

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat
EN MICROBIOLOGIE
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

Etude des mécanismes d'adhésion de *Porphyromonas gingivalis* : approches physico-chimique et moléculaire

Présenté par: Amina DERRADJIA

Directeur de thèse : M. Djeribi Ryad

Professeur, Université d'Annaba

Membres de jury :

Président : M. Chekireb Djamel

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs : Mme Hassaine Hafida

Professeur, Université de Tlemcen

M. Houhamdi Moussa

Professeur, Université de Guelma

Année universitaire: 2016/2017

A mes nièces

Ines et Lina

Mes deux petites princesses

Remerciements

Je commence par remercier **Dieu le Tout Puissant** qui m'a donné la capacité et la force de réaliser et d'achever ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent :

A monsieur le Professeur Djeribi Ryad, mon directeur de thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail, pour m'avoir apporté un appui constant, pour sa disponibilité, son soutien et pour sa générosité de répondre à mes questions avec une grande compréhension. Je vous remercie pour tous vos efforts.

A monsieur le Professeur Chekireb Djamel, pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon respect.

A madame le Professeur Hassaine Hafida, je vous suis extrêmement reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail. Mes sincères remerciements.

A monsieur le Professeur Houhamdi Moussa, je vous suis profondément reconnaissante d'avoir accepté de siéger à ce jury. Mes sincères remerciements.

A monsieur le Professeur Rouabhia Mahmoud, de m'avoir accueillie dans son laboratoire d'immunologie et de biologie cellulaire à la faculté de médecine dentaire de l'université Laval, Québec, Canada. Merci de m'avoir orientée, assistée et pour le temps précieux que vous m'avez accordé. Vous trouvez ici le témoignage de ma profonde gratitude

A madame Merad Asma-Saida, de m'avoir accueillie dans son laboratoire d'anaérobies et du botulisme de l'institut Pasteur d'Algérie. J'aimerais particulièrement souligner ses qualités humaines et sa disponibilité. Recevez l'expression de ma reconnaissance pour toute l'attention que vous m'avez manifestée.

A monsieur le professeur Seridi Ahcène, monsieur le professeur **Mayoufi Moussa** ainsi que monsieur **Daroui Ahmed**, pour leurs innombrables conseils, leur aide et pour leur soutien sur le plan humain.

A tous les membres du laboratoire du Pr Rouabhia, en particulier Park Hyunjin, Alanazi Hamidah et Salem Mabrouka. Un grand merci pour leur accueil chaleureux, leur sympathie, leur amitié sincère ainsi que pour la très bonne ambiance de travail qu'ils m'ont offerts.

Je tiens également à exprimer ma gratitude envers Azelmat Jabrane, Professionnel de recherche, Groupe de recherche en écologie buccale à la faculté de médecine dentaire de l'université Laval, Québec, Canada, pour ses conseils scientifiques, son aide et pour sa précieuse amitié.

A tous les membres du laboratoire d'anaérobies et du botulisme de l'institut Pasteur d'Algérie, avec qui le travail a été très agréable et très efficace.

Je remercie aussi le personnel du service de parodontologie du Centre Hospitalo-Universitaire de Beni Messous d'Alger, de m'avoir acceptée dans leur service et pour leur aide.

Je remercie également mes collègues du laboratoire : Majda, Warda, Samara et Nouha avec qui j'ai partagé mes années de thèse. Merci pour tous les conseils et les discussions à propos de la thèse. Un très grand merci va aussi à Bouaziz Sarra pour son aide précieuse et surtout pour sa très grande gentillesse.

A ma chère Ilhem et son époux Salim à qui j'exprime ma profonde reconnaissance et mes remerciements les plus chaleureux pour leur appui, bonté, l'accueil et l'hospitalité dont ils ont fait preuve envers moi lors de mes deux séjours à Montréal, ils étaient plus qu'une famille pour moi.

A tous mes proches et amies, à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail. Merci sincèrement à tous et à toutes.

Enfin, un merci tout spécial à mes parents, mes deux frères, ma sœur et son mari, sans qui ce travail n'aurait jamais été possible. Je les remercie chaleureusement pour leurs encouragements tout au long de ma thèse, leur confiance inconditionnelle, leur compréhension et leur soutien inestimable.



Table des matières

TABE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie 1. Synthèse bibliographique	3
1.1. Le biofilm dentaire	3
1.1.1. Définition.....	3
1.1.2. Formation du biofilm.....	4
1.1.3. Classification du biofilm dentaire.....	7
1.1.4. Diversité bactériennes de la plaque sous-gingivale.....	8
1.2. Mécanismes biologiques de l'adhésion bactérienne	9
1.2.1. Le transport.....	9
1.2.2. L'adhésion initiale.....	10
1.2.3. L'attachement.....	13
1.3. L'espèce <i>Porphyromonas gingivalis</i>	16
1.3.1. Caractéristiques de l'espèce.....	16
1.3.2. Facteurs bactériens de virulence.....	16
1.3.3. Réponse de l'hôte.....	21
1.4. Les maladies parodontales	23
1.4.1. Structure du parodonte.....	23
1.4.2. Définition des maladies parodontales.....	25
1.4.3. Classification des maladies parodontales.....	25
1.5. La vitamine E	28
1.5.1. Définition.....	28
1.5.2. La fonction anti-oxydante de la vitamine E.....	29

