sérines-thréonines kinases qui inactivent les substrats du récepteur à l'insuline et donc bloquent la cascade de signalisation correspondante [33]. L'origine des facteurs initiateurs de la réaction inflammatoire délétère est peu connue. Or nos travaux récents ont démontré que la concentration en facteurs d'origine bactérienne les lipopolysaccharides (LPS), est augmentée dans le sang chez l'homme et les modèles animaux de diabète et d'obésité. Cette endotoxémie était définie en tant qu' « endotoxémie métabolique ». Elle était notamment corrélée avec la proportion de graisses dans la ration alimentaire [51]. Nous avons également montré que le régime riche en graisse modifiait la flore intestinale en favorisant un enrichissement en bactéries riches en LPS, les Gram négatives [52]. Le traitement par des antibiotiques diminuait très efficacement la flore intestinale et réduisait alors l'endotoxémie métabolique ce qui améliorait le contrôle métabolique [53]. Ainsi, une relation entre régime gras, flore à Gram-, endotoxémie et maladie métabolique a été montrée par notre laboratoire. Le lien conceptuel avec la maladie parodontale trouve son idée dans sa définition : maladie infectieuse bactérienne à Gram- et à manifestation inflammatoire [79]. La rencontre de ce biofilm chargé en bactéries Gram- et des cellules immunitaires entraîne une inflammation généralisée du tissu parodontal. Les études épidémiologiques récentes mettent en évidence une distribution ubiquitaire et sa prévalence varie de 20% à 50% dans la population générale [127] alors que la prévalence touche 60% des patients diabétiques [128]. De plus, le contrôle glycémique est un facteur de risque constaté du développement et de l'évolution de la maladie parodontale [91]. Outre l'implication du diabète sur la maladie parodontale, des études récentes proposent que la maladie parodontale influence directement les paramètres métaboliques des patients diabétiques [129]. En effet, la prévalence de l'hyperglycémie des sujets atteints de pathologies parodontales est significativement supérieure à celle des patients indemnes de lésions parodontales [130]. D'autre part, la prise en charge de la maladie parodontale chez des patients diabétiques améliore leurs paramètres métaboliques [131] et entraîne notamment une baisse

de 0,40% de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) [129]. La maladie parodontale et son implication systémique présentent un enjeu majeur de santé publique bien que l'explication des phénomènes biologiques impliqués reste encore inconnue à l'heure actuelle.

La maladie parodontale est caractérisée par un biofilm pathologique de bactéries Gram-. Cette infection orale pourrait contribuer à générer une infection systémique entraînant un état inflammatoire chronique contribuant à l'augmentation de la diffusion des LPS dans le sang [85]. Sur la base de ce concept, Saito *et coll.* ont avancé l'hypothèse de la corrélation entre le développement d'une flore de paropathogènes et le développement de l'obésité. L'endotoxine induite par des agents pathogènes gram-négatifs pourrait être responsable des effets à distance des maladies parodontales sur la santé générale. En effet, le LPS libéré dans la circulation sanguine peut affecter directement les tissus majeurs du métabolisme glucidique : foie, tissu adipeux et muscle squelettique [132]. Cet antigène est capable d'induire une réaction inflammatoire à distance dans l'ensemble des organes [25] entraînant une étape précoce de l'insulino-résistance propice au développement des troubles métaboliques [33].

En outre, certains auteurs ont posé l'hypothèse d'une translocation totale des bactéries parodontales dans la circulation systémique. Dans ce contexte, Backhed *et coll.* ont montré que la présence de certaines bactéries de la cavité buccale est corrélée avec les marqueurs biologiques de l'athérosclérose [104]. En ciblant l'ARN 16S des régions V1-V2 par pyroséquençage et en appliquant l'analyse qPCR, ils ont recherché les OTUs retrouvés à la fois dans les échantillons de plaque d'athérome et à la fois dans les échantillons oraux des mêmes individus. Ils ont montré que l'abondance de *Fusobacterium* dans les prélèvements oraux, l'un des premiers colonisateurs de la plaque parodontale, peut influencer directement le taux de cholestérol total et de cholestérol LDL.

De nombreuses études suggèrent que *Porphyromonas gingivalis*, autre paropathogène majeur, est associée à de nombreuses maladies systémiques comme les maladies cardio-vasculaires [133], la polyarthrite rhumatoïde [134] et le cancer du pancréas [135]. De plus, une étude récente a montré l'impact de *Porphyromonas gingivalis* sur la Stéatose Hépatique Non-Alcoolique (NASH) [136]. Pg entraîne une aggravation de la NASH en induisant une réaction inflammatoire dans le tissu hépatique lésé. Ces données récentes témoignent de la translocation des bactéries parodontales dans la circulation systémique. En effet, ces paropathogènes peuvent induire l'inflammation systémique de bas grade caractéristique des maladies métaboliques [20] par deux mécanismes: (i) une perfusion continue de LPS vers les organes métaboliques [71] et / ou (ii) la translocation bactérienne à travers le parodonte vers la circulation systémique [104]. Cette diffusion est susceptible d'être responsable d'un entretien et d'une aggravation des maladies métaboliques. Ainsi, plusieurs arguments de la littérature suggèrent une relation forte entre maladies métaboliques et parodontite avec la réaction immuno- inflammatoire comme lien physiopathologique [137].

A la lumière de ces données bibliographiques et des travaux antérieurs de notre laboratoire, nous posons l'hypothèse que la maladie parodontale, via l'initiation d'une réaction

inflammatoire, soit un facteur de risque d'aggravation de l'insulino-résistance à l'origine d'un diabète.

Par conséquent, l'objectif de la présente étude est de montrer que la maladie parodontale est un facteur de risque du développement du diabète et d'étudier les mécanismes d'induction de l'insulino-résistance par une parodontite expérimentale via l'inflammation métabolique.

## II. Modèle expérimental et Méthodes

### **Procédures expérimentales et Animales**

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité local d'éthique de l'hôpital Ranguel. Afin d'évaluer l'impact de la maladie parodontale (MP) sur métabolisme glucidique, des souris C57BL/6 femelles âgées de 4 semaines ont été randomisées en 2 groupes. Une partie des souris a été colonisée pendant 1 mois à intervalles réguliers espacés de 24h par une microflore sous-gingivale pathogène (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* identifiées dans la partie expérimentale 1 [138]) connue pour induire une MP [139], alors que l'autre partie a reçu une solution véhicule. Après 1 mois de colonisation les souris ont été subdivisées en 2 groupes pour être nourries soit par un régime normal (i.e. NCD; contenant: 12% graisse, 28% protéine, and 60% carbohydate; A04, Villemoisson sur Orge, France) ou un régime diabéto-gène (i.e. HFD; contenant: 72% graisse, 28% protéine and moins de 1% carbohydate; SAFE, Augy, France) pour 3 mois. Ce régime particulier est connu pour induire un état diabétique après 4 semaines de régime. Ainsi, les souris sont divisées en 4 groupes: NCD avec solution véhicule (n=12), NCD + MP avec solution chargée en bactéries d'intérêt (n=12), HFD avec solution véhicule (n=25) et HFD + MP avec solution chargée en bactéries d'intérêt (n=25). Pour étudier l'impact du LPS de Pg, des mini-pompes furent placées en sous cutanée chez les souris pour diffuser par capillarité pendant 28 jours soit du LPS de P.g soit une solution véhicule. Des prélèvements de sang furent exécutés chaque mois et conservés à -80°C. A la fin des expériences, les souris furent sacrifiées par dislocation cervicale et les différents tissus collectés et congelés à -80°C.

### **Tests des Paramètres Diabétiques : IPGTT et Clamp euglycémique hyperinsulinimique**

Le phénotype diabétique a été évalué en effectuant un test de tolérance au glucose par voie intra péritonéale (1 g par kg) après 6h de jeûne. La glycémie sanguine a été mesurée avec un glucomètre (Roche Diagnostic, Grenoble, France) à -30, 0, 30, 60 et 90 minutes après l'injection. Après 6h de jeûne, la sensibilité à l'insuline a été évaluée par l'utilisation de glucose par les souris dans des conditions hyperinsulinimique comme décrit précédemment [53].

### **Analyse de la Lyse Osseuse Mandibulaire**

Les héli-mandibules ont été scannées avec un micro-scanner de haute resolution (Viva CT40; Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) [140]. Les données furent acquises à 45 keV, avec

une taille de voxel de 10  $\mu\text{m}$ . La lyse osseuse alvéolaire a été quantifiée en mesurant la distance de la jonction émail-cément (« cementum enamel junction » ie CEJ) à la crête osseuse alvéolaire (« alveolar bone crest » ie. ABC) de chaque dent [111]. Nous avons obtenu 6 mesures linéaires (en millimètre) de la lyse osseuse pour chaque dent en utilisant un logiciel de mesure assisté par ordinateur sur les coupes du micro-scanner. Les reconstitutions 3D furent générées à partir de 400 slices.

### **Marquage de surface et intracellulaire**

La rate et les nœuds lymphatiques cervicaux ont été disséqués puis écrasés afin d'obtenir une suspension cellulaire. Les globules rouges spléniques ont été lysés grâce à une solution hypertonique. Afin de bloquer les récepteurs Fc des immunoglobulines, les cellules ont été marquées avec un anticorps anti-CD16/CD32 pendant 15 minutes sur la glace puis avec un cocktail d'anticorps spécifiques : pour les lymphocytes T : anti-CD4 APC-eFluor780, anti-TCR $\beta$  PerCP-Cy5.5, anti-CD8 V450. Pour les lymphocytes B : anti-CD19 FITC et anti-MHC II, les macrophages/monocytes CD11b APC-eFluor780 et les cellules dendritiques : anti-CD11c PE-Cy7. Les cellules ont ensuite été fixées et perméabilisées avec un kit cytofix/cytoperm (BD Biosciences) pendant 20 minutes à 20°C, puis marquées avec un anti-FoxP3 PE pendant 60 minutes à 4°C. Tous les anticorps proviennent de BD Biosciences ou eBiosciences. Le sang a été prélevé dans le sinus retro-orbital. Les globules rouges ont été lysés grâce à une solution hypertonique. Les leucocytes sanguins ont été ensuite marqués comme précédemment avec le cocktail d'anticorps suivant : anti-MHC II AF488, anti-TLR4 PE, anti-CD19 PerCP-Cy5.5, anti-CD4 PE-Cy5, anti-CD11c APC, anti-CD11b APC eFluor 780, CD8-Pacific Blue. Les cellules mortes ont été exclues grâce à un marqueur de viabilité (Yellow Dye, Invitrogen). Les cellules marquées ont été ensuite analysées grâce à un cytometre en flux numérique (Digital LSR II Fortessa, Becton Dickinson) et les données ont été traitées avec le logiciel FlowJo (Tree Star).

### **Analyse statistique**

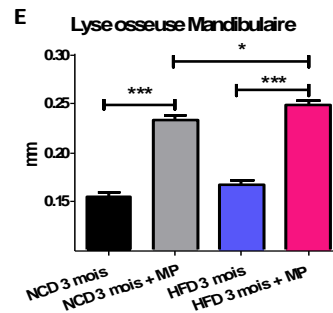
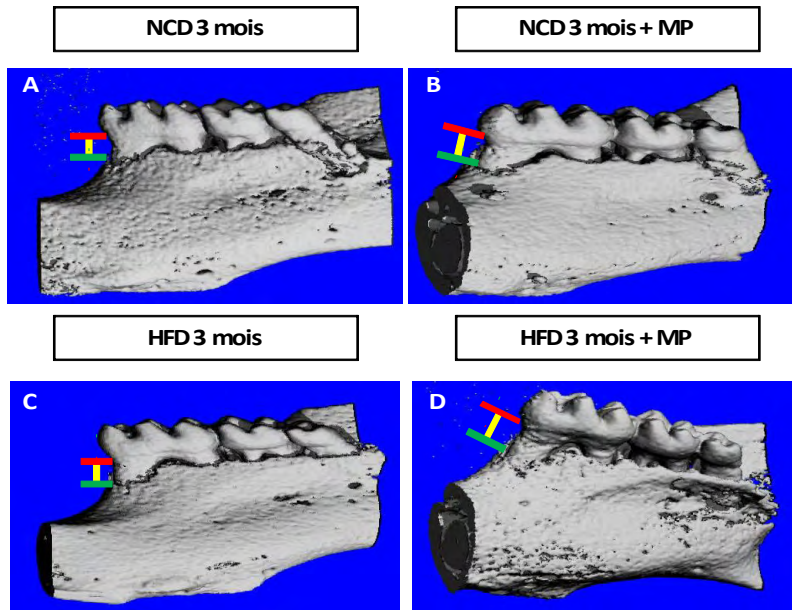
Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Une analyse One-way ANOVA suivi d'un Tukey's post-test a été utilisée pour les études entre groupes excepté pour les IPGTT analysées par two-way ANOVA suivie de Bonferroni test. Les analyses  $< 0.05$  sont considérées comme statistiquement significative. Nous avons utilisé GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Les valeurs significatives sont considérées à partir de  $p < 0.05$ .

### III. Résultats

Ma partie expérimentale fut de valider la mise en place d'un modèle de maladie parodontale.

#### **La colonisation buccale par Pg, Fn et Pi induit une lyse osseuse alvéolaire mandibulaire aggravée par le HFD.**

Nous avons examiné l'effet de la charge bactérienne paropathogène sur la lyse osseuse parodontale. En présence de HFD ou de NCD, la colonisation bactérienne par les 3 paropathogènes induit une lyse osseuse alvéolaire signe de la maladie parodontale (**Fig.22 A-E**). De plus, les souris nourries par HFD présentent une lyse osseuse majorée par rapport aux souris nourries par NCD (**Fig.22 E**). La colonisation par Pg, Fn et Pi est donc responsable de l'induction de la maladie parodontale.



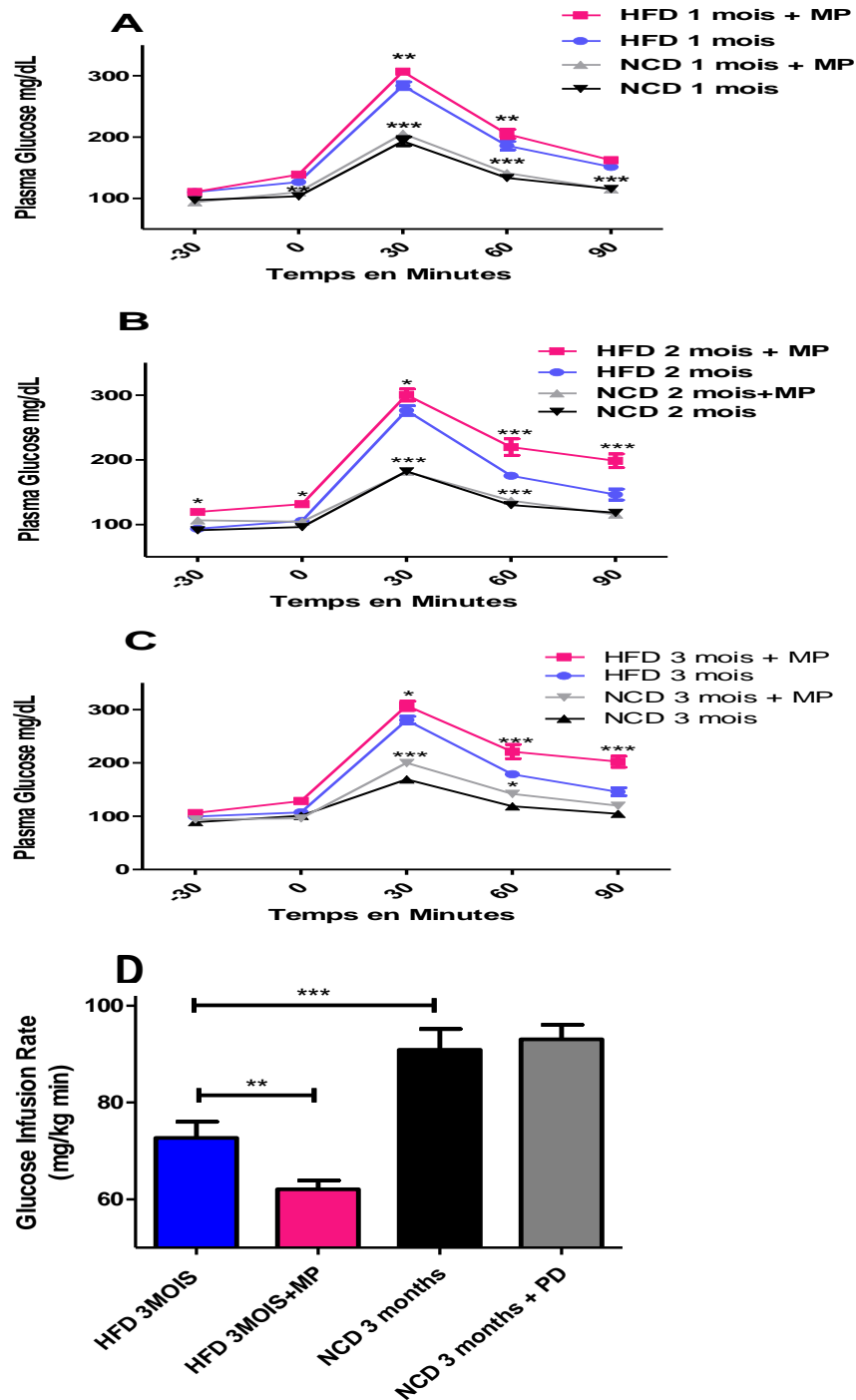
**Figure 22 La Colonisation par les bactéries parodontales induit la lyse osseuse alvéolaire mandibulaire** Les souris ont été gavées avec  $10^9$  CFU de pathogènes parodontaux *P. gingivalis*, *P. intermedia* et *F. nucleatum* ou d'une solution véhicule. Les souris ont été ensuite nourries par un régime alimentaire normal (NCD) ou un régime diabétogène, riche en matières grasses glucides régime sans (HFD) pendant quatre semaines. Les Héli-mandibules des souris nourries avec NCD (A, B) et avec HFD (C, D) ont été reconstruites par micro-CT. La Perte d'os alvéolaire (trait jaune) a été explorée en mesurant la distance entre Jonction Email-Cément C (trait rouge)-Crête Alvéolaire osseuse (trait vert) pour chaque groupe (E). \*  $P < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$  (test ANOVA suivie d'un test de Tukey). Les résultats sont présentés en moyenne  $\pm$  SEM.

Après avoir validé ce modèle de MP, j'ai voulu explorer le phénotype diabétique des souris.

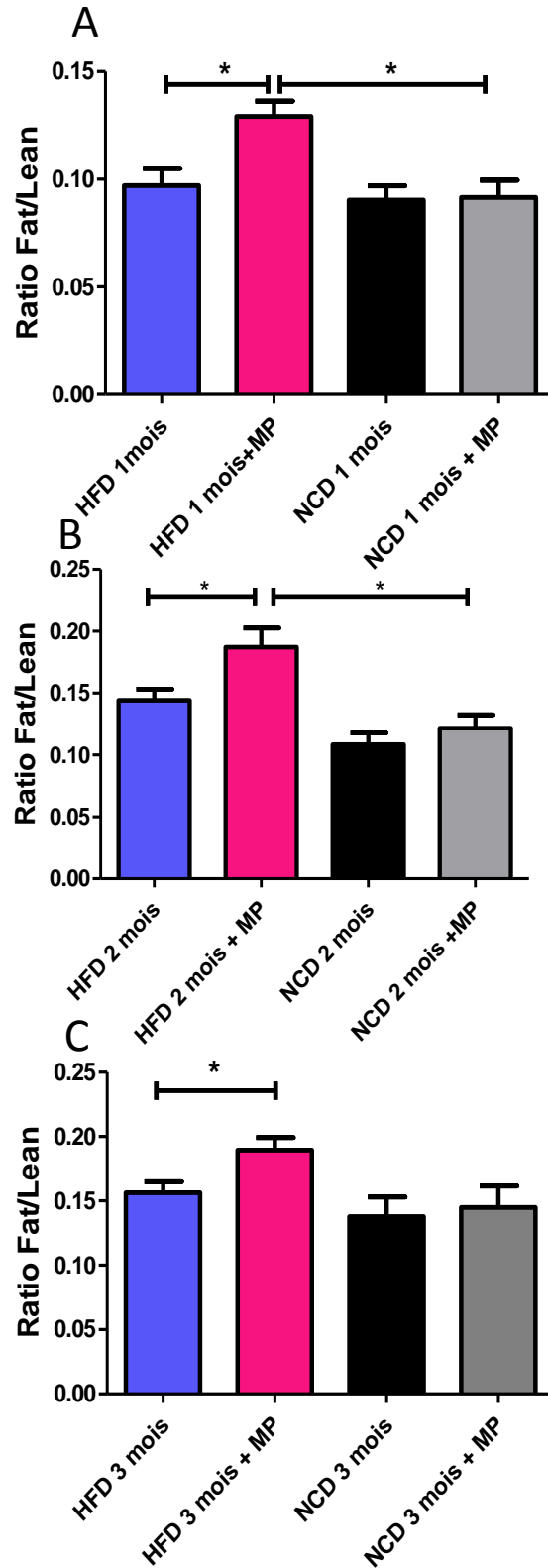
**La maladie parodontale aggrave les désordres métaboliques induits par le HFD.**

Comme cela a été mis en évidence précédemment, les souris nourries par HFD ont développé un phénotype métabolique caractérisé par une altération de la glycémie à jeun (Fig. 23A-C), une intolérance au glucose (Fig. 23A-C), une insensibilité à l'insuline (Fig. 23D) et une augmentation de la proportion de masse grasse (Fig.24 A-C). La maladie parodontale aggrave le phénotype diabétique induit par le HFD notamment la masse grasse des souris colonisées dès 1 mois de régime (Fig.24 A-C), l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline à 3 mois (Fig. 24C et 24D). La gravité de la maladie parodontale est corrélée à l'insulino-résistance (Fig.25).



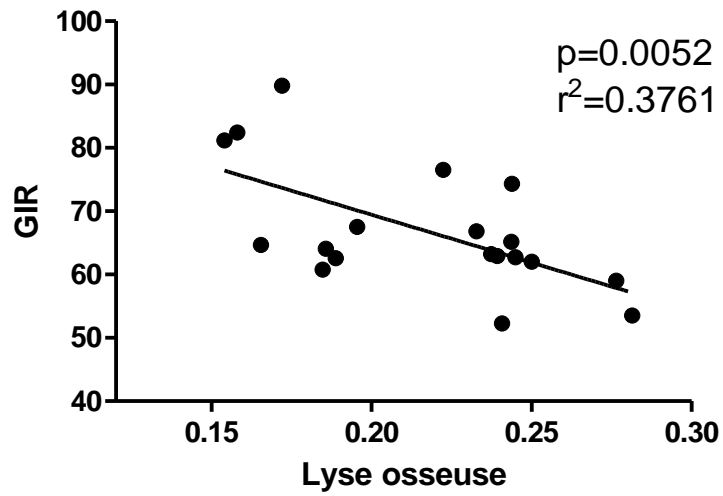


**Figure 23** La maladie parodontale aggrave l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance induites par le régime HFD A, B et C IPGTT (1 g/kg) chez souris nourries par HFD ou NCD soit pendant 1 mois(A), soit pendant 2 mois (B) et soit pendant 3 mois (C). Les résultats sont représentés en Mean +/- SEM. **D** Infusion en glucose durant le clamp euglycémique hyperglycémique chez souris nourries par HFD ou NCD pendant 3 mois colonisées par paropathogènes ou solution véhicule.



**Figure 24 La maladie parodontale aggrave la proportion de masse grasse chez les souris nourries par HFD A, B et C** ratio de masse grasse chez les souris nourries par HFD ou NCD soit pendant 1 mois(A), soit pendant 2 mois (B) et soit pendant 3 mois (C) colonisées par périopathogènes ou solution véhicule. Les résultats sont représentés en en moyenne  $\pm$  SEM

## Corrélation Sensibilité Insuline et Lyse osseuse

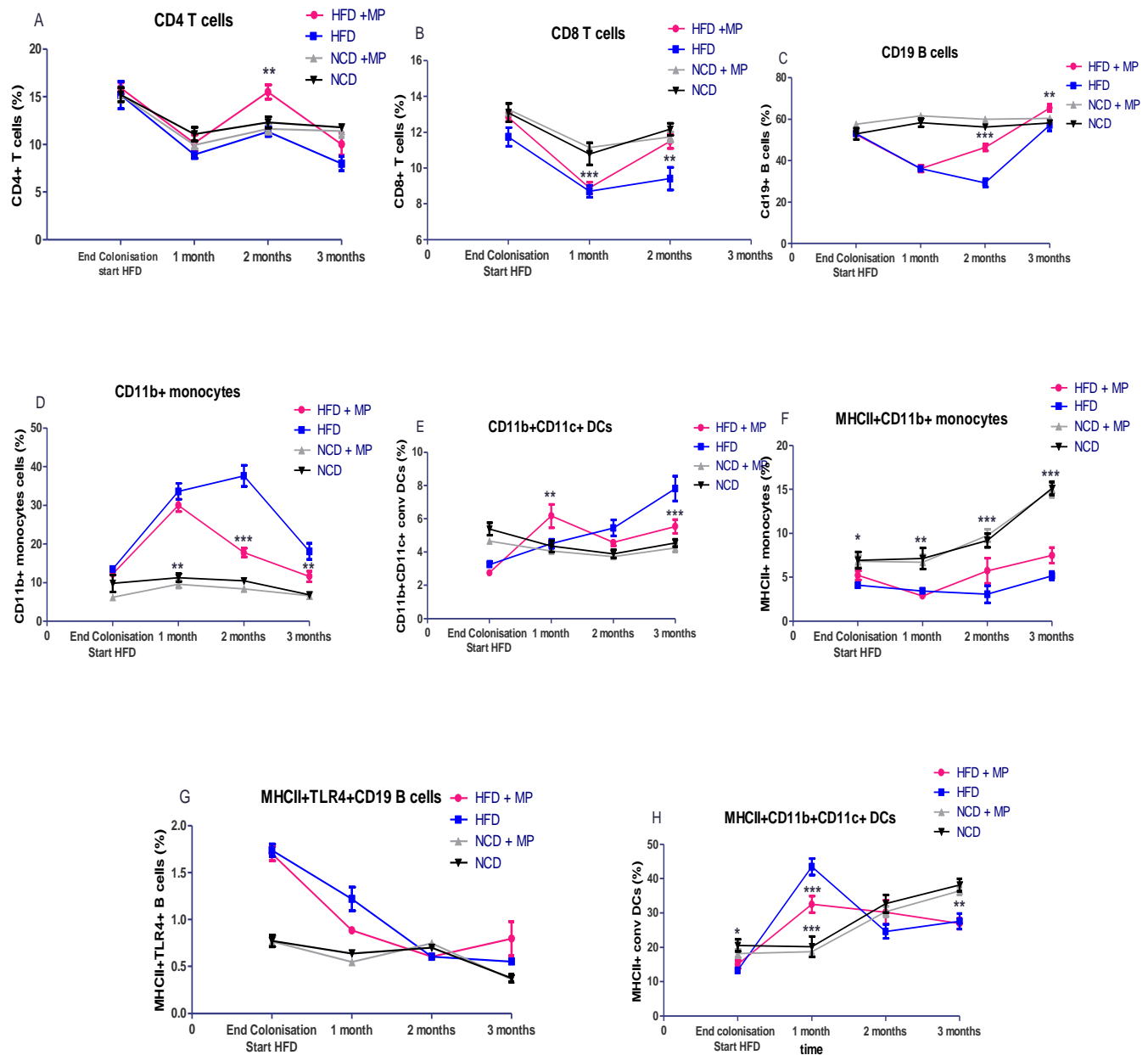


**Figure 25** La lyse osseuse et la sensibilité à l'insuline représentée par le GIR sont **fortement corrélées** (n=20) La corrélation fut calculée par Graph Pad avec une régression linéaire.

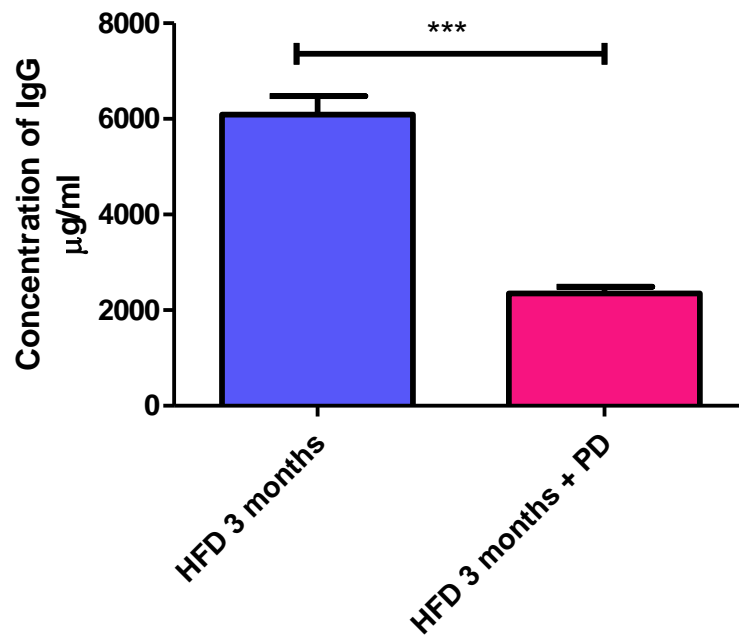
Après avoir confirmé l'impact de la MP sur les paramètres métaboliques, nous nous sommes posé la question du mécanisme régulateur. Comme décrit au cours de ce travail, MP et diabète sont caractérisés par une altération de la réaction immunitaire. De ce fait, nous avons analysé la réponse immunitaire systémique et loco-régionale dans un contexte de MP et diabète.

### **La maladie parodontale altère la réponse immunitaire systémique et loco-régionale induite par le HFD.**

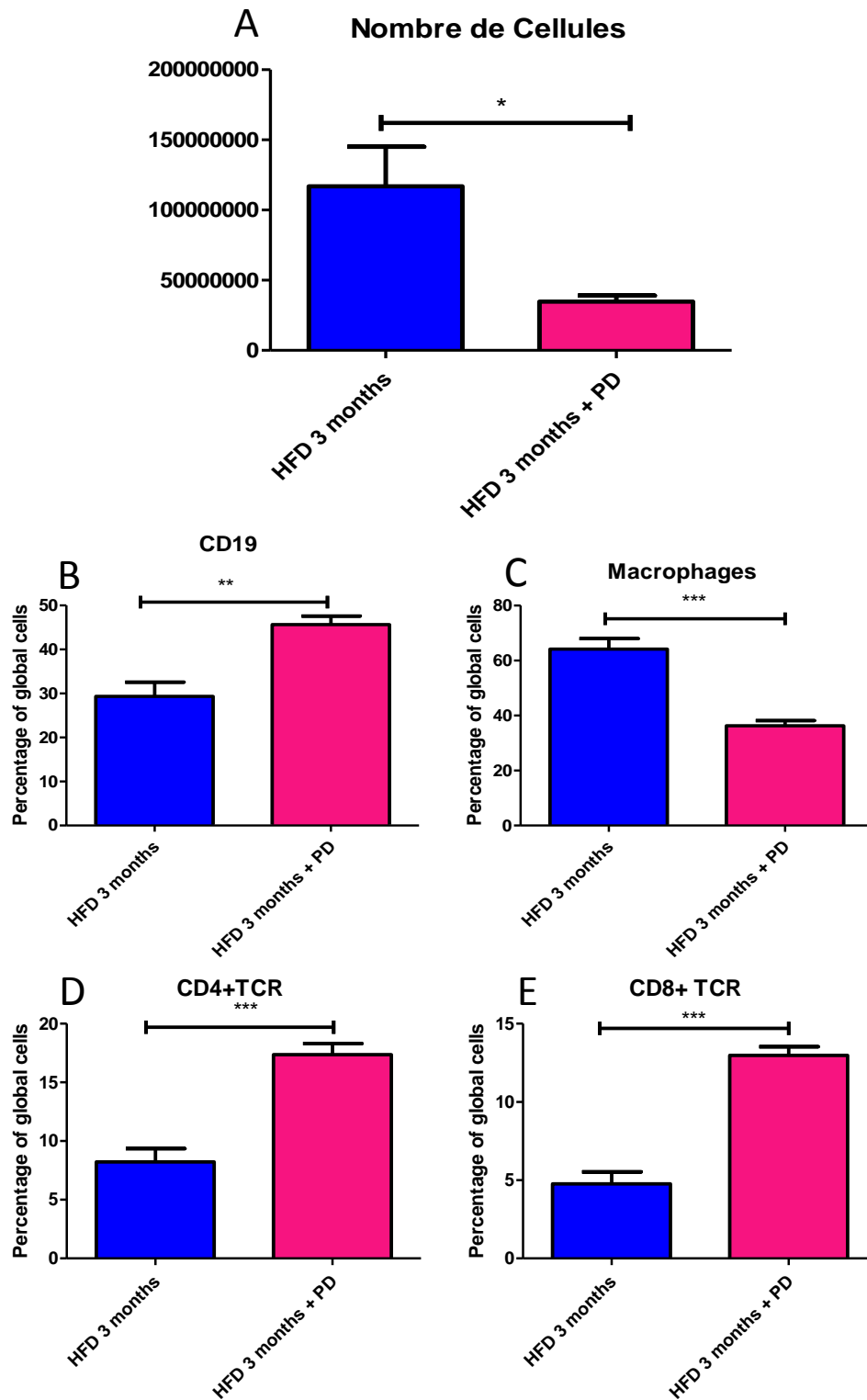
La maladie parodontale altère la proportion des lymphocytes T4 et T8 (**Fig.26 A B**) dans le sang par rapport aux contrôles non colonisées. De plus, la proportion de lymphocytes B est statistiquement augmentée dans le sang des souris nourries par HFD et colonisées par rapport aux souris seulement nourries par HFD (**Fig.26 C**). Nous constatons que la proportion des cellules du système immunitaire inné est fortement altérée chez les souris nourries par HFD (**Fig.26 D-H**). De plus, la colonisation bactérienne perturbe préférentiellement la lignée monocyttaire en diminuant leur proportion sanguine (**Fig.26 D**). La maladie parodontale diminue le nombre d'immunoglobuline G sérique chez les souris diabétiques (**Fig.27**). Afin d'évaluer l'impact de la maladie parodontale sur le système immunitaire systémique, nous avons énuméré le nombre de cellules et la proportion de chaque lignée cellulaire dans un organe central de l'immunité : la rate. Nous avons mis en évidence une diminution significative du nombre de cellules de l'immunité dans les rates de souris diabétiques colonisées par les paropathogènes comparées aux souris diabétiques (**Fig.28 A**). De plus, on constate une proportion différente des cellules immunitaires avec une augmentation de l'immunité acquise notamment des lymphocytes B (**Fig.28 B**), T CD4 (**Fig.28 D**) et T CD8 (**Fig.28 E**) chez les souris colonisées. Parallèlement, on constate une diminution de l'immunité aspécifique notamment des macrophages (**Fig.28 C**) dans les rates des souris diabétiques colonisées. Après avoir analysé l'impact sur l'immunité systémique de la maladie parodontale, nous nous sommes centralisés sur l'immunité locorégionale dans les ganglions cervicaux. Nous avons mis en évidence une baisse significative du nombre de cellules immunitaires dans les ganglions des souris infectées sous HFD versus les souris seulement sous HFD non colonisées (**Fig.29 A**). De plus, nos résultats mettent en évidence une augmentation des cellules de l'immunité spécifique notamment lymphocytes B (**Fig.29 B**), T CD4 (**Fig.29 D**) et T CD8 (**Fig.29 E**) alors qu'il existe une baisse de la proportion des macrophages (**Fig.29 C**) dans les ganglions des souris diabétiques ayant été colonisées.



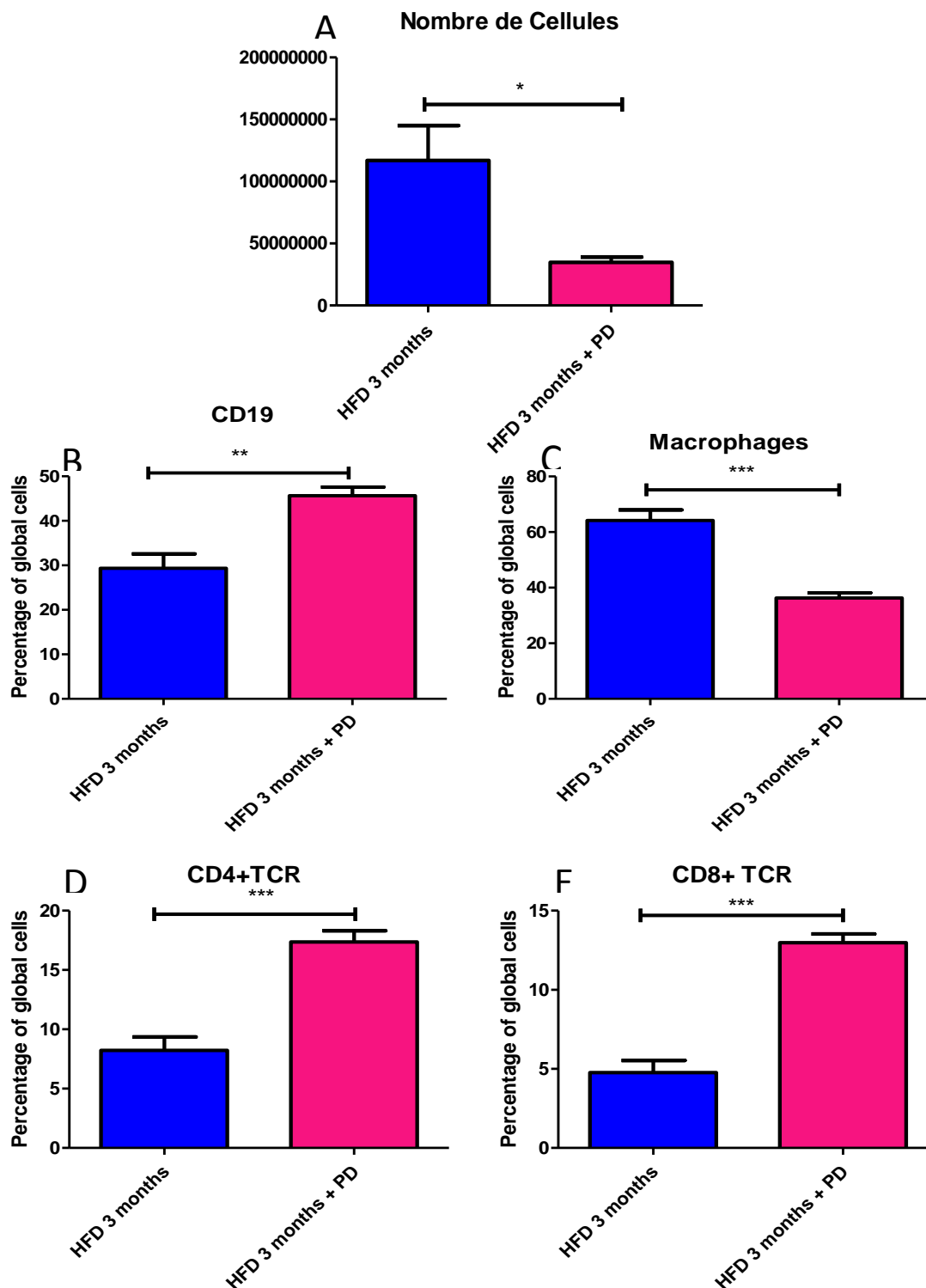
**Figure 26 La maladie parodontale influence le système immunitaire systémique** Les souris furent colonisées soit par  $10^9$  CFU de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* soit par une solution véhicule. A chaque point de suivi après le début du régime, le fréquence de CD4 (A) et de CD8 (B) T lymphocytes, B lymphocytes (CD19+) (C), macrophages CD11b+CD11c- (D), précurseurs de cellules dendritiques (CD11b+CD11c+) (E), précurseurs de monocytes (MHCII+CD11b+) (F), de lymphocytes B exprimant le TLR 4 (MHCII+TLR4+CD19+) (G) et les précurseurs des cellules dendritiques de classe II (MHCII+CD11b+CD11c+) (H) fut déterminée par cytométrie de flux dans le sang des souris. Les fréquences sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$  (Student's t test)



**Figure 27 La maladie parodontale diminue le nombre d'IgG circulante chez la souris diabétique** Les souris furent colonisées soit par  $10^9$  CFU de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* soit par une solution véhicule. La concentration d'IgG fut déterminée dans le sérum par Kit Elisa



**Figure 28 La maladie parodontale diminue le nombre de cellules immunitaires dans la rate et augmente la proportion de cellules immunitaires acquises chez les souris diabétiques** Les souris furent colonisées soit par  $10^9$  CFU de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* soit par une solution véhicule. Après 3 mois de régime HFD, le nombre de cellules immunitaires (A), la fréquence de B lymphocytes (CD19+) (B), macrophages CD11b+CD11c-) (C), de CD4 (D) et de CD8 (E) T lymphocytes, fut déterminé par cytométrie de flux dans la rate. Les fréquences sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001 (Student's t test)



**Figure 29** La maladie parodontale diminue le nombre de cellules immunitaires dans les ganglions cervicaux et augmente la proportion de cellules immunitaires acquises chez les souris diabétiques Les souris furent colonisées soit par  $10^9$  CFU de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum* soit par une solution véhicule. Après 3 mois de régime HFD, le nombre de cellules immunitaires (A), la fréquence de B lymphocytes (CD19+) (B), macrophages CD11b+CD11c-) (C), de CD4 (A) et de CD8 (B) T lymphocytes,

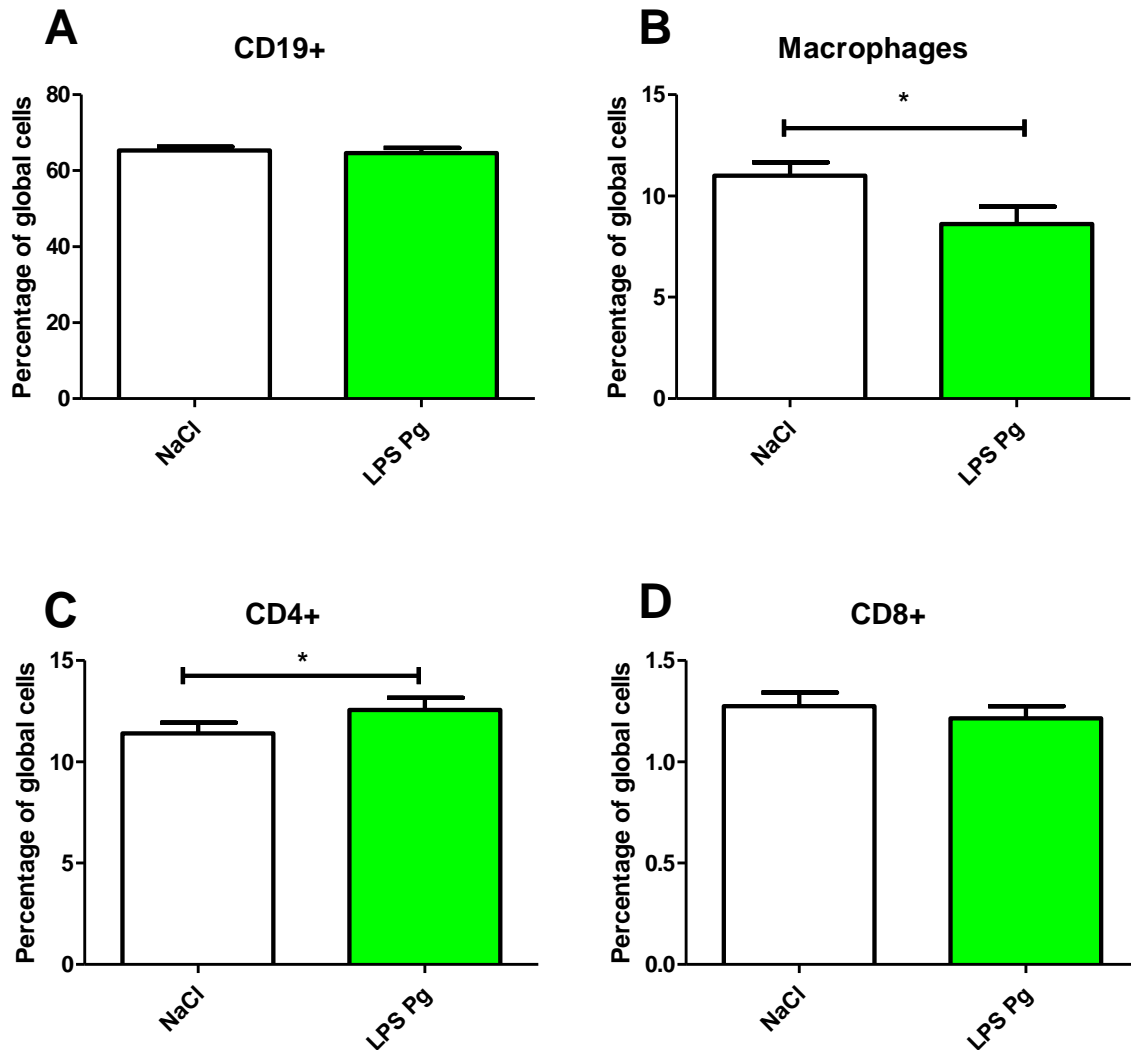


furent déterminés par cytométrie de flux dans la rate. Les fréquences sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001 (Student's t test)

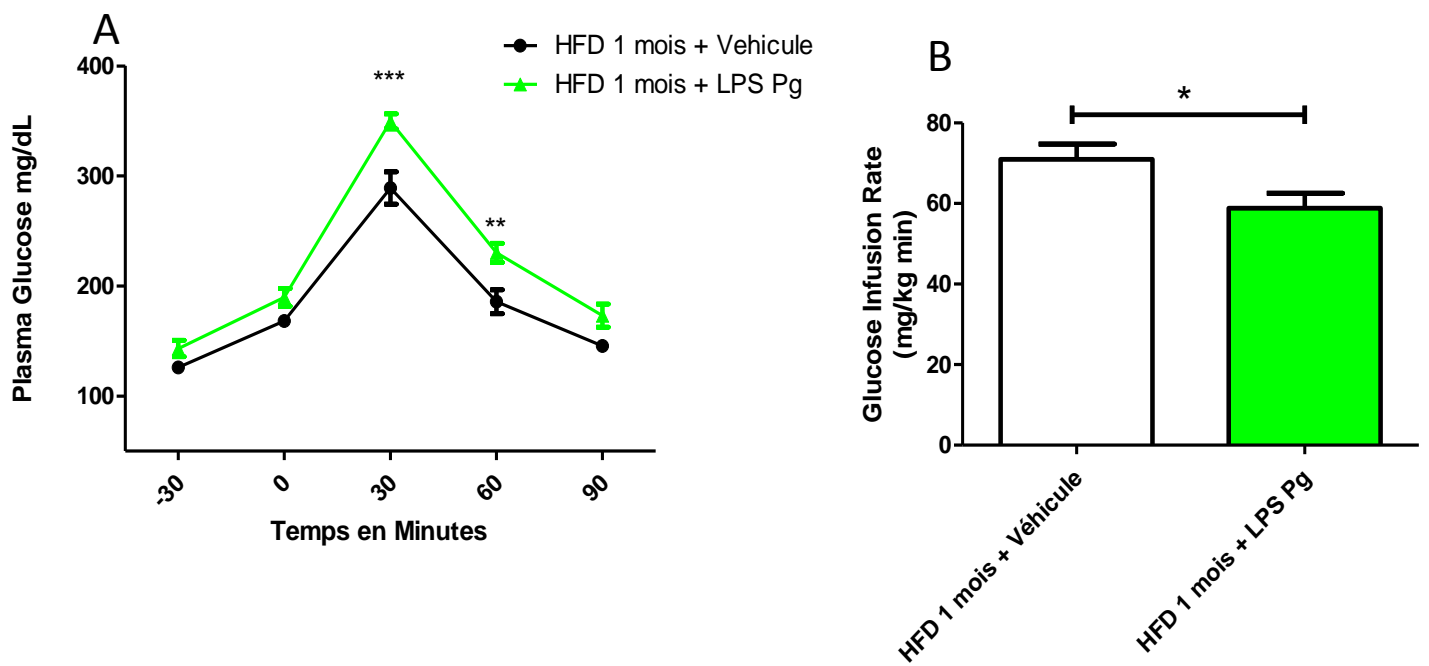
Nos résultats mettent en évidence l'implication du système immunitaire dans l'effet délétère des bactéries paropathogènes sur le diabète. La suite de mes expériences a pour but d'examiner la nature des fragments bactériens à l'origine de l'altération immunitaire. Mes premières données mettaient en cause le récepteur CD14 dans les maladies métaboliques. De ce fait, j'ai posé l'hypothèse de l'implication des LPS des bactéries paropathogènes sur l'état diabétique. Dans ce but, j'ai mis en place des mini-pompes diffusant du LPS de *Porphyromonas Gingivalis*.

### **Les effets néfastes du paropathogène *Porphyromonas Gingivalis* sur les paramètres diabétiques sont liés à son LPS**

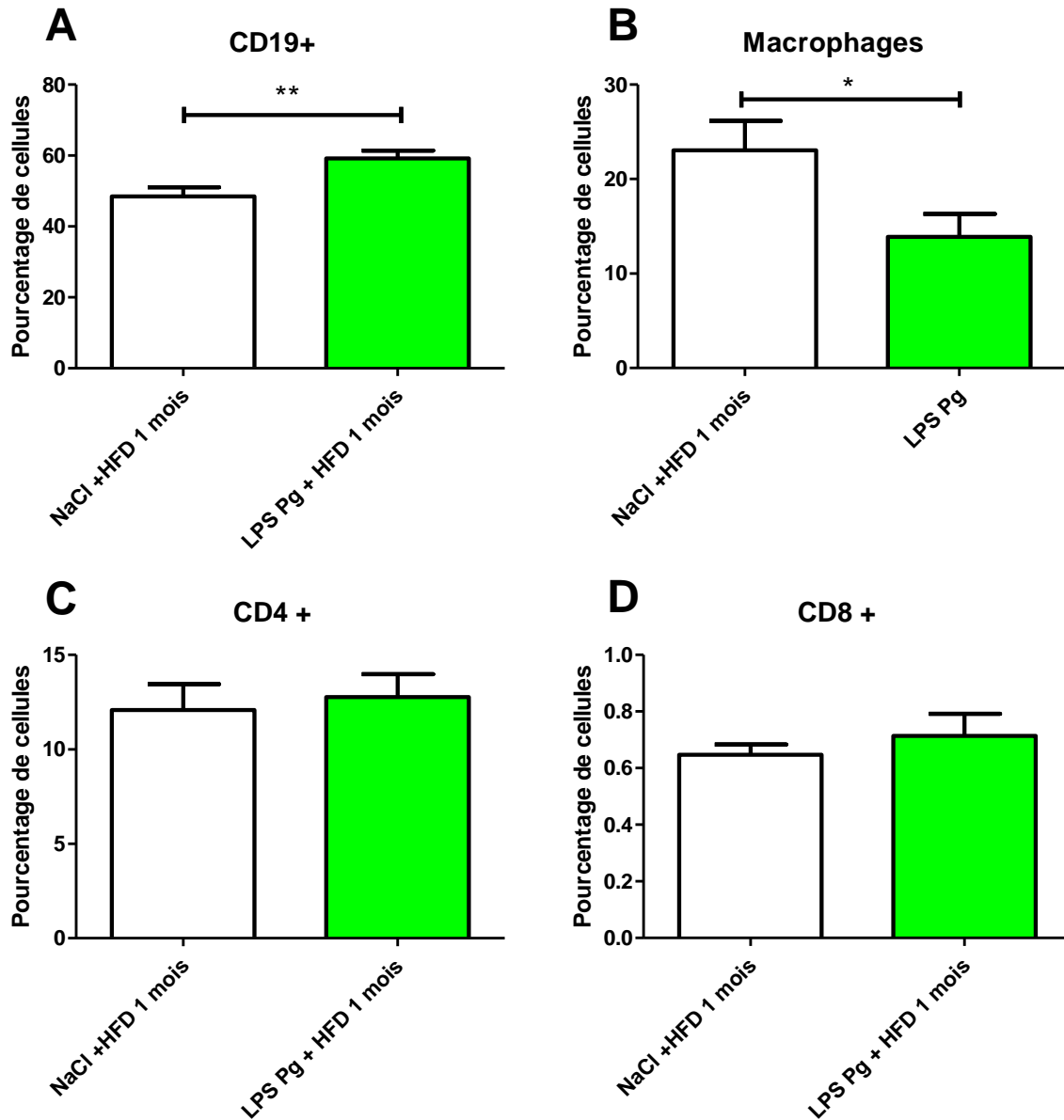
Après 1 mois d'exposition, la diffusion de LPS de Pg altère la composition sanguine immunitaire (**Fig.30 A-D**) en augmentant la proportion de Lymphocytes T 4 (**Fig.30 A**) et en diminuant la proportion de macrophages (**Fig.30 D**). Après 1 mois de régime, l'imprégnation par le LPS de Pg aggrave l'intolérance au glucose (**Fig.31 A**) et l'insulino-résistance (**Fig.31 B**) induite par le HFD. D'autre part, la formule sanguine des souris avec minipompes délivrant du LPS de Pg montre une augmentation significative de lymphocytes B (**Fig.32 A**) et une baisse significative de macrophages par rapport aux contrôles (**Fig.32 B**).



**Figure 30 La diffusion systémique de LPS de *Porphyromonas gingivalis* influence la réponse immunitaire sanguine** Les souris furent implantées par mini-pompes diffusant du LPS de *Porphyromonas gingivalis*. Après 28 jours, la fréquence de B lymphocytes (CD19+) (A), macrophages CD11b+CD11c- (B), CD4 (C) et de CD8 (D) T lymphocytes fut déterminée par cytométrie de flux dans le sang des souris. Les fréquences sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001 (Student's t test)



**Figure 31** La diffusion de LPS de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) aggrave l'intolérance au glucose et l'insulino-résistance induites après 1 mois de HFD A IPGTT (1 g/kg) chez souris nourries par HFD pendant 1 mois(A). D Infusion en glucose durant le clamp euglycémique hyperglycémique chez souris nourries par HFD après mini-pompes diffusant soit une solution véhicule soit du LPS Pg. Les résultats sont représentés en moyenne +/- SEM..



**Figure 32** L'imprégnation de LPS-*Porphyromonas gingivalis* influence la réponse immunitaire sanguine des souris diabétiques. Après 1 mois de régime HFD, la fréquence de B lymphocytes (CD19+) (A), macrophages CD11b+CD11c- (B), CD4 (C) et de CD8 (D) T lymphocytes fut déterminée par cytométrie de flux dans le sang des souris. Les fréquences sont représentées en moyenne  $\pm$  SEM. \*P<0,05 \*\*P<0,01 \*\*\*P<0,001 (Student's t test)

#### IV. Discussion et perspectives en cours

A notre connaissance, ces résultats sont les premiers à suggérer que la maladie parodontale soit un facteur de risque du développement du diabète chez la souris. Notre modèle met bien en évidence une lyse osseuse alvéolaire mandibulaire induite par la colonisation de *Pg*, *Fn* et *Pi* identique aux formes anatomo-cliniques des MP. D'autre part, le système immunitaire semble être le médiateur de la relation entre dysrégulations métaboliques et infection parodontale.

La parodontite est une maladie chronique infectieuse bactérienne à Gram- des tissus de soutien dentaires à manifestation inflammatoire de bas grade [59]. De nombreuses études proposent que la maladie parodontale soit une source de diffusion de médiateurs inflammatoires [91] et de fragments bactériens comme les LPS dans la circulation sanguine [71]. Le maintien du biofilm riche en Gram- pourrait distiller des agents inflammatoires de type LPS [117]. De ce fait, l'infection bactérienne buccale générerait une infection systémique caractérisée par une augmentation du LPS circulant. Cette diffusion bactérienne favoriserait un état inflammatoire chronique à bas grade propice au développement des maladies métaboliques comme le diabète [25]. Comme nous l'avons décrit au cours de cette thèse, l'inflammation via ses cytokines pro-inflammatoires entraîne des altérations du signal de l'insuline. Afin de valider l'hypothèse d'imputabilité des LPS et des marqueurs inflammatoires, nous avons mis en place plusieurs stratégies. Dans un premier temps, nous travaillons sur la validation d'un dosage du LPS sérique dans notre modèle d'atteinte parodontale. En effet, la mise en évidence d'une augmentation de LPS circulant permettrait d'attester du rôle central des bactéries paropathogènes dans cette interaction. Nous souhaitons mettre en place une autre stratégie portant sur la structure du LPS de ces bactéries. En effet, les bactéries présentent des variations de la composition de leur lipide A [141]. Ce lipide porte la partie inflammatoire et les modifications de leur structure peuvent engendrer une réaction immunitaire différente. Cette observation suggère la présence de LPS pro-inflammatoire et des LPS anti-inflammatoire [142]. Or le LPS de *Pg* présente un lipide A penta-acylé conférant des propriétés plutôt anti-inflammatoires. Notre interrogation pose le problème de ce caractère anti-inflammatoire de LPS : représente-il un leurre pour mieux coloniser les tissus ? Est-il une échappatoire au système immunitaire ? Les réponses à ces questions permettraient de comprendre la physiopathologie de la maladie parodontale sur le diabète. Pour cela, nous souhaiterions réaliser l'analyse structurale des LPS de nos bactéries d'intérêt. De plus, nous aimerions réaliser une extraction spécifique de ces LPS afin de tester leur effet sur les cellules immunitaires mises en évidence comme réalisé dans les figures 29-31. Une autre stratégie choisie est une analyse du microbiote parodontal. Cette expérience permettrait de connaître l'impact exact de la colonisation sur la composition du biofilm parodontal. Nous avons mis au point un moyen d'extraire l'ADN bactérien des mandibules. A l'heure actuelle, nous avons adressé les extraits d'ADN à pyroséquencer à la société Research and Testing Laboratory Lubbock Texas qui va réaliser le séquençage de l'ADN extrait afin de nous transmettre une analyse qualitative et semi-quantitative des bactéries présentes dans les échantillons. Les résultats permettront de tester l'hypothèse de modifications du microbiote parodontal. De plus, nous pourrions répondre à nos interrogations sur la possibilité de retrouver *Pg*, *Fn* et *Pi* dans le microbiote parodontal après 3 mois de colonisation. Le changement d'écosystème microbien représente une perturbation de l'homéostasie immunitaire du tissu

parodontal. Les changements d'écosystème sont responsables de phénomène de translocation bactérienne mis en évidence au niveau intestinal dans notre laboratoire [143]. De plus, un microbiote sanguin pathogène a été mis en évidence par pyroséquençage de l'ADN16S. Cette dysbiose est proposée comme biomarqueur des événements métaboliques et cardio-vasculaires [144]. D'autre part, notre laboratoire a mis en évidence la présence de bactéries spécifiques dans les tissus clés du métabolisme appelée microbiote tissulaire [32]. Ce microbiote active le système immunitaire et notamment celui du tissu adipeux et oriente le métabolisme physiologique vers un métabolisme pathologique [90]. Dans cette optique, nous avons prévu une analyse du dosage d'ADN16S dans le foie, les différents tissus adipeux et le muscle. Nous prévoyons aussi une recherche spécifique de nos bactéries dans ces tissus par analyse biomoléculaire et par culture bactérienne.

La maladie parodontale induit une réaction immune loco-régionale [89]. On assiste à une perturbation de la physiologie des ganglions cervicaux en présence d'une maladie parodontale signant un recrutement de cellules immunitaires. Nos résultats mettent en évidence une altération du nombre de ces cellules dans les ganglions cervicaux. De plus, on montre une augmentation du ratio des cellules de l'immunité acquise comme les lymphocytes B, T CD4 et T CD8 au détriment de l'immunité innée. Il a été rapporté que le changement de répertoire antigénique au niveau parodontal active une réponse immunitaire innée dans un premier temps via les PRRs [145]. Cette activation, notamment du complexe CD14/TLR4, met en jeu la voie de signalisation MyD88 et le facteur de transcription NFκB à l'origine de l'expression de cytokines pro inflammatoires comme le TNF-α. De plus, l'activation du complexe CD14/TLR4 induit une altération de la fonction de l'insuline [25]. Une fois l'activation du système inné en place, une réponse chronique avec implication des lymphocytes s'installe dans le tissu parodontal [117].

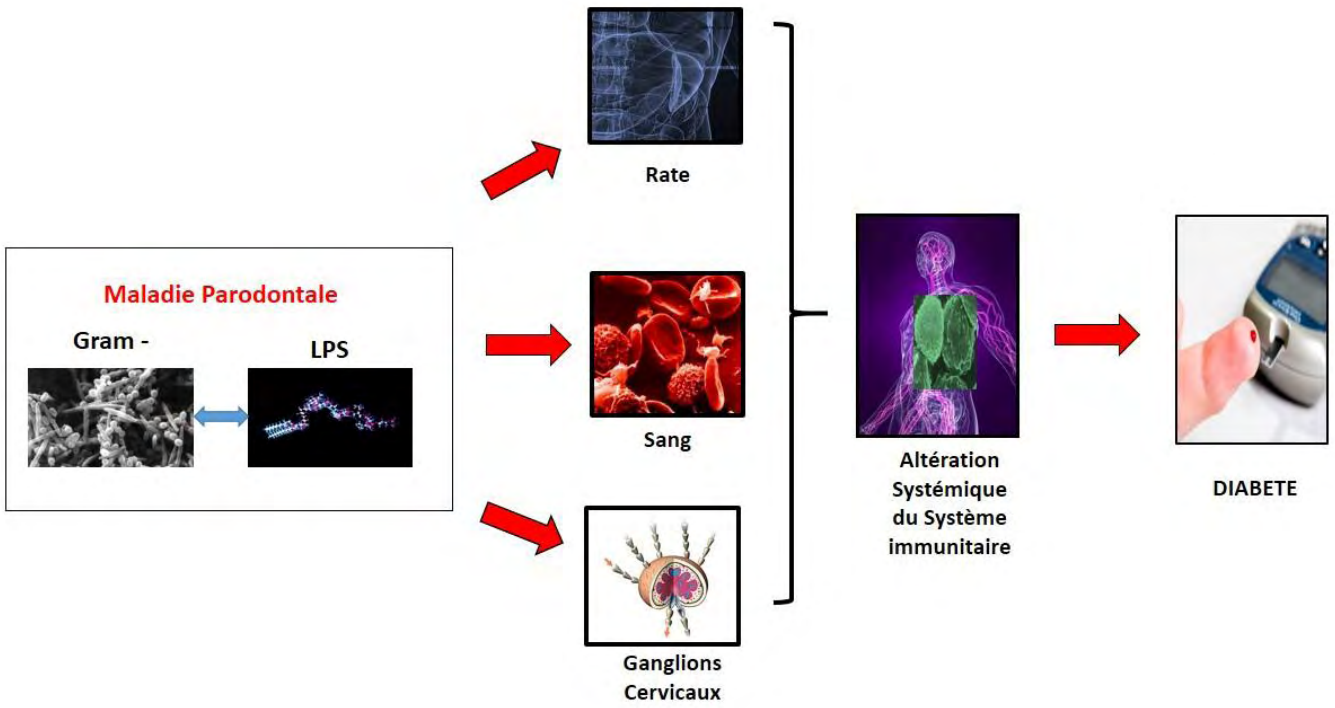
Nos résultats montrent que la maladie parodontale augmente la proportion de lymphocytes B et T dans les ganglions cervicaux. De plus, les analyses montrent la même altération des ratios de lymphocytes B et T au niveau du sang et de la rate. Or, un nouveau concept propose le rôle important des lymphocytes dans le contrôle des maladies métaboliques [146]. Le tissu adipeux de souris obèses est le siège d'un infiltrat pro-inflammatoire de lymphocytes T pouvant signer le stade premier du développement de l'insulino-résistance [37]. Ces lymphocytes CD4 et CD8 composant le tissu adipeux sont à l'origine d'une sécrétion d'IFNγ et de molécules pro-inflammatoires connues pour altérer les voies métaboliques [43]. Parallèlement, Winer et coll. ont montré l'augmentation des lymphocytes B dans le tissu adipeux de souris sous régime gras [44]. L'infiltrat lymphocytaire du tissu adipeux présente un effet délétère sur le métabolisme du glucose via l'activation des voies pro-inflammatoires des macrophages [45]. L'immunité adaptative présente un intérêt particulier dans le contrôle des maladies métaboliques mais l'étiologie de cette infiltration lymphocytaire reste à déterminer. Or, nos résultats suggèrent un effet de la maladie parodontale sur l'orientation de la réponse systémique immunitaire vers une immunité acquise [117]. Pour évaluer le rôle des lymphocytes sur la relation entre MP et diabète, nous prévoyons de réaliser notre protocole d'induction de MP chez des souris Rag, dépourvues de lymphocytes. Les manipulations sont en cours et nous évaluerons sur ce modèle le développement de la maladie parodontale et des paramètres diabétiques après mise en place

du HFD. Nous mettrons en évidence les lymphocytes comme cible potentielle immunitaire dans cette relation. A la vue de ces différents arguments, nous poserons l'hypothèse du rôle central de la réponse du système immunitaire vis à vis microbiotes pathogènes dans un contexte métabolique. Dans ce but, nous avons mis au point, en collaboration avec les immunologistes de notre laboratoire, des modèles de transfert de cellules immunitaires d'une souris donneuse à une souris receveuse. A l'heure actuelle, nous analysons les paramètres diabétiques des souris colonisées par *Pg*, *Fn* et *Pi* ayant préalablement reçues le système immunitaire ganglionnaire sensibilisé à ces bactéries. Dans ce travail, nous posons l'hypothèse que le système immunitaire présente une réponse différente vis-à-vis de *Pg*, *Fn* et *Pi* en fonction d'une rencontre préalable ou non. Cette série d'expériences permettrait de mettre en évidence le rôle régulateur du système immunitaire dans les effets néfastes de la maladie parodontale sur le diabète.

## V. Conclusion

Les arguments de la littérature et nos résultats suggèrent donc un effet délétère de la maladie parodontale sur l'homéostasie glucidique. Les réactions immunitaires adaptatives et innées jouent un rôle central en régulant cette interaction. Ainsi, nous pouvons supposer que la diversité de la réponse immunitaire aux stimuli bactériens pourrait expliquer la variation individuelle de susceptibilité à la maladie parodontale et au développement des maladies métaboliques (résumé dans la figure 33). Par conséquent, un nouveau champ de perspectives préventives et thérapeutiques s'ouvre en ciblant les microbiotes pathogènes et leur interaction avec les maladies métaboliques.





**Figure 33 Schéma résumant les mécanismes moléculaires de l'impact de la maladie parodontale sur le diabète**

## Conclusion et Perspectives Thérapeutiques

Notre travail s'est porté sur la relation entre diabète et maladie parodontale. Nous avons fait le choix d'étudier dans un premier temps l'impact du diabète sur le développement de la MP. Nos résultats mettent en évidence le rôle de l'immunité innée et notamment du récepteur aux LPS. D'autre part, il nous apparaît intéressant de se positionner sur les facteurs de risques des maladies métaboliques. C'est ainsi que nous avons travaillé sur l'impact de la maladie parodontale dans le développement de l'insulino-résistance. Nous avons constaté l'effet délétère de cette infection bactérienne sur le diabète. Le système immunitaire local et systémique est dérégulé par cette atteinte buccale et prédispose à l'émergence du diabète. Nous comprenons donc qu'il existe un cercle vicieux auto-entretenu délétère entre ces 2 pathologies avec le système immunitaire comme régulateur.

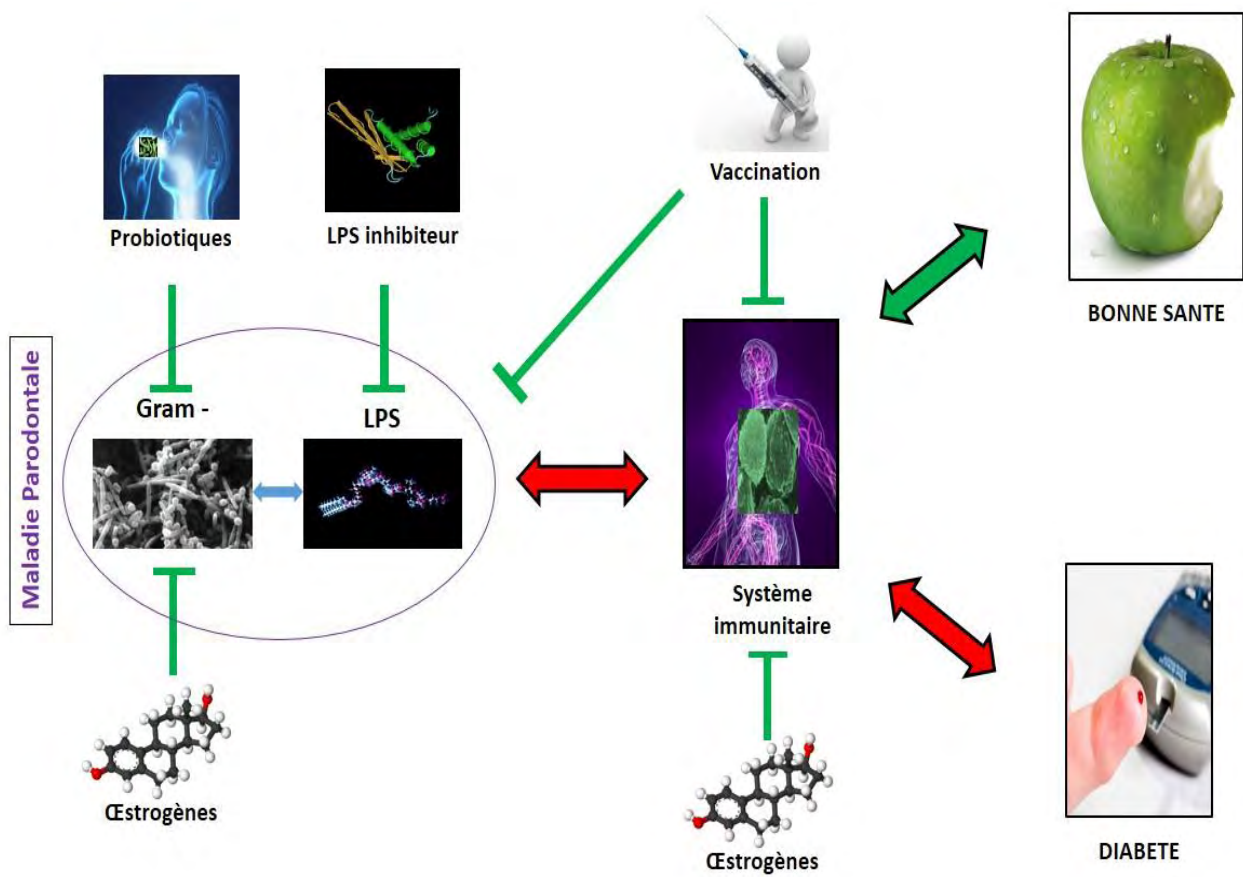
Notre question de praticien de santé est de mettre en place des thérapeutiques innovantes pour résoudre ce problème épidémiologique. Notre première partie met en évidence le rôle bénéfique des E2 sur la maladie parodontale. Ainsi, nous pourrions envisager la mise en place de thérapeutiques par patch relarguant des E2 dans les lésions parodontales chez les patients diabétiques. En effet, nous avons mis en évidence à la fois l'effet anti-inflammatoire mais aussi l'effet « bactéricide ou bactériostatique » des E2 sur le microbiote parodontal. Il serait donc intéressant de mettre en place une cohorte de patients diabétiques : un groupe recevrait un traitement par patch E2 dans leurs lésions parodontales et un groupe un traitement traditionnel parodontal. Notre objectif serait d'étudier la résolution du problème parodontal dans un contexte de désordres glucidiques systémiques.

Les médecines actuelles tendent vers la mise en place de moyens de prévention des maladies. Dans ce but, il faut prendre en compte les facteurs de risques et les bio-marqueurs de ces pathologies systémiques. Nos travaux mettent en évidence que la maladie parodontale à travers ses bactéries et son altération immunitaire représente un facteur de risque des désordres métaboliques. Notre objectif est donc de prévenir l'interaction entre ces 2 pathologies en amont. Nous pouvons agir en premier lieu sur les thérapeutiques visant à orienter les microbiotes comme les pré ou probiotiques. Dans la maladie parodontale, il existe des techniques de maintenance par probiotiques mais elles ne présentent pas un réel résultat. Nous pouvons trouver l'explication dans le fait que la maladie est déjà installée quand on met en place le probiotique. Pour contrecarrer ce biais, nous pourrions réaliser un screening initial des microbiotes parodontaux des patients. Les microbiotes présentant un pourcentage élevé de paro-pathogènes présentent un facteur de risque au diabète. Ainsi, la mise en place de probiotiques permettrait de réguler la composition du microbiote parodontal et l'apparition de la maladie systémique.

Nous avons également mis en évidence le rôle du système immunitaire dans ce cercle vicieux. Nous sommes face à une pathologie avec une étiologie bactérienne connue. Nous pourrions naturellement proposer des stratégies vaccinales pour prévenir l'apparition de maladie parodontale chez les sujets à risque. L'autre thérapeutique préventive envisageable est chez les patients atteints de maladie parodontale. La littérature atteste l'échec des techniques de réorientation du microbiote. En revanche, nos résultats suggèrent le rôle pilote du système immunitaire. Dans cette voie, nous pourrions mettre en place des techniques

d'orientation du système immunitaire. En effet après avoir caractérisé les cellules immunitaires délétères, nous pourrions réorienter les cellules immunitaires vers un profil protecteur. De plus, une méthode par les LPS binding protéine pourrait être mise en place. En effet, nous bloquerions le transport systémique des molécules antigéniques bactériennes et cette technique protégerait du développement d'une inflammation dans les organes métaboliques prédisposant aux maladies métaboliques.

Le champ de perspectives cliniques est grand (Figure 34) et permet d'envisager un avenir à des recherches fondamentales permettant de valider ces concepts chez le petit animal. Nous nous efforcerons de confronter ces nouvelles hypothèses afin de disséquer les mécanismes.



**Figure 34 Perspectives thérapeutiques dans la relation entre maladie parodontale et diabète**

## Bibliographies

1. Sherwin R, Jastreboff AM (2012) Year in diabetes 2012: The diabetes tsunami. *J Clin Endocrinol Metab* 97: 4293-4301.
2. Bonaldi C, Vernay M, Roudier C, Salanave B, Oleko A, et al. (2011) A first national prevalence estimate of diagnosed and undiagnosed diabetes in France in 18- to 74-year-old individuals: the French Nutrition and Health Survey 2006/2007. *Diabet Med* 28: 583-589.
3. Ferrannini E (2012) Physiology of glucose homeostasis and insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes. *Endocrinol Metab Clin North Am* 41: 25-39.
4. Schenkels LC, Veerman EC, Nieuw Amerongen AV (1995) Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med* 6: 161-175.
5. Sanchez G, Miozza V, Delgado A, Busch L (2012) Relationship between salivary mucin or amylase and the periodontal status. *Oral Dis*.
6. Baik JE, Hong SW, Choi S, Jeon JH, Park OJ, et al. (2013) Alpha-amylase is a human salivary protein with affinity to lipopolysaccharide of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Mol Oral Microbiol* 28: 142-153.
7. Barrett ML, Udani JK (2011) A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr J* 10: 24.
8. Liou AP, Paziuk M, Luevano JM, Jr., Machineni S, Turnbaugh PJ, et al. (2013) Conserved shifts in the gut microbiota due to gastric bypass reduce host weight and adiposity. *Sci Transl Med* 5: 178ra141.
9. Mouzaki M, Allard JP (2012) The role of nutrients in the development, progression, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Gastroenterol* 46: 457-467.
10. Leto D, Saltiel AR (2012) Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 383-396.
11. Bouche C, Serdy S, Kahn CR, Goldfine AB (2004) The cellular fate of glucose and its relevance in type 2 diabetes. *Endocr Rev* 25: 807-830.
12. Khan AH, Pessin JE (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* 45: 1475-1483.
13. Piya MK, McTernan PG, Kumar S (2013) Adipokine inflammation and insulin resistance: the role of glucose, lipids and endotoxin. *J Endocrinol* 216: T1-T15.
14. Sakamoto K, Holman GD (2008) Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295: E29-37.
15. Martin-Gronert MS, Ozanne SE (2012) Metabolic programming of insulin action and secretion. *Diabetes Obes Metab* 14 Suppl 3: 29-39.
16. Hocking S, Samocho-Bonet D, Milner KL, Greenfield JR, Chisholm DJ (2013) Adiposity and Insulin Resistance in Humans: The Role of the Different Tissue and Cellular Lipid Depots. *Endocr Rev*.
17. Badaut J, Brunet JF, Guerin C, Regli L, Pellerin L (2012) Alteration of glucose metabolism in cultured astrocytes after AQP9-small interference RNA application. *Brain Res* 1473: 19-24.
18. Bhat VK, Kerr BD, Vasu S, Flatt PR, Gault VA (2013) A DPP-IV-resistant triple-acting agonist of GIP, GLP-1 and glucagon receptors with potent glucose-lowering and insulinotropic actions in high-fat-fed mice. *Diabetologia*.
19. Di Dalmazi G, Pagotto U, Pasquali R, Vicennati V (2012) Glucocorticoids and type 2 diabetes: from physiology to pathology. *J Nutr Metab* 2012: 525093.
20. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793-1801.
21. Prentki M, Nolan CJ (2006) Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116: 1802-1812.
22. Froguel P (1996) Glucokinase and MODY: from the gene to the disease. *Diabet Med* 13: S96-97.
23. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3: S405-413.

24. Cusi K (2012) Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 142: 711-725 e716.
25. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761-1772.
26. Gorden P, Zadeh ES, Cochran E, Brown RJ (2012) Syndromic insulin resistance: models for the therapeutic basis of the metabolic syndrome and other targets of insulin resistance. *Endocr Pract* 18: 763-771.
27. Hosoi T, Yokoyama S, Matsuo S, Akira S, Ozawa K (2010) Myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-deficiency increases risk of diabetes in mice. *PLoS One* 5.
28. Shulman GI (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 106: 171-176.
29. Gautier A, Balkau B, Lange C, Tichet J, Bonnet F, et al. (2010) Risk factors for incident type 2 diabetes in individuals with a BMI of <27 kg/m<sup>2</sup>: the role of gamma-glutamyltransferase. Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetologia* 53: 247-253.
30. Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA (1963) The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
31. Kolb H, Eizirik DL (2012) Resistance to type 2 diabetes mellitus: a matter of hormesis? *Nat Rev Endocrinol* 8: 183-192.
32. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J (2011) Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 48: 257-273.
33. Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860-867.
34. Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM (1995) Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415.
35. Hotamisligil GS (2005) Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes* 54 Suppl 2: S73-78.
36. Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, et al. (2002) Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2084-2089.
37. Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, et al. (2009) CD8<sup>+</sup> effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med* 15: 914-920.
38. Orr JS, Puglisi MJ, Ellacott KL, Lumeng CN, Wasserman DH, et al. (2012) Toll-like receptor 4 deficiency promotes the alternative activation of adipose tissue macrophages. *Diabetes* 61: 2718-2727.
39. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR (2007) Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 117: 175-184.
40. Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
41. Tremaroli V, Backhed F (2012) Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489: 242-249.
42. Lumeng CN, Maillard I, Saltiel AR (2009) T-ing up inflammation in fat. *Nat Med* 15: 846-847.
43. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, et al. (2010) Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 185: 1836-1845.
44. Winer DA, Winer S, Shen L, Wadia PP, Yantha J, et al. (2011) B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat Med* 17: 610-617.
45. Zuniga LA, Shen WJ, Joyce-Shaikh B, Pyatnova EA, Richards AG, et al. (2010) IL-17 regulates adipogenesis, glucose homeostasis, and obesity. *J Immunol* 185: 6947-6959.
46. Delzenne NM, Neyrinck AM, Cani PD (2013) Gut microbiota and metabolic disorders: How prebiotic can work? *Br J Nutr* 109 Suppl 2: S81-85.

47. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, et al. (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11070-11075.
48. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, et al. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 1: 6ra14.
49. Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213-223.
50. Serino M, Blasco-Baque V, Burcelin R (2012) Microbes on-air: gut and tissue microbiota as targets in type 2 diabetes. *J Clin Gastroenterol* 46 Suppl: S27-28.
51. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, et al. (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87: 1219-1223.
52. Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R (2008) Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)* 56: 305-309.
53. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470-1481.
54. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW (2005) Periodontal diseases. *Lancet* 366: 1809-1820.
55. Savitt ED, Kent RL (1991) Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by subject age. *J Periodontol* 62: 490-494.
56. Kassab P, Colombier ML, Kaminski M, Lelong N, Sixou M, et al. (2011) Impact of periodontitis definition in epidemiological research. Results from the EPIPAP study in postpartum women. *Eur J Oral Sci* 119: 156-162.
57. Azogui-Levy S, Dray-Spira R (2012) Sociodemographic factors associated with the dental health of persons with diabetes in France. *Spec Care Dentist* 32: 142-149.
58. Beikler T, Flemmig TF (2011) Oral biofilm-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures. *Periodontol 2000* 55: 87-103.
59. Laine ML, Crielaard W, Loos BG (2012) Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000* 58: 37-68.
60. Griffiths GS, Wilton JM, Curtis MA, Maiden MF, Gillett IR, et al. (1988) Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases. Clinical assessment of the periodontium. *J Clin Periodontol* 15: 403-410.
61. Krejci CB (1996) Osteoporosis and periodontal disease: is there a relationship? *J West Soc Periodontol Periodontal Abstr* 44: 37-42.
62. Van der Velden U, Kuzmanova D, Chapple IL (2011) Micronutritional approaches to periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 38 Suppl 11: 142-158.
63. Xing N, ML LM, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R, et al. (2002) Distinctive dendritic cell modulation by vitamin D(3) and glucocorticoid pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 645-652.
64. Andres E, Noel E, Kaltenbach G, Noblet-Dick M, Groupe d'etude des carences en vitamine B12 (2002) [Vitamin B12 deficiencies in adults: current data]. *Ann Biol Clin (Paris)* 60: 744-745.
65. Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, Leeman S (2007) Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20466-20471.
66. Borrell LN, Papananou PN (2005) Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6: 132-158.
67. Doyle CJ, Bartold PM (2012) How does stress influence periodontitis? *J Int Acad Periodontol* 14: 42-49.
68. Shields WD (1977) Acute necrotizing ulcerative gingivitis. A study of some of the contributing factors and their validity in an Army population. *J Periodontol* 48: 346-349.
69. Freestone PP, Sandrini SM, Haigh RD, Lyte M (2008) Microbial endocrinology: how stress influences susceptibility to infection. *Trends Microbiol* 16: 55-64.

70. Feitosa DS, Marques MR, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr., et al. (2009) The influence of thyroid hormones on periodontitis-related bone loss and tooth-supporting alveolar bone: a histological study in rats. *J Periodontol* 44: 472-478.
71. Saito T, Shimazaki Y (2007) Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol* 2000 43: 254-266.
72. Angst PD, Dutra DA, Moreira CH, Kantorski KZ (2012) Periodontal status and its correlation with haematological parameters in patients with leukaemia. *J Clin Periodontol* 39: 1003-1010.
73. Patton L, Ramirez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Nittayananta W, Carrozzo M, et al. (2013) Urban legends series: oral manifestations of HIV infection. *Oral Dis*.
74. Mongardini C, van Steenberghe D, Dekeyser C, Quirynen M (1999) One stage full- versus partial-mouth disinfection in the treatment of chronic adult or generalized early-onset periodontitis. I. Long-term clinical observations. *J Periodontol* 70: 632-645.
75. Lee J, Taneja V, Vassallo R (2012) Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* 91: 142-149.
76. Brook I (2011) The impact of smoking on oral and nasopharyngeal bacterial flora. *J Dent Res* 90: 704-710.
77. Mathews SA, Kurien BT, Scofield RH (2008) Oral manifestations of Sjogren's syndrome. *J Dent Res* 87: 308-318.
78. Berezow AB, Darveau RP (2011) Microbial shift and periodontitis. *Periodontol* 2000 55: 36-47.
79. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS (2012) The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis* 18: 109-120.
80. Rosan B, Lamont RJ (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect* 2: 1599-1607.
81. Nishihara T, Koseki T (2004) Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000 36: 14-26.
82. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M (2005) Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 20: 244-252.
83. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y (2002) Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 841-849.
84. Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N (2012) Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 47: 470-478.
85. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, et al. (2012) Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 12: 16.
86. Guan SM, He JJ, Zhang M, Shu L (2011) *Prevotella intermedia* stimulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 expression via multiple signaling pathways in human periodontal ligament cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 91-100.
87. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C (1998) Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun* 66: 4729-4732.
88. Mandell RL, Socransky SS (1981) A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol* 52: 593-598.
89. Zelkha SA, Freilich RW, Amar S (2010) Periodontal innate immune mechanisms relevant to atherosclerosis and obesity. *Periodontol* 2000 54: 207-221.
90. Neish AS (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136: 65-80.
91. Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, et al. (2012) Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 55: 21-31.
92. Yamazaki K, Yoshie H, Seymour GJ (2003) T cell regulation of the immune response to infection in periodontal diseases. *Histol Histopathol* 18: 889-896.
93. Taubman MA, Kawai T (2001) Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 12: 125-135.



94. Nishimura S, Manabe I, Nagai R (2009) Adipose tissue inflammation in obesity and metabolic syndrome. *Discov Med* 8: 55-60.
95. Baughman R, MacMenomay A, Digney M (1999) Diagnostic quiz #33. Case no. 2. Chronic periodontitis. *Today's FDA* 11: 5C, 7C.
96. (!!! INVALID CITATION !!!).
97. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5: 953-964.
98. Hung SL, Lee NG, Chang LY, Chen YT, Lai YL (2013) Stimulatory Effects of Glucose and Lipopolysaccharide of *Porphyromonas Gingivalis* on the Secretion of Inflammatory Mediators From Human Macrophages. *J Periodontol*.
99. Blaizot A, Vergnes JN, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M (2009) Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *Int Dent J* 59: 197-209.
100. Blasco-Baque V, Kemoun P, Loubieres P, Roumieux M, Heymes C, et al. [Impact of periodontal disease on arterial pressure in diabetic mice.]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*.
101. Robert AA, Rass MD, Al-Zoman KH, Al-Sohail AM, Alsuwyed AS, et al. (2010) Determinants of periodontopathogens in microbiological monitoring of diabetic patients with periodontitis. *Saudi Med J* 31: 1044-1048.
102. Ford PJ, Gemmell E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, et al. (2006) Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistologic study. *Oral Microbiol Immunol* 21: 206-211.
103. Lee HR, Jun HK, Kim HD, Lee SH, Choi BK *Fusobacterium nucleatum* GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(-/-) mice. *Mol Oral Microbiol* 27: 109-123.
104. Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, et al. (2011) Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4592-4598.
105. Javed F, Al-Askar M, Al-Hezaimi K (2012) Cytokine profile in the gingival crevicular fluid of periodontitis patients with and without type 2 diabetes: a literature review. *J Periodontol* 83: 156-161.
106. Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, et al. (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109-2117.
107. Krejci CB, Bissada NF (2002) Women's health issues and their relationship to periodontitis. *J Am Dent Assoc* 133: 323-329.
108. Haas AN, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C (2009) Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. *J Periodontol* 80: 1380-1387.
109. Tarkkila L, Kari K, Furuholm J, Tiitinen A, Meurman JH (2010) Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and post-menopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. *BMC Oral Health* 10: 10.
110. Chan EC, McLaughlin R (2000) Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 15: 1-9.
111. Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Houry-Haddad Y, Shapira L (2005) Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol* 76: 1282-1286.
112. Willershausen B, Haas G, Krummenauer F, Hohenfellner K (2004) Relationship between high weight and caries frequency in German elementary school children. *Eur J Med Res* 9: 400-404.
113. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Berge M, et al. (2012) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61: 543-553.
114. Shin JA, Lee JH, Kim HS, Choi YH, Cho JH, et al. (2012) Prevention of diabetes: a strategic approach for individual patients. *Diabetes Metab Res Rev* 28 Suppl 2: 79-84.
115. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, et al. (1997) Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 68: 127-135.

116. Sahingur SE, Xia XJ, Alamgir S, Honma K, Sharma A, et al. (2010) DNA from *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythia* induce cytokine production in human monocytic cell lines. *Mol Oral Microbiol* 25: 123-135.
117. Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, Leung WK, Jin L (2009) The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 36: 619-626.
118. Krejci CB, Bissada NF (2012) Women's Health: Periodontitis and its Relation to Hormonal Changes, Adverse Pregnancy Outcomes and Osteoporosis. *Oral Health Prev Dent* 10: 83-92.
119. Oh TJ, Eber R, Wang HL (2002) Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol* 29: 400-410.
120. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol* 30: 671-681.
121. Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, et al. (2008) Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 180: 7980-7988.
122. Arnal JF, Laurell H, Lenfant F, Douin-Echinard V, Bouchet L, et al. (2006) Estradiol action in atherosclerosis and reendothelialization. *Ernst Schering Found Symp Proc*: 69-86.
123. Corcoran MP, Meydani M, Lichtenstein AH, Schaefer EJ, Dillard A, et al. (2010) Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J Endocrinol* 206: 217-224.
124. Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, et al. (2011) Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One* 6: e20240.
125. Mirza BA, Syed A, Izhar F, Ali Khan A (2010) Bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease: review of evidence. *J Pak Med Assoc* 60: 766-768.
126. Balkau B, Bouee S, Avignon A, Verges B, Chartier I, et al. (2012) Type 2 diabetes treatment intensification in general practice in France in 2008-2009: the DIAttitude Study. *Diabetes Metab* 38 Suppl 3: S29-35.
127. Albandar JM, Rams TE (2002) Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontol* 2000 29: 7-10.
128. D'Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, et al. (2008) Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3989-3994.
129. Vergnes JN (2010) Treating periodontal disease may improve metabolic control in diabetics. *Evid Based Dent* 11: 73-74.
130. Borrell LN, Kunzel C, Lamster I, Lalla E (2007) Diabetes in the dental office: using NHANES III to estimate the probability of undiagnosed disease. *J Periodontal Res* 42: 559-565.
131. Darre L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M (2008) Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: A meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab* 34: 497-506.
132. Hettne KM, Weeber M, Laine ML, ten Cate H, Boyer S, et al. (2007) Automatic mining of the literature to generate new hypotheses for the possible link between periodontitis and atherosclerosis: lipopolysaccharide as a case study. *J Clin Periodontol* 34: 1016-1024.
133. Rodrigues PH, Reyes L, Chadda AS, Belanger M, Wallet SM, et al. (2012) *Porphyromonas gingivalis* strain specific interactions with human coronary artery endothelial cells: a comparative study. *PLoS One* 7: e52606.
134. Reichert S, Haffner M, Keysser G, Schafer C, Stein J, et al. (2013) Detection of oral bacterial DNA in synovial fluid. *J Clin Periodontol*.
135. Michaud DS, Izard J, Wilhelm-Benartzi CS, You DH, Grote VA, et al. (2012) Plasma antibodies to oral bacteria and risk of pancreatic cancer in a large European prospective cohort study. *Gut*.

136. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, Ao M, et al. (2013) Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol*.
137. Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, Sugimoto H, Shikata K, et al. (2001) The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 72: 774-778.
138. Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes JN, Riant E, Loubieres P, et al. (2012) High-fat diet induces periodontitis in mice through lipopolysaccharides (LPS) receptor signaling: protective action of estrogens. *PLoS One* 7: e48220.
139. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G (2008) The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 35: 89-105.
140. Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, et al. (2010) Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. *Endocrinology* 151: 5103-5113.
141. Herath TD, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang CY, Wang Y, et al. (2013) Tetra- and Penta-Acylated Lipid A Structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS Differentially Activate TLR4-Mediated NF-kappaB Signal Transduction Cascade and Immuno-Inflammatory Response in Human Gingival Fibroblasts. *PLoS One* 8: e58496.
142. Gomery K, Muller-Loennies S, Brooks CL, Brade L, Kosma P, et al. (2012) Antibody WN1 222-5 mimics Toll-like receptor 4 binding in the recognition of LPS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 20877-20882.
143. Amar J, Chabo C, Waget A, Klopp P, Vachoux C, et al. (2011) Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. *EMBO Mol Med* 3: 559-572.
144. Amar J, Lange C, Payros G, Garret C, Chabo C, et al. (2013) Blood microbiota dysbiosis is associated with the onset of cardiovascular events in a large general population: the D.E.S.I.R. study. *PLoS One* 8: e54461.
145. Sahingur SE, Xia XJ, Gunsolley J, Schenkein HA, Genco RJ, et al. (2011) Single nucleotide polymorphisms of pattern recognition receptors and chronic periodontitis. *J Periodontal Res* 46: 184-192.
146. Mathis D, Shoelson SE (2011) Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol* 11: 81.

## Résumé

L'évolution du mode de vie, et plus précisément les alimentations de plus en plus riches, contribue à l'incidence croissante du diabète de type 2 dans le monde. De nouveaux concepts proposent l'implication des microbiotes bactériens dans le développement des maladies métaboliques. Or la cavité buccale est un environnement bactérien avec 100 millions de bactéries par millilitre de salive. De ce fait, nous nous sommes centrés sur une pathologie infectieuse bactérienne particulière à manifestation inflammatoire : la maladie parodontale. Les études épidémiologiques montrent une association entre maladie métabolique et diabète sans explications biologiques. De ce fait, nous avons voulu étudier les mécanismes liant ces 2 pathologies. Dans ce but, nous avons réalisé 2 approches expérimentales :

- Dans une première approche, nous avons voulu étudier l'impact de l'état diabétique sur le parodonte. Nous avons montré que l'alimentation grasse induit le développement de la maladie parodontale via le récepteur aux LPS. De plus, la supplémentation par des œstrogènes présente un effet protecteur sur le développement du microbiote parodontal pathogène et l'inflammation parodontale. Ces résultats furent publiés dans la revue PlosOne en Novembre 2012.
- Dans la deuxième approche, nous avons proposé que la maladie parodontale soit un facteur de risque du diabète. Nous avons mis au point un modèle de maladie parodontale chez la souris et l'avons soumis à un stress nutritif. Nous avons constaté que cette pathologie buccale impactait la tension artérielle (publié dans Annales de cardiologie et d'angéiologie en Juin 2012), le bilan lipidique, l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. De plus, nous avons montré que le système immunitaire était affecté par la maladie parodontale et présentait un lien avec la gravité de l'état diabétique. Ces travaux sont en cours de finalisation pour être soumis dans une revue internationale.

La définition du lien entre la maladie parodontale et le diabète présente une voie importante de perspectives de recherche à la fois fondamentale et clinique.

The pandemic extent of Type 2 Diabetes (T2D) is thought to arise from the increased fat-to-fiber ratio in our diet. This aspect strongly impacts on gut microbiota, whose modifications are associated and causally linked to metabolic diseases. Beyond the gut, the mouth also harbors millions of bacteria per ml of saliva and modifications of this bacterial ecosystem are associated to oral diseases. In particular, we focused on gingival microbiota, in which an increase of gram negative bacteria leads to increased inflammation and defines the periodontal disease (PD). Despite epidemiological studies show an association between metabolic and periodontal diseases, the biological and molecular mechanism linking the two pathologies are poorly understood.

To shed light into this domain, we aimed at studying:

- 1- The impact of T2D on periodontal tissue
- 2- Whether periodontal diseases may represent a risk factor for T2D

In the first study we showed that a high-fat diet (HFD), a strong inducer of T2D and metabolic diseases, also triggers periodontal diseases via lipopolisaccharides co-receptor CD14. Moreover, estrogens supplementation, already shown to affect the development of periodontal diseases, prevented the overgrowth of periopathogens, reducing buccal inflammation. These results have been recently published on *PLoS ONE* (Nov. 2012).

In the second study, we set up a murine model of PD and we treated these mice with a high-fat diet. Our results show that periodontal disease affects blood pressure (published in *Annales de Cardiologie et d'Angéiologie*, Jun 2012), the blood and liver lipid profile, glucose-tolerance and insulin-sensitivity. Moreover, circulating as well as cervical lymphnode and spleen immune cells were affected in a manner correlated to T2D severity. A manuscript describing these results is in-progress to be submitted for publication in an international review.

Hence, understanding the molecular mechanism linking T2D and PD represents an important perspective for both basic and clinical research.

## **Annexe Articles**

# High-Fat Diet Induces Periodontitis in Mice through Lipopolysaccharides (LPS) Receptor Signaling: Protective Action of Estrogens

Vincent Blasco-Baque<sup>1,2,3</sup>, Matteo Serino<sup>1,2</sup>, Jean-Noël Vergnes<sup>3</sup>, Elodie Riant<sup>1,2</sup>, Pascale Loubieres<sup>1,2,3</sup>, Jean-François Arnal<sup>1,2</sup>, Pierre Gourdy<sup>1,2</sup>, Michel Sixou<sup>3</sup>, Rémy Burcelin<sup>1,2\*</sup>, Philippe Kemoun<sup>3\*</sup>

**1** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Toulouse, France, **2** Université Paul Sabatier, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1048, Institut de Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse, France, **3** L.U. 51, Parodontites et Maladies Générales, Université Paul Sabatier, Faculté de Chirurgie Dentaire, 3, Chemin des Maraîchers, Toulouse, France

## Abstract

**Background:** A fat-enriched diet favors the development of gram negative bacteria in the intestine which is linked to the occurrence of type 2 diabetes (T2D). Interestingly, some pathogenic gram negative bacteria are commonly associated with the development of periodontitis which, like T2D, is characterized by a chronic low-grade inflammation. Moreover, estrogens have been shown to regulate glucose homeostasis *via* an LPS receptor dependent immune-modulation. In this study, we evaluated whether diet-induced metabolic disease would favor the development of periodontitis in mice. In addition, the regulatory role of estrogens in this process was assessed.

**Methods:** Four-week-old C57BL6/J WT and CD14 (part of the TLR-4 machinery for LPS-recognition) knock-out female mice were ovariectomised and subcutaneously implanted with pellets releasing either placebo or 17 $\beta$ -estradiol (E2). Mice were then fed with either a normal chow or a high-fat diet for four weeks. The development of diabetes was monitored by an intraperitoneal glucose-tolerance test and plasma insulin concentration while periodontitis was assessed by identification of pathogens, quantification of periodontal soft tissue inflammation and alveolar bone loss.

**Results:** The fat-enriched diet increased the prevalence of periodontal pathogenic microbiota like *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*, gingival inflammation and alveolar bone loss. E2 treatment prevented this effect and CD14 knock-out mice resisted high-fat diet-induced periodontal defects.

**Conclusions/Significance:** Our data show that mice fed with a diabetogenic diet developed defects and microflora of tooth supporting-tissues typically associated with periodontitis. Moreover, our results suggest a causal link between the activation of the LPS pathway on innate immunity by periodontal microbiota and HFD-induced periodontitis, a pathophysiological mechanism that could be targeted by estrogens.

**Citation:** Blasco-Baque V, Serino M, Vergnes J-N, Riant E, Loubieres P, et al. (2012) High-Fat Diet Induces Periodontitis in Mice through Lipopolysaccharides (LPS) Receptor Signaling: Protective Action of Estrogens. PLoS ONE 7(11): e48220. doi:10.1371/journal.pone.0048220

**Editor:** Massimo Federici, University of Tor Vergata, Italy

**Received:** July 5, 2012; **Accepted:** September 21, 2012; **Published:** November 2, 2012

**Copyright:** © 2012 Blasco-Baque et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Société Française d'Hypertension Artérielle and from the Société Francophone de Diabète. Part of this work is supported by a European grant from the Framework program 7 (FlorinashNo 241913) to RB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: remy.burcelin@inserm.fr (RB); philippe.kemoun@wanadoo.fr (PK)

## Introduction

The prevalence of Type 2 diabetes (T2D) has dramatically increased over the past decade both in developed and developing countries. Furthermore, the complications of this metabolic disease are nowadays major causes of morbidity and mortality [1]. The pathophysiology of T2D is characterized by a low-grade chronic inflammation [2], with the release of inflammatory cytokines by innate immune cells, mainly macrophages and dendritic cells, that impair insulin action [3]. It was recently suggested that the intestinal microbiota contributes to the development of obesity and insulin-resistance [4,5]. A switch from a normal diet towards a fat-enriched diet, where the daily amount of dietary fibers is reduced, was associated with a change in the ecology of the intestinal

microbiota [6,7] with an increase in gram-negative bacteria. The activation of the immune system by gram-negative bacteria depends on specific pattern recognition receptors (PRRs) such as Cluster of differentiation 14/Toll-like receptor-4 (CD14/TLR4) [8]. CD14/TLR4 knockout mice are protected against the metabolic impact of a high-fat diet (HFD) [4]. Hence, the interaction among gram-negative pathogens and the immune system is a key factor for the development of metabolic diseases [4,9]. Interestingly, periodontitis, a chronic infection of the soft and hard tissues supporting the tooth, is caused by gram-negative capnophilic bacteria [10]. This disease is characterised by an inflammation and a loss of both soft and hard tissues of the periodontium (e.g. the periodontal tissues) that protect the roots of the tooth and anchor them to the jaws. Most pathogens involved

in periodontitis have been identified, and many of them are also known to be involved in metabolic diseases [5] and many systemic diseases [11,12]. *Prevotella intermedia* (Pi) is a key periodontal pathogen inducing innate immune responses partly involved in deep periodontal tissues destruction [13]. The frequency of Pi detection in the periodontal pocket is higher in diabetic than in healthy subjects [14]. Another periopathogen, *Fusobacterium nucleatum* (Fn), was detected in human carotid endarterectomy specimens and is thought to exert atherogenic effects [15]. Apolipoprotein E knockout mice (ApoE<sup>-/-</sup>) infected by Fn display increased lipid depots in the arterial wall compared with controls [16]. Indeed, Fn systemic infection increases plasma levels of total cholesterol and LDL [17]. Thus, it can be postulated that diet-induced metabolic diseases may favor the development of periodontitis.

We recently showed that estrogens are key players in the control of metabolic diseases involving immune regulation [18]. Furthermore, numerous epidemiological studies strongly suggest that estrogen deficiency is linked to the appearance of periodontal diseases (PD) [19]. As previously reported, a significant increase in the incidence of PD is associated with the menopause, which is considered as the main physiological cause of estrogen depletion [20,21,22]. Moreover, it has been suggested that hormonal replacement therapy can protect menopausal women against periodontitis [23]. However, the influence of these sexual steroid hormones on the occurrence of PD in a dysmetabolic and inflammatory context has not been addressed to date.

In this study, we investigated whether a high-fat diet, known to induce inflammation-mediated insulin-resistance and glucose-intolerance, as previously described [18], would promote the development of PD in ovariectomised mice, and whether estrogen administration would regulate this process. Our data reported herein demonstrate that HFD-induced metabolic disturbances were associated with the occurrence of periodontitis, and that chronic estrogen administration, as well as the deletion of CD14, strongly prevents the HFD-induced defects of periodontal tissue in mice.

## Materials and Methods

### Ethical Statement

All animal experimental procedures were approved by the local ethical committee of Rangueil University Hospital, INSERM BP 84225, 31432 Toulouse under the authorization number “C 31 555 07”, and the Ethical committee of Purpan Hospital (Toulouse).

### Animals and Experimental Procedures

C57BL6/J wild-type (WT) (Charles River, L'Arbres, France) and CD14-deficient (CD14KO) female mice born in our animal facilities were group-housed (five mice per cage) in a specific pathogen-free controlled environment (inverted 12-hr daylight cycle, light off at 10:00 a.m.). Four week-old mice were ovariectomised (OVX) and then subcutaneously implanted with pellets releasing either placebo or 17 $\beta$ -estradiol (e.g. E2, 0.1 mg for 60 days, 80  $\mu$ g/kg per day; Innovative Research of America, Sarasota, FL) [18] under general anesthesia. Mice have then been fed with a normal chow diet (i.e. NCD; energy content: 12% fat, 28% protein, and 60% carbohydrate; A04, Villemoisson sur Orge, France) or a diabetogenic, high-fat carbohydrate-free diet (i.e. HFD; energy content: 72% fat (corn oil and lard), 28% protein and less than 1% carbohydrate; SAFE, Augy, France) for four weeks. This particular diet has been developed to induce a diabetic state after 4 weeks, as previously described [9]. Animals were

divided into eight groups: WT OVX+NCD with placebo (n = 27), WT OVX+NCD+E2 (n = 16), WT OVX+HFD with placebo (n = 25), WT OVX+HFD+E2 (n = 25), CD14KO OVX+NCD with placebo (n = 6), CD14KO OVX+NCD+E2 (n = 6), CD14KO OVX+HFD with placebo (n = 12) and CD14KO OVX+ HFD+E2 (n = 12). At the end of experiment, mice were sacrificed by cervical dislocation; tissues were collected and snap-frozen in liquid nitrogen.

### Intraperitoneal Glucose-tolerance Test (IPGTT)

Six-hour-fasted mice were injected with glucose into the peritoneal cavity (1 g/kg) after 4 weeks of HFD diet. Blood glucose was measured with a glucometer (Roche Diagnostics, Meylan, France) on 3.5  $\mu$ l of blood collected from the tip of the tail vein at -30, 0, 30, 60, and 90 min after the glucose injection [9].

### Plasma Insulin Concentration

To assess plasma insulin concentration, 20  $\mu$ l blood were sampled from the tip of the tail vein of 6-hr-fasted mice. The plasma was separated and frozen at -80°C. 5  $\mu$ l plasma were used to determine the insulin concentration with an Elisa kit (Merckodia, Uppsala, Sweden) and following the manufacturer's instructions.

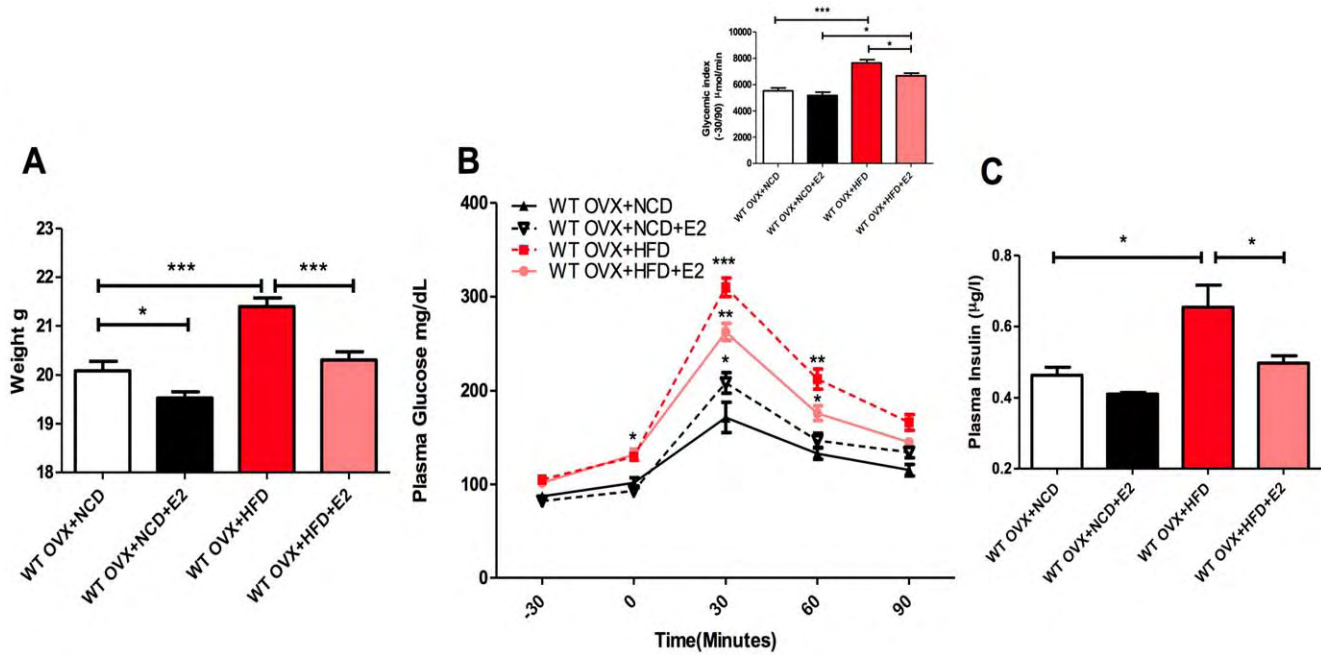
### Real-Time Quantitative PCR (qPCR) Analysis

Total RNA from white adipose tissue, liver and gingival tissue was extracted using the TriPure reagent (Roche, Basel, Switzerland). cDNA was synthesized using a reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, USA) from 1  $\mu$ g of total RNA. The primers (Eurogentec, San Diego, USA) used were (5' to 3'): tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), forward TGGGACAGTGACCTGGACTGT; reverse TCGGAAAGCCCATTTGAGT; Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) forward TCGCTCAGGGTCACAAGAAA; reverse CATCAGAGGCAAGGAGGAAAAC; plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) forward ACAGCCTTTGTCTCATCTCAGCC; reverse CCGAACCACAAAGAGAAAGGA and interleukin-6 (IL-6) forward ACAAGTCGGAGGCTTAATTACACAT; reverse TTGCCATTGCACAACCTCTTTTC. The concentration of each mRNA was normalized for RNA loading for each sample using ribosomal protein L19 (RPL19) forward GAAGGTCAAAGGGAATGTGTTCA; reverse CCTTGTCTGCCTTCAGCTTGT, as an internal standard and the data were analysed according to the 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> method [24].

### Culture and Identification of Periopathogens

The composition of the sub-gingival microbiota was determined as previously described [10]. The selected site was cleaned with 75% ethanol to remove the supragingival bacterial biofilm. Cervicular fluid was sampled with three endodontic sterile paper points held in sterile pliers: paper points were inserted into the sub-gingival space and then placed in a 2-ml bottle of reduced transport medium VGMA-III of Moëller. After mixing for 30 sec at maximal speed on a Vortex mixer, the 2-ml bottles containing glass beads were opened in an anaerobic chamber and samples were serially diluted ten-fold in Wilkins-Chalgren broth (WC, Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK). Bacteria were cultured on non-selective or selective medium agar plates [10]. Identification of putative anaerobic bacteria was carried out according to Bergey's manual criteria [25]. Genomic bacterial DNA was extracted using a classical phenol/chloroform method followed by alcohol precipitation (ice-cold 70% alcohol vol/vol). Semi-quantitative PCR was carried out using 2  $\mu$ l of the extracted DNA with specific primers [4]. The primers (Eurogentec, San





**Figure 1. E2 administration prevents HFD-induced diabetic disorders.** **A**) Body weight was assessed in 8-wk-old mice 4 weeks of diet: WT OVX+NCD (n=27), WT OVX+NCD+E2 (n=16), WT OVX+HFD (n=15) and WT OVX+HFD+E2 (n=15). **B**) Time course of glycemia (mg/dl) during an IPGTT. The inset represents the glycemic index for each group. **C**) Fasted plasma insulin concentration (µg/l) after 4 weeks of diet: WT OVX+NCD (n=6), WT OVX+NCD+E2 (n=6), WT OVX+HFD (n=6) and WT OVX+HFD+E2 (n=6). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (one-way ANOVA followed by Tukey test for **A** and **C**; and Two-Way ANOVA with Bonferroni's post-test for **B**). Results are presented as means ± SEM. doi:10.1371/journal.pone.0048220.g001

Diego, USA ) used were (5' to 3'): *Fusobacterium nucleatum* forward AAGCGCGTCTAGGTGGTTATGT and reverse TGTAGTTCCGCTTACCTCTCCAG and *Prevotella intermedia* forward TCCACCGAT GAATCTTTGGTC and reverse ATC-CAACCTTCCCTCCACTC.

**Histological Examination**

Gingival tissue surrounding the lower molars was excised, fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours and embedded in paraffin. Sections (4 µm thick), were then stained with hematoxylin/eosin. To quantify the infiltration of inflammatory cells, immune cells

were counted in ten microscopic fields randomly selected from each group.

**Quantification of Mandibular Alveolar Bone Resorption**

To evaluate mandibular alveolar bone loss, hemi-mandibles were scanned using a high-resolution µCT (Viva CT40; Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) [26]. Data were acquired at 45 keV, with a 10 µm isotropic voxel size. Six linear measurements were obtained from each molar by using a stereomicroscope with an on-screen computer-aided measurement package. The alveolar bone loss (in mm) was measured from the cemento-enamel junction (CEJ) to the alveolar bone crest (ABC) for each

**Table 1. Positive bacterial cultures : intergroup comparisons among ovariectomised mice.**

| Bacterial cultures                  | Effect of diet |            |                | Effect of E2 supplementation |               |                | Effect of CD14 deletion |                |                |
|-------------------------------------|----------------|------------|----------------|------------------------------|---------------|----------------|-------------------------|----------------|----------------|
|                                     | WT OVX NCD     | WT OVX HFD | p <sup>1</sup> | WT OVX HFD                   | WT OVX HFD E2 | p <sup>1</sup> | WT OVX HFD              | CD14KO OVX HFD | p <sup>1</sup> |
|                                     | n = 27 (%)     | n = 25 (%) |                | n = 25 (%)                   | n = 25 (%)    |                | n = 25 (%)              | n = 12 (%)     |                |
| <i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn) | 0 (0)          | 1 (4.0)    | 0.48           | 1 (4.0)                      | 7 (28.0)      | * 0.04         | 1 (4.0)                 | 0 (0)          | 1.00           |
| <i>Prevotella intermedia</i> (Pi)   | 1 (3.7)        | 4 (16.0)   | 0.18           | 4 (16.0)                     | 0 (0)         | 0.11           | 4 (16.0)                | 1 (8.3)        | 1.00           |
| <b>Both Fn + Pi</b>                 | 1 (3.7)        | 6 (24.0)   | * 0.04         | 6 (24.0)                     | 0 (0)         | ** 0.02        | 6 (24.0)                | 3 (25.0)       | 1.00           |
| <b>Fn and/or Pi</b>                 | 2 (7.4)        | 11 (44.0)  | ** <0.01       | 11 (44.0)                    | 7 (28.0)      | 0.37           | 11 (44.0)               | 4 (33.3)       | 0.72           |

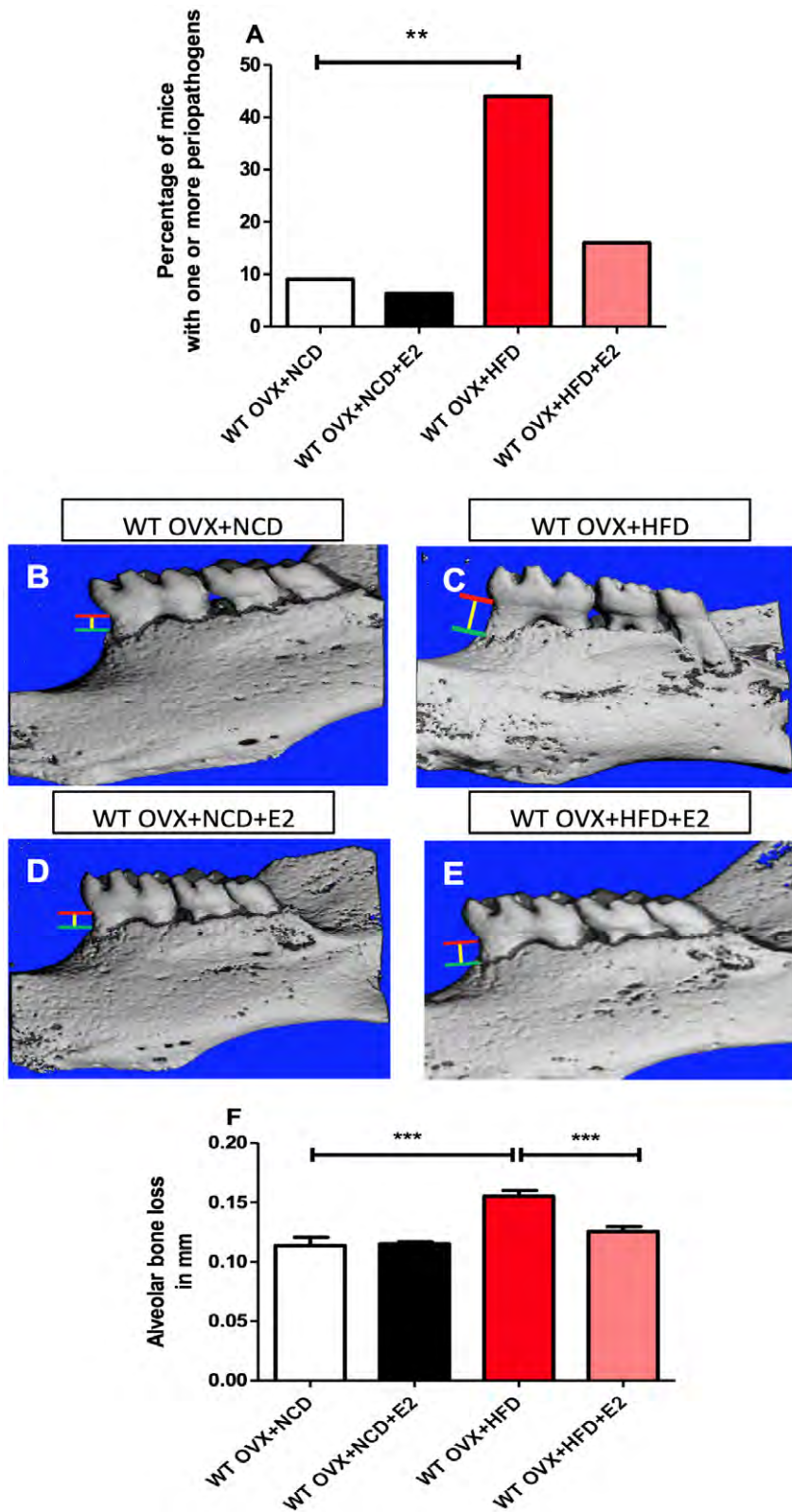
<sup>1</sup>Fischer exact tests p-values, significant at p<0.05.

The table shows the qualitative analysis of periodontal microbiota in each group: WT OVX+NCD (n=27), WT OVX+HFD (n=25), WT OVX+HFD+E2 (n=25) and CD14KO OVX+HFD (n=12).

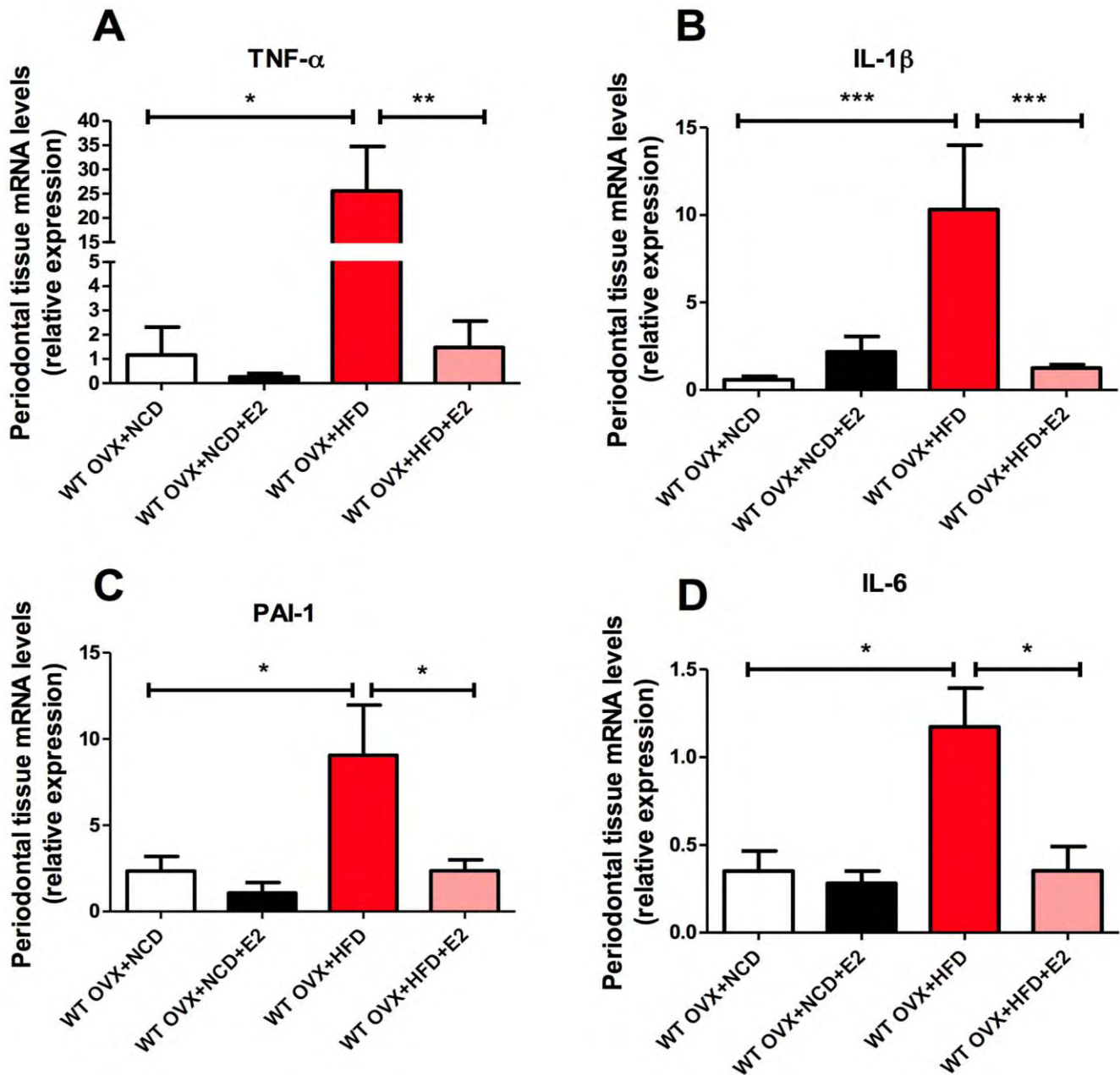
\*P<0.05,

\*\*P<0.01 (Fischer exact tests).

doi:10.1371/journal.pone.0048220.t001



**Figure 2. HFD induced periodontal disease in WT mice: reversal effect of E2-treatment.** **A)** The occurrence of periodontal pathogens was analysed in 8-wk-old mice after 4 weeks of diet : WT OVX+NCD (n=27), WT OVX+NCD+E2 (n=16), WT OVX+HFD (n=15) and WT OVX+HFD+E2 (n=15). **B–G)** Hemi-mandible from each group, as reconstructed by the micro-CT. **F)** CEJ (red line: cemento-enamel junction)-ABC (green line: alveolar bone crest) distance to represent alveolar bone loss (yellow line) (n=8 for each group). \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means ± SEM.  
doi:10.1371/journal.pone.0048220.g002



**Figure 3. E2 decreases the expression of gingival inflammatory mediators in HFD-fed ovariectomised (OVX) mice.** mRNA synthesis of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), PAI-1(C) and IL-6 (D) in gingival tissue. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means  $\pm$  SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0048220.g003

molar [27]. Three-dimensional reconstructions were generated from a set of 400 slices. After micro-CT analysis, the hemimandibles were cleaned with 0.1% hypochlorite over 20 min and then stained with 10% methylene blue.

#### Statistical Analysis

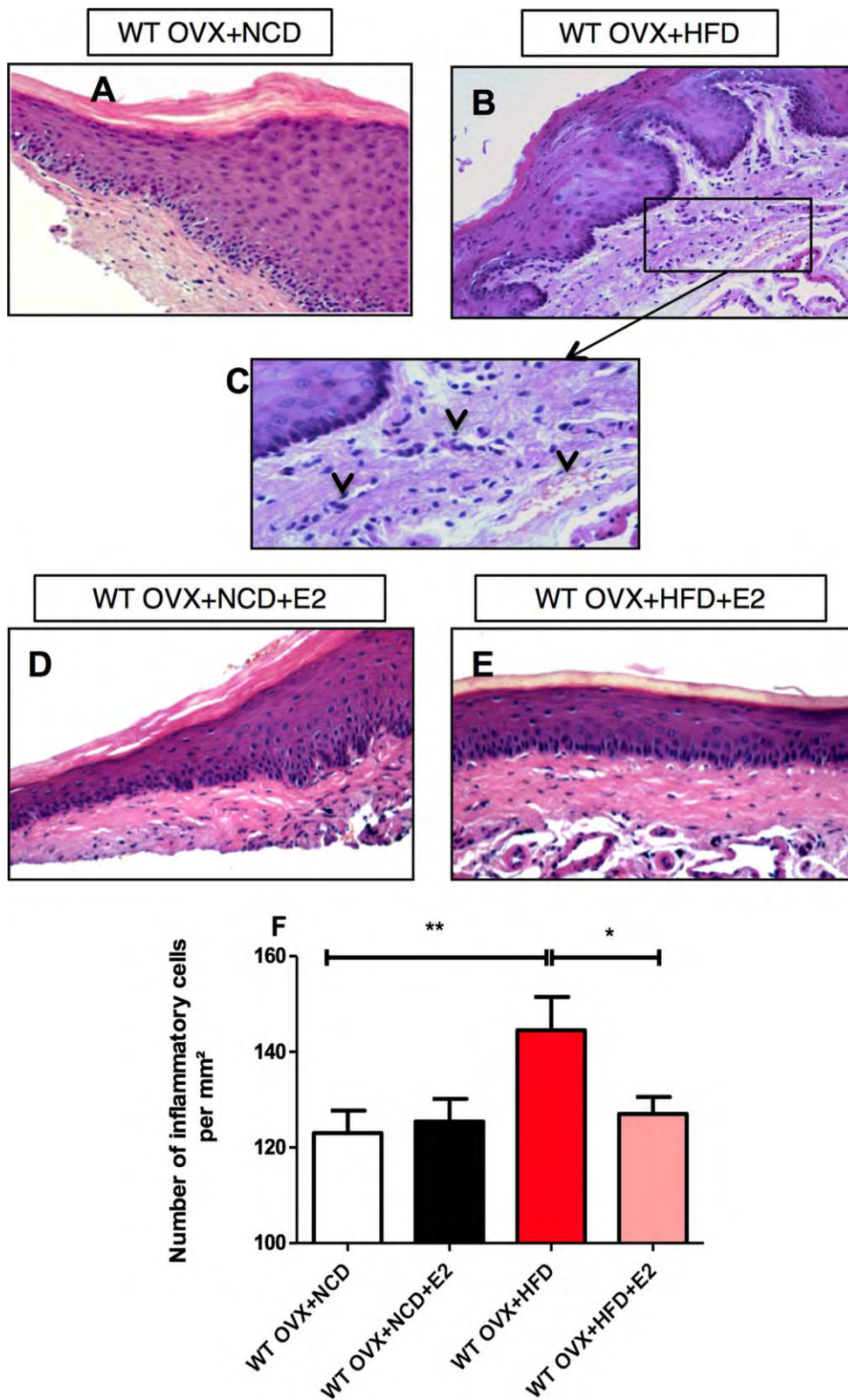
Results are presented as means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to assess the statistical significance between groups, except for the IPGTT analysis, where two-way ANOVA followed by Bonferroni's post-test was applied. The effects of diet, estrogen supplementation and *CD14* deletion on periodontal microbiota composition were tested using Fisher's

exact test. A two-sided  $p$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows Vista (GraphPad Software, San Diego, CA), and R (version 2.12.1).

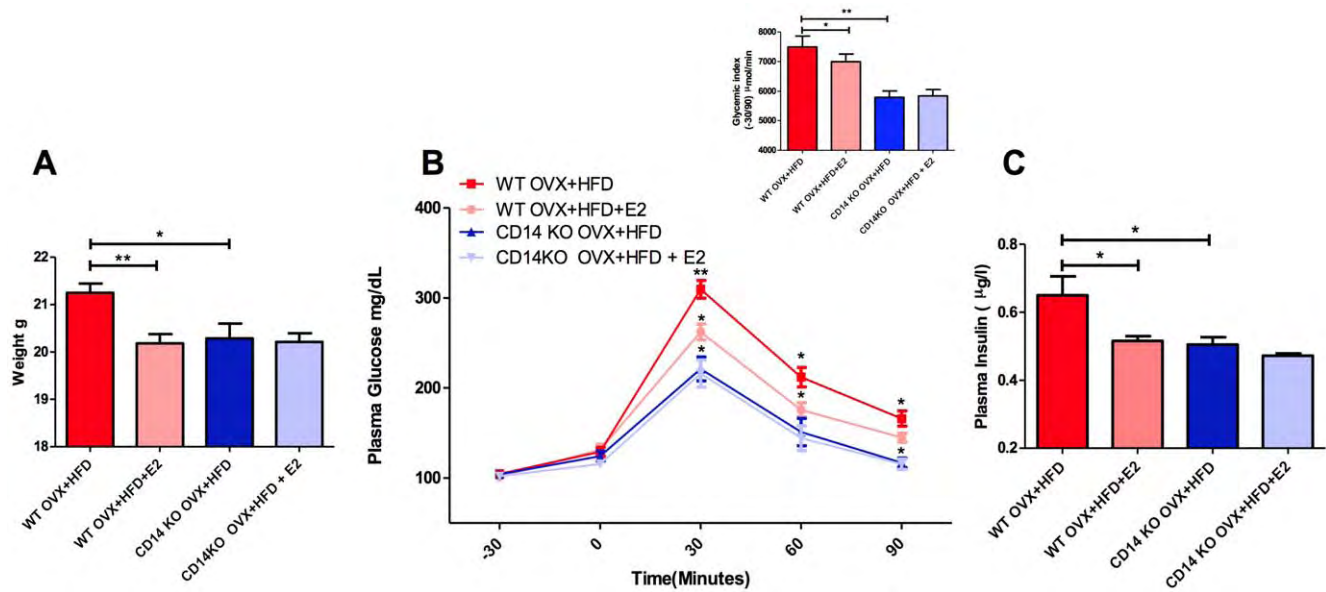
#### Results

##### Estradiol Prevents HFD-induced Metabolic Disorders in WT Ovariectomised Mice

Four-week-old wild-type C57Bl6/J female mice were ovariectomised then randomised according to both diet and E2-treatment, as reported in **Figure 1**. As expected, in comparison to NCD-fed mice, mice fed with a HFD for four weeks developed



**Figure 4. HFD-induced inflammatory cell infiltrate in gingival connective tissue is modulated by E2 in wild-type mice.** Histological appearance of the gingival tissues with H/E coloration from WT OVX+NCD (A; n = 10), WT OVX+HFD (B; n = 10), WT OVX+NCD+E2 (D; n = 10), and WT OVX+HFD+E2 (E; n = 10). C Magnification of the inflammatory gingival tissue from HFD-fed mice. F. Number of inflammatory cells for each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0048220.g004



**Figure 5. HFD-fed *CD14KO* mice did not exhibit metabolic disorders compared with WT.** **A)** Body weight was assessed in 8-wk-old mice after 4 weeks of diet: WT OVX+HFD (n = 10), WT OVX+HFD+E2 (n = 10), CD14KO OVX+HFD (n = 12) and CD14KO OVX+HFD+E2 (n = 12). **B)** Time course of glycemia (mg/dl) during an IPGTT. The inset represents the glycemic index for each group. **C)** Fasted plasma insulin concentration ( $\mu\text{g/l}$ ) after 4 weeks of diet: WT OVX+HFD (n = 6), WT OVX+HFD+E2 (n = 6), CD14KO OVX+HFD (n = 6) and CD14KO OVX+HFD+E2 (n = 6). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (One-way ANOVA followed by Tukey's post-test for **A** and **C**; and Two-Way ANOVA with Bonferroni's post-test for **B**). Results are presented as means  $\pm$  SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0048220.g005

a dysmetabolic phenotype characterised by increased body weight gain, impaired fasting glycemia, hyperinsulinemia and glucose-intolerance. It was noteworthy that the harmful effects of HFD on body weight, fasted plasma insulin and glucose homeostasis were largely prevented by E2-supplementation (Fig. 1A–C).

#### HFD Promotes Periodontitis in the Absence of Estrogens

We then examined the respective influence of a HFD and estrogens on periodontal health. Without estrogen supplementation, the HFD significantly increased the percentage of animals with at least one and up to two periopathogen species, *Pi* and *Fn*, compared with control mice maintained on the NCD (Fig. 2A; Table 1). Furthermore, the HFD instigated the presence of *Pi/Fn* association in the periodontal microbiota of OVX-mice (Table 1), and induced alveolar bone resorption (a common feature of periodontitis) (Fig. 2B–F). Interestingly, E2-administration to OVX mice blunted the deleterious effects of the HFD on alveolar bone (Fig. 2B–F) and modified the periodontal microbiota by reducing the percentage of mice with *Pi* and *Fn* association (Table 1).

#### E2-treatment Prevents HFD-induced Inflammation of Periodontal Tissues

To determine whether E2 prevents HFD-induced periodontal disease by controlling inflammatory processes, we assayed the mRNA concentrations of several inflammatory mediators in the gingiva. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 and IL-6 expression significantly increased in the gingival connective tissue of OVX mice fed a fat-enriched diet when compared with their NCD-fed counterparts. Conversely, the proinflammatory effect of the HFD was abolished by E2-supplementation (Fig. 3A–D).

Microscopic examination of gingival connective tissue of HFD-fed mice highlighted an inflammatory cell infiltration (Fig. 4A–F), and red cells extravasation, compared with the NCD-fed OVX

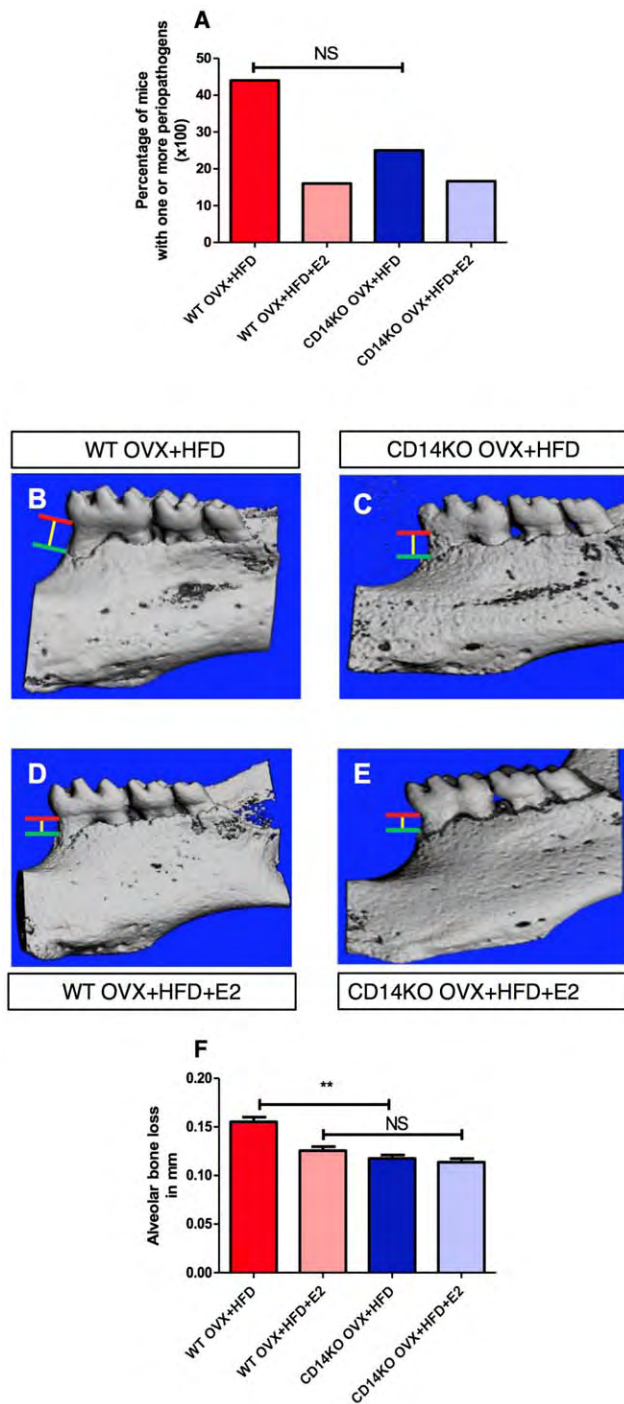
control mice (Fig. 4A–F). Interestingly, E2-supplementation reversed the HFD-induced periodontal soft tissue inflammation (Fig. 4F).

#### *CD14KO* Mice are Protected from HFD-induced Periodontitis

*CD14* is an important modulator of the inflammatory responses induced by gram-negative bacteria. We therefore assessed the impact of *CD14* deletion on HFD-associated disorders including metabolic and periodontal alterations. According to our previous data [4] and in contrast to WT mice, *CD14KO* mice did not show increased body weight, fasted glycemia and plasma insulin concentration or glucose-intolerance, when fed a HFD (Fig. 5A–C) or a NCD (Fig. S1A) for four weeks.

Interestingly, the deletion of *CD14* also prevented the HFD-induced alveolar bone loss (Fig. 6B–F), although the association of *Pi/Fn* was unaffected in *CD14KO* HFD-fed mice (WT OVX+HFD 25% vs *CD14KO* OVX+HFD 24% Table 1). Like WT NCD-fed mice, *CD14KO* NCD-fed mice did not show a modified periodontal microbiota (Table S1). Furthermore, in contrast to the protective effect observed in WT mice, estrogen supplementation had no effect on the alveolar bone level in *CD14KO* mice (Fig. 6A–F).

The TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1 and IL-6 expression in the periodontal soft tissue of HFD-fed *CD14KO* mice was comparable to the controls (Fig. 7A–D). Moreover, in contrast to HFD-fed WT mice (Fig. 8A–E), the immune cell infiltration in gingival tissue was dramatically reduced in HFD-fed *CD14* mutant mice. In addition, E2 did not affect alveolar bone loss and overall inflammatory tone in *CD14KO* OVX+NCD (Fig. S2A–F).



**Figure 6. HFD-fed *CD14KO* mice are protected from periodontal disease compared with WT.** **A**) The occurrence of periodontal pathogens was analyzed in 8-wk-old mice after 4 weeks of diet: WT OVX+HFD (n=10), WT OVX+HFD+E2 (n=10), CD14KO OVX+HFD (n=12) and CD14KO OVX+HFD+E2 (n=12). **B–G**) Hemi-mandible from each group, as reconstructed by the micro-CT. **F**) CEJ (red line: cemento-enamel junction)-ABC (green line: alveolar bone crest) distance to represent alveolar bone loss (yellow line). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0048220.g006

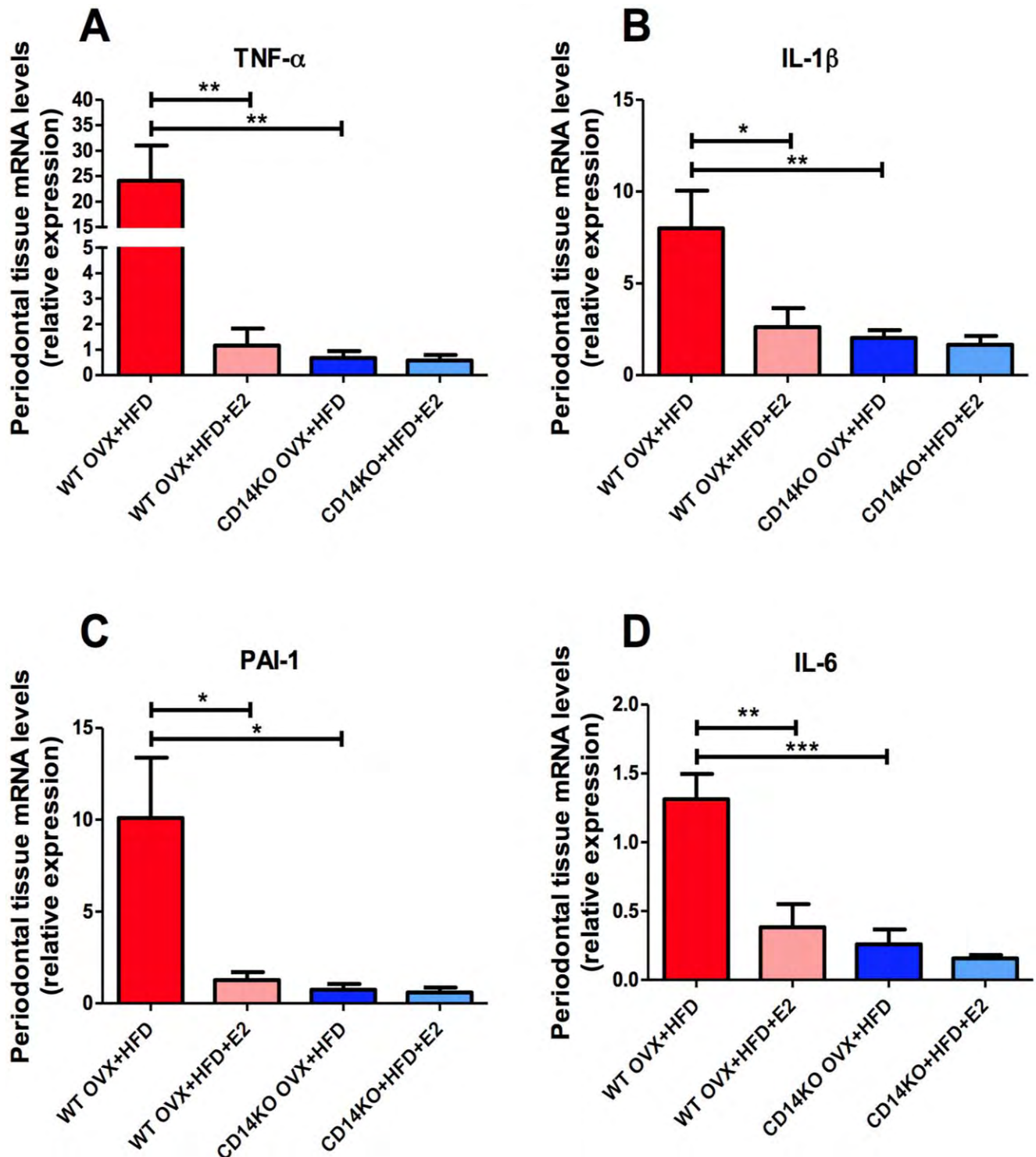
## Discussion

The data presented in this study showed that a fat-enriched diet combined with estrogen deficiency induced a periodontal disease in mice. Furthermore, our data strongly suggest that estradiol replacement may prevent HFD-induced metabolic and periodontal disorders.

Medium- or long-term diabetic patients with degenerative multi-organ complications [28], are also prone to frequent and severe periodontitis. To date, the mechanisms linking diabetes to periodontal diseases remain poorly understood. Our data showed that HFD increases the proportion of mice harbouring periodontal pathogens such as *Fusobacterium nucleatum* and *Prevotella intermedia*, known to be part of the subgingival plaque in periodontal pockets [29,30]. Indeed, it has been suggested that a fat-enriched diet may enhance the occurrence of oral pathogens in diabetic patients [31]. The reasons for this fundamental modification are still unclear. However, a switch to a high-fat diet induces a new intestinal ecology and, hence, a new periodontal ecology [32]. This modification increased the proportion of gram-negative bacteria producing inflammatory LPS, at least in the intestine [4]. Furthermore, the microbial diversity could explain the different metabolic phenotypes [33]. Therefore, an inappropriate immune function in reaction to the many bacterial antigens would generate a metabolic inflammation and the corresponding immune messengers may impair and maintain the metabolic disorders [2]. On the other hand, a microbiota composed of gram-negative bacteria produces LPS that directly move into the blood in human [34] or animal models to aggravate inflammation and systemic diseases [12,35]. Indeed, HFD-induced metabolic endotoxemia (an increase in plasma levels of LPS) was shown to be an initiator of metabolic diseases [35] via enhanced systemic inflammation [2]. Hence, the elevated systemic inflammation in diabetic patients could be linked to PD [36], demonstrating a two-sided relationship between these pathologies. Thus, inflammation could be a key feature of periodontitis to be targeted [5] and we can postulate that a fat-enriched diet may be a regulator of the relationship between microbiota and human host [36].

Although the mechanism through which periopathogens contribute to periodontal diseases is still not fully understood, studies have suggested that the pathogenic microbiota induces local and systemic inflammation [37,38], a common feature of metabolic disease [2]. As reported above, periodontitis is characterized by a complex biofilm composed of LPS-harboring gram-negative bacteria [32]. CD14, a cell-surface molecule involved in innate immunity [39], is a systemic modulator of LPS-induced metabolic disorders. In this context, we have demonstrated in the current study that *CD14*-ablation protects against HFD-induced inflammation-triggered diabetes and periodontitis. Indeed, HFD-fed *CD14KO* ovariectomised mice did not show any features of periodontitis such as alveolar bone loss or immune cell infiltration into the gingival connective tissue. Nevertheless, the number of mice exhibiting a periopathogenic microbiota was found to be increased. This result may suggest that a HFD induces metabolic disorders and periodontal damage through activation of innate immunity via LPS production by periodontal microbiota, rather than direct adverse effects on tissues by periopathogenic derivatives as previously suggested [40]. In agreement with our findings, previous studies have reported relationships between CD14, inflammation and PD in humans [41]. Therefore, the use of antibiotic treatment restricted to the periodontal pocket could be thought.

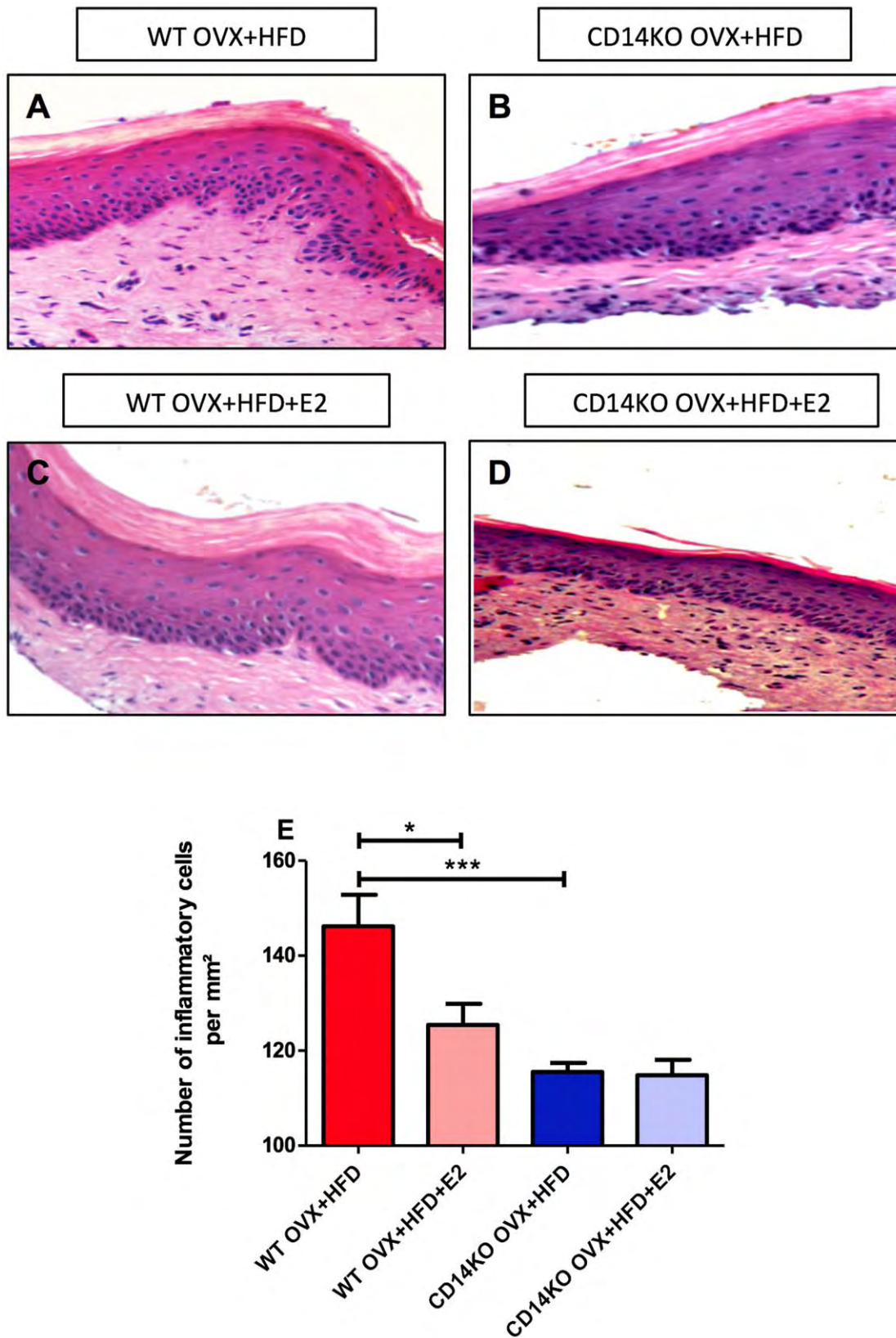
Homeostasis in periodontium involves multiple factors including variation in sex hormone production [42]. Many studies recently



**Figure 7. *CD14KO* mice did not display HFD-induced periodontal inflammation.** mRNA expression of TNF- $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), PAI-1(C) and IL-6 (D) in gingival tissue. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0048220.g007

showed that modification of estrogenic status during menstrual cycles [43], puberty [44] and pregnancy [42], could be linked to the occurrence of gingivitis, an inflammation of soft periodontal tissue without loss of attachment [42]. Some studies hypothesized that estrogen therapy may be used in these periodontal pathologies [45]. However, this therapeutic strategy would be not applicable in

gingivitis because it is spontaneously reversed after gingival plaque removing and/or menstrual cycle normalization [46]. Conversely, estrogen deficiency is considered a risk factor for periodontitis [19]. Importantly, we recently demonstrated that estrogen replacement reversed HFD-induced metabolic diseases [18,20]. Here, we report the reversal of the proportion of WT OVX mice



**Figure 8. The depletion of *CD14* reduced HFD-induced inflammatory cell infiltration into gingival connective tissue.** Histological appearance of the gingival tissues with H/E coloration from WT OVX+HFD (A, n=6), *CD14*KO OVX+HFD (B, n=6) WT OVX+HFD+E2 (C, n=6), and *CD14*KO OVX+HFD+E2 (D, n=6) E. Number of inflammatory cells for each group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA followed by Tukey test). Results are presented as means  $\pm$  SEM. doi:10.1371/journal.pone.0048220.g008



with periodontal pathogenic microbiota by E2-treatment, as already reported in post-menopausal women using hormone replacement therapy [23]. While *in vivo* E2-administration enhanced systemic inflammation in mice [47], our results suggest that estrogen supplementation may have a specific protective effect on periodontal tissue by regulating the inflammation induced by a HFD [48]. Since E2 increases the thickness and keratinization of epithelia [49] we suggest that this hormone could reinforce the gingival epithelium against the colonization by specific periopathogens [48]. Moreover, E2 stimulates the innate immune response [50,51], increasing macrophage reactivity against aggressive bacteria [52]. As already suggested [53], our results support the hypothesis that E2-supplementation may have anti-inflammatory effects on periodontal tissue. Thus, we can propose that our present results could be the basis of further experimental trials dedicated to show the importance of hormone replacement therapy as well as that of a tight glycemic control to maintain periodontal health.

In conclusion, the data reported herein suggest a causal link between the activation of the LPS pathway on innate immunity by periodontal microbiota and the occurrence of HFD-induced periodontal defects. This pathophysiological mechanism could be targeted by estrogens, which may thus represent a new therapeutic perspective to prevent HFD-induced periodontal inflammation and reduce the occurrence of PD.

## Supporting Information

**Figure S1 NCD-fed CD14KO mice did not exhibit metabolic disorders.** A) Body weight was assessed in 8-wk-

## References

- Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, et al. (2012) Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 55: 21–31.
- Hotamisligil GS (2006) Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 444: 860–867.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793–1801.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, et al. (2007) Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56: 1761–1772.
- Saito T, Shimazaki Y (2007) Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol* 2000 43: 254–266.
- Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3: 213–223.
- Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, et al. (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med* 1: 6ra14.
- Neish AS (2009) Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 136: 65–80.
- Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R (2008) Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol (Paris)* 56: 305–309.
- Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M (2005) Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 20: 244–252.
- Blaizot A, Vergnes JN, Nuwvareh S, Amar J, Sixou M (2009) Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *Int Dent J* 59: 197–209.
- Blasco-Baque V, Kemoun P, Loubieres P, Roumieux M, Heymes C, et al. [Impact of periodontal disease on arterial pressure in diabetic mice.]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*.
- Guan SM, He JJ, Zhang M, Shu L (2011) Prevotella intermedia stimulates tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-2 expression via multiple signaling pathways in human periodontal ligament cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 62: 91–100.
- Robert AA, Rass MD, Al-Zoman KH, Al-Sohail AM, Alsuwyed AS, et al. (2010) Determinants of periodontopathogens in microbiological monitoring of diabetic patients with periodontitis. *Saudi Med J* 31: 1044–1048.
- Ford PJ, Gemmel E, Chan A, Carter CL, Walker PJ, et al. (2006) Inflammation, heat shock proteins and periodontal pathogens in atherosclerosis: an immunohistological study. *Oral Microbiol Immunol* 21: 206–211.
- Lee HR, Jun HK, Kim HD, Lee SH, Choi BK Fusobacterium nucleatum GroEL induces risk factors of atherosclerosis in human microvascular endothelial cells and ApoE(–/–) mice. *Mol Oral Microbiol* 27: 109–123.
- Koren O, Spor A, Felin J, Fak F, Stombaugh J, et al. (2011) Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1: 4592–4598.
- Riant E, Waget A, Cogo H, Arnal JF, Burcelin R, et al. (2009) Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. *Endocrinology* 150: 2109–2117.
- Haas AN, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM, Susin C (2009) Association among menopause, hormone replacement therapy, and periodontal attachment loss in southern Brazilian women. *J Periodontol* 80: 1380–1387.
- Bonds DE, Lasser N, Qi L, Brzyski R, Caan B, et al. (2006) The effect of conjugated equine oestrogen on diabetes incidence: the Women's Health Initiative randomised trial. *Diabetologia* 49: 459–468.
- Donahue RP, Bean JA, Donahue RA, Goldberg RB, Prineas RJ (1997) Insulin response in a triethnic population: effects of sex, ethnic origin, and body fat. *Miami Community Health Study. Diabetes Care* 20: 1670–1676.
- Lenfant F, Tremolieres F, Gourdy P, Arnal JF (2011) Timing of the vascular actions of estrogens in experimental and human studies: why protective early, and not when delayed? *Maturitas* 68: 165–173.
- Tarkkila L, Kari K, Furuholm J, Tiitinen A, Meurman JH (2010) Periodontal disease-associated micro-organisms in peri-menopausal and post-menopausal women using or not using hormone replacement therapy. A two-year follow-up study. *BMC Oral Health* 10: 10.
- Serino M, Waget A, Marsollier N, Masseboeuf M, Payros G, et al. (2011) Lipid-induced peroxidation in the intestine is involved in glucose homeostasis imbalance in mice. *PLoS One* 6: e21184.
- Chan EC, McLaughlin R (2000) Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* 15: 1–9.
- Wade-Gueye NM, Boudiffa M, Laroche N, Vanden-Bossche A, Fournier C, et al. (2010) Mice lacking bone sialoprotein (BSP) lose bone after ovariectomy and display skeletal site-specific response to intermittent PTH treatment. *Endocrinology* 151: 5103–5113.
- Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, Hourri-Haddad Y, Shapira L (2005) Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in Porphyromonas gingivalis-infected mice using micro-computed tomography. *J Periodontol* 76: 1282–1286.
- Munch IC, Larsen M, Borch-Johnsen K, Glumer C, Lund-Andersen H, et al. (2011) Cumulative glycaemia as measured by lens fluorimetry: association with retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetologia* 54: 757–761.
- Takahashi K, Nishimura F, Kurihara M, Iwamoto Y, Takashiba S, et al. (2001) Subgingival microflora and antibody responses against periodontal bacteria of

- young Japanese patients with type 1 diabetes mellitus. *J Int Acad Periodontol* 3: 104–111.
30. Field CA, Gidley MD, Preshaw PM, Jakubovics N (2012) Investigation and quantification of key periodontal pathogens in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol Res* 47: 470–478.
  31. Willershäusen B, Haas G, Krummenauer F, Hohenfellner K (2004) Relationship between high weight and caries frequency in German elementary school children. *Eur J Med Res* 9: 400–404.
  32. Burcelin R, Serino M, Chabo C, Blasco-Baque V, Amar J (2011) Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol* 48: 257–273.
  33. Serino M, Luche E, Gres S, Baylac A, Berge M, et al. (2012) Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut* 61: 543–553.
  34. Amar J, Burcelin R, Ruidavets JB, Cani PD, Fauvel J, et al. (2008) Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *Am J Clin Nutr* 87: 1219–1223.
  35. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, et al. (2008) Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57: 1470–1481.
  36. Salvi GE, Yalda B, Collins JG, Jones BH, Smith FW, et al. (1997) Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Periodontol* 68: 127–135.
  37. Sahingur SE, Xia XJ, Schifferle RE (2012) Oral bacterial DNA differ in their ability to induce inflammatory responses in human monocytic cell lines. *J Periodontol* 83: 1069–1077.
  38. Tew JG, El Shikh ME, El Sayed RM, Schenkein HA (2012) Dendritic cells, antibodies reactive with oxLDL, and inflammation. *J Dent Res* 91: 8–16.
  39. Goyert SM, Ferrero E, Rettig WJ, Yenamandra AK, Obata F, et al. (1988) The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors. *Science* 239: 497–500.
  40. Feghali K, Tanabe S, Grenier D (2011) Soluble CD14 induces cytokine release by human oral epithelial cells. *J Periodontol Res* 46: 147–152.
  41. Ren L, Jiang ZQ, Fu Y, Leung WK, Jin L (2009) The interplay of lipopolysaccharide-binding protein and cytokines in periodontal health and disease. *J Clin Periodontol* 36: 619–626.
  42. Carrillo-de-Albornoz A, Figuero E, Herrera D, Cuesta P, Bascones-Martinez A (2012) Gingival changes during pregnancy: III. Impact of clinical, microbiological, immunological and socio-demographic factors on gingival inflammation. *J Clin Periodontol* 39: 272–283.
  43. Krejci CB, Bissada NF (2002) Women's health issues and their relationship to periodontitis. *J Am Dent Assoc* 133: 323–329.
  44. Oh TJ, Eber R, Wang HL (2002) Periodontal diseases in the child and adolescent. *J Clin Periodontol* 29: 400–410.
  45. Giuca MR, Carli E, Pasini M, Bonfigli D, Cappe MR (2009) Evaluation of efficacy of estrogen and phytotherapy in oral cavity alterations of women in menopause. *Minerva Ginecol* 61: 13–22.
  46. Baser U, Cekici A, Tanrikulu-Kucuk S, Kantarci A, Ademoglu E, et al. (2009) Gingival inflammation and interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha levels in gingival crevicular fluid during the menstrual cycle. *J Periodontol* 80: 1983–1990.
  47. Calippe B, Douin-Echinard V, Laffargue M, Laurell H, Rana-Poussine V, et al. (2008) Chronic estradiol administration in vivo promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol* 180: 7980–7988.
  48. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL (2003) Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol* 30: 671–681.
  49. Arnal JF, Laurell H, Lenfant F, Douin-Echinard V, Brouchet L, et al. (2006) Estradiol action in atherosclerosis and reendothelialization. *Ernst Schering Found Symp Proc*: 69–86.
  50. Corcoran MP, Meydani M, Lichtenstein AH, Schaefer EJ, Dillard A, et al. (2010) Sex hormone modulation of proinflammatory cytokine and C-reactive protein expression in macrophages from older men and postmenopausal women. *J Endocrinol* 206: 217–224.
  51. Gillgrass A, Chege D, Bhavanam S, Kaushic C (2010) Estradiol limits viral replication following intravaginal immunization leading to diminished mucosal IgG response and non-sterile protection against genital herpes challenge. *Am J Reprod Immunol* 63: 299–309.
  52. Maekawa T, Takahashi N, Tabeta K, Aoki Y, Miyashita H, et al. (2011) Chronic oral infection with *Porphyromonas gingivalis* accelerates atheroma formation by shifting the lipid profile. *PLoS One* 6: e20240.
  53. Mirza BA, Syed A, Izhar F, Ali Khan A (2010) Bidirectional relationship between diabetes and periodontal disease: review of evidence. *J Pak Med Assoc* 60: 766–768.

Article original

# Impact de la maladie parodontale sur la pression artérielle des souris diabétiques

## *Impact of periodontal disease on arterial pressure in diabetic mice*

V. Blasco-Baque<sup>a,\*</sup>, P. Kémoun<sup>a</sup>, P. Loubières<sup>a</sup>, M. Roumieux<sup>b,c</sup>, C. Heymes<sup>b,c</sup>, M. Serino<sup>b,c</sup>,  
M. Sixou<sup>a</sup>, R. Burcelin<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup> Parodontites et maladies générales LU 51, faculté de chirurgie dentaire, 3, chemin des Maraîchers, 31062 Toulouse cedex, France

<sup>b</sup> Unité mixte de recherche (UMR) 1048, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), institut de maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), 31432 Toulouse cedex 4, France

<sup>c</sup> Université de Toulouse, UPS, institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (I2MC), 31432 Toulouse cedex 4, France

Reçu le 6 avril 2012 ; accepté le 15 avril 2012

Disponible sur Internet le 7 mai 2012

### Résumé

Les maladies cardiovasculaires associées au diabète représentent un enjeu majeur dans les pays industrialisés en termes de santé publique. La parodontite, maladie infectieuse à manifestation inflammatoire des tissus supports de la dent, est étroitement liée à ces pathologies systémiques, via l'inflammation induite par les bactéries parodontales Gram négatif. L'objectif de cette étude est d'évaluer les effets de la maladie parodontale sur la pression artérielle chez des souris diabétiques. Seize souris C57BL/6 femelles ont été randomisées en deux groupes. Un groupe a reçu pendant un mois un inoculat de bactéries pathogènes pour le tissu parodontal (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum*), l'autre groupe servant de témoin non infecté. Un mois après, les souris des deux groupes ont été nourries avec un régime riche en gras (High Fat Diet, i.e. HFD) connu pour induire un diabète. Après trois mois de régime, la pression artérielle a été mesurée in vivo à la queue. Les mandibules ont été analysées par tomодensitométrie afin d'évaluer la lyse osseuse alvéolaire, une des caractéristiques de parodontite. Nos résultats mettent en évidence une lyse osseuse dans les deux groupes, le groupe de souris infectées présentant une résorption significativement majorée par rapport aux souris témoins. De plus, l'infection parodontale amplifie l'intolérance au glucose et la pression artérielle systolique et diastolique exacerbées par le régime HFD. En conclusion, la maladie parodontale majore les troubles métaboliques et l'hypertension artérielle induite par un diabète expérimental, et représente de ce fait un nouvel axe de recherche dans cette relation tripartite.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Maladie parodontale ; Hypertension artérielle ; Diabète ; Bactéries périopathogènes

### Abstract

Diabetes-driven cardiovascular diseases represent a high challenge for developed countries. Periodontal disease is strictly linked to the aforementioned diseases, due to its Gram negative-driven inflammation. Thus, we investigated the effects of periodontal disease on arterial pressure during the development of diabetes in mice. To this aim, C57BL/6 female mice were colonized with pathogens of periodontal tissue (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*) for 1 month, whereas another group of mice did not undergo the colonization. Subsequently, all mice were fed a high-fat carbohydrate-free diet for 3 months. Then, arterial pressure was measured in vivo and a tomодensitometric analysis of mandibles was realized as well. Our results show increased mandibular bone-loss induced by colonization with periopathogens. In addition, periodontal infection augmented glucose-intolerance and systolic and diastolic arterial pressure, parameters already known to be affected by a fat-diet. In conclusion, we show here that periodontal disease amplifies metabolic troubles and deregulates arterial pressure, emerging as a new axis of metabolic investigation.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Periodontal disease; Periodontitis; Arterial hypertension; Diabetes; Bacteria periopathogens

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [vincent.blasco@inserm.fr](mailto:vincent.blasco@inserm.fr) (V. Blasco-Baque).

## 1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent la principale cause de décès dans les pays industrialisés [1,2]. Les facteurs de risque, tels que le diabète, l'hyperlipidémie et l'hypertension artérielle, sont présents chez 50 % des patients souffrant de MCV [3]. De plus, leur prise en charge réduit la morbidité et la mortalité [4]. Les maladies métaboliques et vasculaires présentent un point commun : une dysrégulation systémique des médiateurs pro-inflammatoires [5]. L'inflammation est associée à des dysfonctions endothéliales [6] entraînant un remodelage vasculaire à type de rigidité artérielle puis une hausse de la pression artérielle systolique et une baisse de la pression artérielle diastolique [7]. De plus, les maladies métaboliques comme le diabète et l'obésité sont également caractérisées par une réaction inflammatoire à « bas » bruit [8]. Les cellules du système immunitaire inné macrophages et cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes tissulaires, sont activées par l'état métabolique et libèrent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires qui altèrent l'action de l'insuline, ce qui contribue au développement de la maladie métabolique [8]. L'origine des facteurs initiateurs de la réaction inflammatoire est peu connue. Des travaux récents ont démontré que la concentration en dérivés de bactéries Gram négatif (Gram-), les lipopolysaccharides (LPS), est augmentée dans le sang chez l'homme et les modèles animaux de diabète et obésité. On parle d'endotoxémie métabolique [9]. Elle est notamment corrélée avec la proportion de graisses dans la ration alimentaire [10] qui modifie la flore intestinale en favorisant un enrichissement en bactéries Gram-. Ainsi, une relation entre régime gras, flore intestinale, endotoxémie et maladie métabolique a été montrée. Leur lien conceptuel avec la maladie parodontale (MP) est dû au fait qu'elle est aussi une maladie infectieuse bactérienne à Gram- à manifestation inflammatoire [11]. Les MP sont décrites comme des lésions qui intéressent l'ensemble des tissus de soutien de la dent (gencive, os, ligament et ciment) [12]. Par ailleurs, cette affection orale contribue à diffuser des LPS et des molécules pro-inflammatoires dans le sang générant un état inflammatoire chronique aggravant les maladies métaboliques [13,14]. Ce contexte inflammatoire est également propice à l'hypertension artérielle [8]. Ainsi, plusieurs arguments suggèrent une relation forte entre maladies métaboliques, MP et hypertension dont l'origine pourrait être l'inflammation initiée par un changement de flore buccale inflammatoire Gram-.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer les effets d'une infection parodontale sur la pression artérielle dans un contexte de maladie métabolique comme le diabète. Ainsi, nous proposons qu'une charge bactérienne Gram- parodontopathogène puisse favoriser l'émergence ou l'aggravation de l'hypertension artérielle.

## 2. Méthodes

Toutes les procédures expérimentales ont été approuvées par le comité local d'éthique de l'hôpital Rangueil. Afin d'évaluer l'impact de la MP sur la pression artérielle dans un contexte de diabète, 16 souris C57BL/6 femelles âgées de quatre semaines

ont été randomisées en deux groupes. Les souris du groupe expérimental ont été colonisées pendant un mois à intervalles réguliers espacés de 24 heures par une microflore sous-gingivale pathogène (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Fusobacterium nucleatum*) connue pour induire une MP [15] alors que les souris du groupe témoin n'ont pas été infectées. Après un mois, les souris des deux groupes ont été nourries avec un régime riche en lipides (High Fat Diet : HFD) durant trois mois. Ce régime est responsable du développement d'un état diabétique chez les souris [9]. Le phénotype diabétique a été évalué en effectuant un test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale (1 g/kg) après six heures de jeûne. La glycémie sanguine a été mesurée avec un glucomètre (Roche Diagnostic, Grenoble, France) à -30, 0, 30, 60 et 90 minutes après l'injection. Par ailleurs, la pression artérielle a été relevée in vivo à la queue à l'aide d'un système non invasif (CODA 2 Kent Scientific, Torrington, CT) avec trois mesures par souris à 24 heures d'intervalle [16]. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les mandibules recueillies et analysées par tomodensitométrie. La lyse osseuse alvéolaire a été quantifiée en mesurant la distance de la jonction émail-cément (« cementum enamel junction », i.e. CEJ) à la crête osseuse alvéolaire (« alveolar bone crest », i.e. ABC) au niveau de la première molaire mandibulaire sur la face linguale. Nous avons obtenu trois mesures linéaires (en millimètre) de la lyse osseuse en utilisant un logiciel de mesure assisté par ordinateur sur les coupes du microscanner. Après l'analyse par micro-CT, les hémimandibules ont été nettoyées avec de l'hypochlorite à 0,1 % pendant 20 minutes et colorées avec du bleu de méthylène à 10 % pendant sept minutes puis photographiées. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Un test *t* de Student non apparié a été utilisé avec GraphPad Prism version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA). Les valeurs significatives sont considérées à partir de  $p < 0,05$ .

## 3. Résultats

Dans cette étude, nous avons analysé la lyse osseuse alvéolaire mandibulaire par microscanner suite à la charge bactérienne par des périopathogènes spécifiques dans un contexte de dysrégulation métabolique. Nous avons mis en évidence dans les deux groupes une lyse osseuse alvéolaire mésiale, furcataire et distale au niveau de la première molaire (Fig. 1A–E). Les souris nourries par HFD présentent toutes une résorption alvéolaire majorée lorsque le régime a été mis en place dans un contexte d'infection parodontale.

Nous avons également étudié le phénotype diabétique après infection par des périopathogènes suite au stress nutritif. L'inoculation bactérienne préalable amplifie les troubles métaboliques induits par le HFD (résultats non montrés). Le diabète est connu pour être un facteur de risque des MCV. De ce fait, nous avons analysé la pression artérielle des souris. La colonisation bactérienne du tissu parodontal aggrave l'hypertension artérielle des souris diabétiques en augmentant les pressions artérielles diastoliques et systoliques (Fig. 2 A et B).

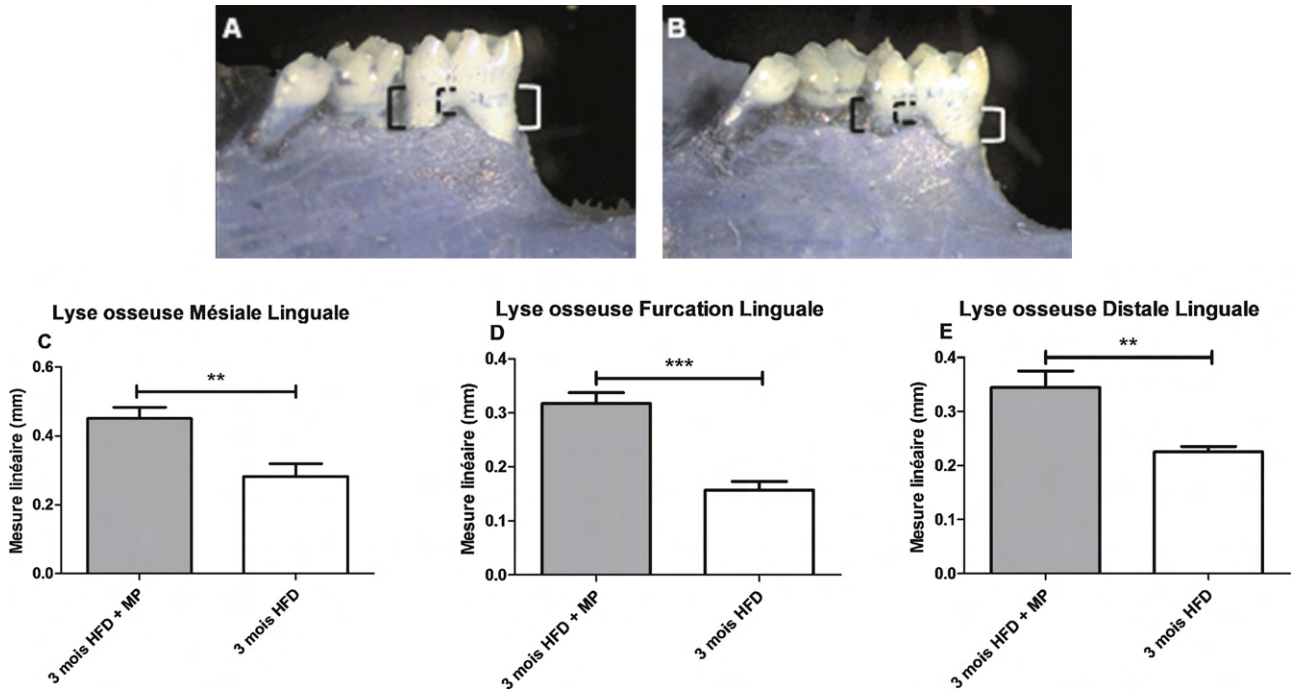


Fig. 1. Augmentation de la lyse osseuse mandibulaire induite par les bactéries périopathogènes. Lyse osseuse mésiale (crochet blanc continu), furcataire (crochet noir discontinu) et distale (crochet noir continu) de la première molaire mandibulaire de souris colonisées sous HFD (A) et de souris sous HFD (B) ; C–E : histogramme de la mesure linéaire de la lyse osseuse des trois localisations citées ci-dessus. \*\* $p < 0,01$  ; \*\*\* $p < 0,001$  (test  $t$  de Student, non apparié). Les données sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ).

#### 4. Discussion

À notre connaissance, cette étude chez la souris est la première à démontrer qu'un régime diabétogène induit une lyse osseuse alvéolaire identique aux formes anatomocliniques des MP. Ces données suggèrent qu'une infection parodontale installée augmente les dysrégulations métaboliques et l'hypertension artérielle induite par le HFD.

La parodontite est une maladie chronique infectieuse des tissus de soutien dentaires à manifestation inflammatoire de bas grade [11]. La MP est connue pour augmenter les taux sériques de marqueurs inflammatoires, dont l'interleukine (IL) 6,

protéine C-réactive (CRP), *tumor necrosis factor*  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et de LPS d'origine bactérienne [13,16,17]. De plus, il a été démontré dans notre laboratoire que les maladies métaboliques sont initiées par une inflammation systémique d'origine bactérienne [9] qui peut les entretenir mais également initier voire aggraver les maladies cardiovasculaires, y compris l'hypertension [18]. Nos résultats suggèrent donc que l'inflammation systémique liée au diabète a un impact direct sur le parodonte surtout s'il est préalablement infecté. De plus, notre étude met en évidence que l'infection parodontale aggrave l'hypertension déjà associée au syndrome métabolique. Il est probable qu'une des hypothèses physiopathologiques susceptibles d'expliquer ces résultats est

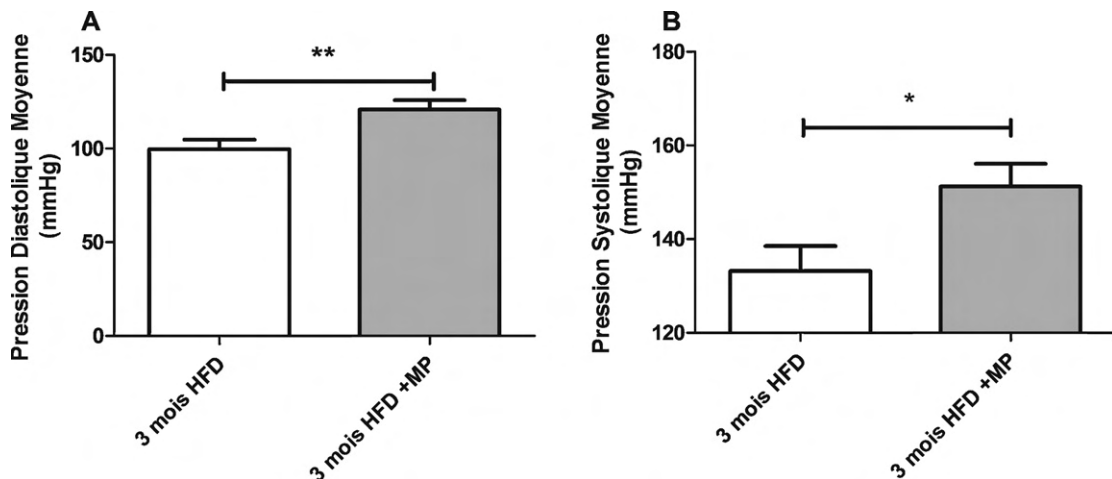


Fig. 2. La MP affecte l'hypertension artérielle des souris diabétiques. Pression diastolique moyenne (A) et pression systolique moyenne (B) mesurées à la queue à l'aide du système CODA®. \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$  (test  $t$  de Student, non apparié). Les données sont représentées par moyenne  $\pm$  SEM ( $n = 8$ ).

liée à l'augmentation des marqueurs pro-inflammatoires circulants, tels que cela a été décrit, à la fois dans un contexte de MP que de syndrome métabolique [13].

La CRP, produit de réaction de la phase inflammatoire aiguë, est un facteur de risque cardiovasculaire [19]. Une CRP élevée a été associée à un risque accru de MCV, et surtout à la présence et au développement de l'hypertension [18]. Par ailleurs, des niveaux élevés de CRP sont associés aux dysfonction et rigidité endothéliales artérielles [20]. Il a été récemment montré que le traitement parodontal améliore la dysfonction endothéliale et diminue les taux de CRP circulants [21]. Kim et al. ont suggéré que la CRP pourrait être un marqueur utile de la rigidité artérielle chez les patients hypertendus et une cible potentielle des thérapeutiques anti-hypertensives [22].

Par ailleurs, l'IL-6, inducteur majeur de l'activité des hépatocytes dans l'inflammation, à l'origine de la production de CRP, est associée au syndrome coronarien aigu [20] et à l'hypertension artérielle [20]. De plus, il est constaté une production de IL-6 majorée chez le patient diabétique atteint également de MP [23].

Il a été suggéré que le TNF- $\alpha$ , marqueur pro-inflammatoire majeur, particulièrement impliqué dans les troubles métaboliques et les maladies parodontales, régule l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique (NOs) et son activité. Le TNF- $\alpha$  diminue de manière significative l'expression NOs dans les cellules endothéliales [23,24] suggérant que le TNF- $\alpha$  diminue la vasodilatation régulée par le NO au niveau des artérioles coronaires de souris par exemple [25]. Picchi et al. [26] ont démontré que le dysfonctionnement endothélial chez le prédiabétique est le résultat des effets du TNF- $\alpha$  et de la production ultérieure de la NOs. La production de TNF- $\alpha$  sérique représente un risque accru d'hypertension artérielle.

La surproduction de médiateurs sériques de l'inflammation dans un contexte d'infection parodontale a été expliquée par le relargage systémique de dérivés bactériens particulièrement phlogogène, comme les LPS mais aussi par l'activation directe du système immunitaire. Nos résultats suggèrent que l'aggravation d'un désordre métabolique par une infection du parodonte est susceptible d'être médiée par un déséquilibre de la balance cytokinique au bénéfice de l'inflammation, du fait de l'endotoxémie résultante à la fois du passage intravasculaire de dérivés métaboliques des bactéries paropathogènes et à la fois de l'activation de l'immunité locale et systémique [6,27]. L'inflammation systémique associée au diabète peut alors aggraver des pathologies cardiovasculaires et semble donc se situer au carrefour de cette relation tripartite entre maladies métaboliques, MP et hypertension artérielle.

## 5. Conclusion

Nos résultats suggèrent qu'une infection parodontale est susceptible d'aggraver ou potentialiser un trouble métabolique en majorant l'hypertension artérielle. Le microbiote parodontal peut représenter une nouvelle cible thérapeutique pour une meilleure prise en charge de ces pathologies car la MP et son

implication systémique représentent un enjeu majeur de santé publique.

## Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

*Financement* : cette étude a été supportée en partie par une bourse de la Société française d'hypertension artérielle (SFHTA) et en partie par une bourse de la Société francophone de diabète (SFD). M. Serino est financé par European Commission's Seventh Framework programme sous l'agrément n° 241913 (FLORINASH) et par SFD-GlaxoSmithKline (GSK) ainsi que l'institut Benjamin Delessert.

## Remerciements

Nous remercions le Laboratoire de biologie du tissu osseux, Inserm U890-IFR 143-IFRESIS Saint-Étienne, pour son assistance technique lors des microscanners et Anne-Marie Blasco pour les corrections de la langue française.

## Références

- [1] Whitesall SE, Hoff JB, Vollmer AP, D'Alecy LG. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(6):H2408–15.
- [2] Tsioufis C, Kasiakogias A, Thomopoulos C, Stefanadis C. Periodontitis and blood pressure: the concept of dental hypertension. *Atherosclerosis* 2011;219(1):1–9.
- [3] Ricks J, Molnar MZ, Kovesdy CP, Shah A, Nissenson AR, Williams M, et al. Glycemic control and cardiovascular mortality in hemodialysis patients with diabetes: a 6-year cohort study. *Diabetes* [Internet] 2012. Consulté le : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22315308>.
- [4] Blaizot A, Vergnes JN, Nuwwareh S, Amar J, Sixou M. Periodontal diseases and cardiovascular events: meta-analysis of observational studies. *Int Dent J* 2009;59(4):197–209.
- [5] Pischon T, Hu FB, Rexrode KM, Girman CJ, Manson JE, Rimm EB. Inflammation, the metabolic syndrome, and risk of coronary heart disease in women and men. *Atherosclerosis* 2008;197(1):392–9.
- [6] Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23(7):1245–9.
- [7] Vlachopoulos C, Dima I, Aznaouridis K, Vasiliadou C, Ioakeimidis N, Aggeli C, et al. Acute systemic inflammation increases arterial stiffness and decreases wave reflections in healthy individuals. *Circulation* 2005;112(14):2193–200.
- [8] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444(7121):860–7.
- [9] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56(7):1761–72.
- [10] Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding. *Pathol Biol* 2008;56(5):305–9.
- [11] Løe H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16(1):329–34.
- [12] Nabet C, Lelong N, Colombier ML, Sixou M, Musset AM, Goffinet F, et al. Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: the case-control Epipap study. *J Clin Periodontol* 2010;37(1):37–45.

- [13] Saito T, Shimazaki Y. Metabolic disorders related to obesity and periodontal disease. *Periodontol* 2000;43:254–66.
- [14] Darré L, Vergnes JN, Gourdy P, Sixou M. Efficacy of periodontal treatment on glycaemic control in diabetic patients: a meta-analysis of interventional studies. *Diabetes Metab* 2008;34(5):497–506.
- [15] Graves DT, Fine D, Teng YTA, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 2008;35(2):89–105.
- [16] Giani JF, Muñoz MC, Pons RA, Cao G, Toblli JE, Turyn D, et al. Angiotensin-(1-7) reduces proteinuria and diminishes structural damage in renal tissue of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;300(1):F272–82.
- [17] Loos BG, Craandijk J, Hoek FJ, Wertheim-van Dillen PM, van der Velden U. Elevation of systemic markers related to cardiovascular diseases in the peripheral blood of periodontitis patients. *J Periodontol* 2000;71(10):1528–34.
- [18] Stumpf C, John S, Jukic J, Yilmaz A, Raaz D, Schmieder RE, et al. Enhanced levels of platelet P-selectin and circulating cytokines in young patients with mild arterial hypertension. *J Hypertens* 2005;23(5):995–1000.
- [19] Devaraj S, Siegel D, Jialal I. Statin therapy in metabolic syndrome and hypertension post-JUPITER: what is the value of CRP? *Curr Atheroscler Rep* 2011;13(1):31–42.
- [20] Sesso HD, Wang L, Buring JE, Ridker PM, Gaziano JM. Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women. *Hypertension* 2007;49(2):304–10.
- [21] Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, et al. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med* 2007;356(9):911–20.
- [22] Kim JS, Kang TS, Kim JB, Seo HS, Park S, Kim C, et al. Significant association of C-reactive protein with arterial stiffness in treated non-diabetic hypertensive patients. *Atherosclerosis* 2007;192(2):401–6.
- [23] Passoja A, Knuutila M, Hiltunen L, Karttunen R, Niemelä O, Raunio T, et al. Serum interleukin-6 may modulate periodontal inflammation in type 1 diabetic subjects. *J Clin Periodontol* 2011;38(8):687–93.
- [24] Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;293(2):H1115–21.
- [25] Gao X, Belmadani S, Picchi A, Xu X, Potter BJ, Tewari-Singh N, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in Lepr(db) mice. *Circulation* 2007;115(2):245–54.
- [26] Picchi A, Gao X, Belmadani S, Potter BJ, Focardi M, Chilian WM, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ Res* 2006;99(1):69–77.
- [27] Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, et al. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012;55(1):21–31.

**AUTEUR : Vincent Blasco-Baque**

**TITRE : Relation moléculaire bi-directionnelle entre diabète et maladie parodontale**

**DIRECTEURS DE THESE : Pr Rémy Burcelin et Dr Philippe Kémoun**

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : à Toulouse le lundi 08 juillet 2013**

---

**RESUME : L'évolution du mode de vie, et plus précisément les alimentations riches, contribuent à l'incidence croissante du diabète de type 2 dans le monde. De nouveaux concepts proposent l'implication des microbiotes bactériens dans le développement des maladies métaboliques. La maladie parodontale (MP) est une pathologie infectieuse à manifestation inflammatoire caractérisée par un microbiote bactérien. Les études épidémiologiques montrent une association entre maladie métabolique et MP sans explications biologiques. De ce fait, nous avons voulu étudier les mécanismes liant ces 2 pathologies. Dans une première approche, nous avons voulu étudier l'impact de l'état diabétique sur le parodonte. Nous avons montré que l'alimentation grasse induit le développement de la maladie parodontale via le récepteur aux LPS. De plus, la supplémentation par des œstrogènes présente un effet protecteur sur le développement du microbiote parodontal pathogène et l'inflammation parodontale. Dans la deuxième approche, nous avons proposé que la maladie parodontale soit un facteur de risque du diabète. Nous avons mis au point un modèle de maladie parodontale chez la souris et l'avons soumis à un stress nutritif. Nous avons constaté que cette pathologie buccale impactait la tension artérielle, le bilan lipidique, l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline. De plus, nous avons montré que le système immunitaire était affecté par la maladie parodontale et présentait un lien avec la gravité de l'état diabétique. Le lien entre MP et diabète présente une voie importante de perspectives de recherche à la fois fondamentale et clinique.**

---

**TITRE: Bidirectional and molecular relationship between diabetes and periodontal disease**

---

**MOTS-CLES : Diabète, maladie parodontale, LPS, œstrogènes, inflammation, réaction immunitaire, régime gras, microbiote parodontal**

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : BSB Physiopathologie**

---

**INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE : INSERM UMR1048-I2MC Equipe « Intestinal Risk Factors, Diabetes and Dyslipidemia » Bat L4 Hôpital Rangueil 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225 31432, Toulouse Cedex 4 et L.U. 51 « Maladies parodontales, déséquilibres systémiques et**



**biomatériaux (MPDSB)» Université Paul Sabatier, Faculté de Chirurgie Dentaire, 3, chemin des Maraîchers 31062 Toulouse Cedex, France.**