Partie 2. Matériels et Méthodes	30
2.1. Isolement et identification de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	30
2.1.1. Prélèvements.....	30
2.1.2. Transport des échantillons.....	30
2.1.3. Isolement et purification de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	31
2.1.4. Pré-identification de <i>Porphyromonas gingivalis</i>	31
2.1.5. Identification biochimique.....	31
2.1.6. Etude de la sensibilité de <i>P. gingivalis</i> aux antibiotiques.....	32
2.1.7. Conservation des souches isolées.....	33
2.2. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur la croissance de <i>P. gingivalis</i>	33
2.2.1. Effet du pH sur la croissance de <i>P. gingivalis</i>	33
2.2.2. Effet de la ménadione sur la croissance de <i>P. gingivalis</i>	33
2.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance de <i>P. gingivalis</i>	34
2.3. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur les caractéristiques pariétales de <i>P. gingivalis</i>	34
2.3.1. Préparation des suspensions bactériennes.....	34
2.3.2. Détermination de l'hydrophobicité de la paroi de <i>P. gingivalis</i>	35
2.3.3. Adhésion microbienne aux solvants (MATS).....	37
2.4. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur l'adhésion et la formation du biofilm de <i>P. gingivalis</i>	38
2.4.1. Préparation des suspensions bactériennes.....	38
2.4.2. Adhésion et formation du biofilm sur microplaque.....	38
2.4.3. Quantification de la biomasse fixée.....	39
2.5. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur les fibroblastes gingivaux stimulés avec le lipopolysaccharide de <i>P. gingivalis</i>	41
2.5.1. Culture des cellules fibroblastiques gingivales.....	41
2.5.2. Préparation du lipopolysaccharide de <i>P. gingivalis</i>	42

2.5.3. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées ou non avec le LPS de <i>P. gingivalis</i>	44
2.5.4. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés ou non avec le LPS de <i>P. gingivalis</i>	45
2.5.5. Mesure des cytokines et des peptides antimicrobiens après le contact des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol et le LPS de <i>P. gingivalis</i>	46
2.5.6. Migration des fibroblastes gingivaux «scratch test».....	47
2.5.7. Analyses statistiques.....	47
Partie 3. Résultats et discussion	48
Conclusion	87
Résumé	
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste d'abréviation

ATCC	American Type Culture Collection
BATH	Bacterial Adhesion to hydrocarbon
BHIB-HK	Bouillon cœur cerveau -hémine/vitamine k
BHIB-H	Bouillon cœur cerveau -hémine
cm ²	Centimètre carré
CT	Colistine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	Sérum foetal bovin
g	Gramme / unité de gravité
H	Heure
HBD-1	Beta-défensine-1 humaine
HBD-2	Beta-défensine-2 humaine
HCl	acide chlorhydrique
IL-1 β	Interleukine-1 beta
IL-6	Interleukine-6
K	Kanamycine
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molaire
m ²	Mètre carré
MATS	Microbial Adhesion To Solvents
MATH	Microbial Adhesion To Hydrocarbon
mg	Milligramme
mj	milijoule
ml	Millilitre
mm	Millimètre
mM	Millimolaire
MTT	3-(4, 5-diethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
N	Normalité/ Azote
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
nm	Nanomètre

PBS	Tampon phosphate saline
O	Oxygène
P	La valeur P
pg	picogramme
rpm	Révolutions par Minute
SD	Ecart type
SFM	Société française de microbiologie
U	Unité
UFC	Unité Formant Colonie
VA	Vancomycine
°C	Degré Celsius
µg	Microgramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
µM	Micromolaire
γ^{LW}	Composantes van der Waals
γ^+	Composante accepteur d'électrons
γ^-	Composante donneur d'électrons

Liste des figures

N° de la figure	Titre	Page
1	Schématisation du biofilm dentaire.	3
2	Organisation de la flore parodontale.	5
3	Étapes de la formation et de la dispersion du biofilm bactérien.	7
4	Représentation schématique de la composition des complexes bactériens et de leur organisation au sein d'un biofilm sous-gingival.	9
5	Les étapes de formation du biofilm dentaire.	15
6	Représentation schématique des tissus de soutien de la dent.	23
7	Présentation schématique du parodonte sain et pathologique	25
8	Structure chimique de tocophérols et tocotriénols.	28
9	Galerie biochimique API 20A.	32
10	Préparation de la suspension bactérienne.	35
11	Présentation schématique du test BATH.	36
12	Présentation schématique des tests <i>in vitro</i> d'adhésion et de formation du biofilm.	40
13	Présentation schématique du protocole expérimental de la culture des fibroblastes gingivaux.	43
14	Principe de la réaction de réduction du MTT.	45
15	Aspect macroscopique de <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	48
16	Observation microscopique de <i>Porphyromonas gingivalis</i> au microscope à contraste de phase (Grossissement x 100).	49
17	Observation microscopique de <i>Porphyromonas gingivalis</i> au microscope photonique (Grossissement x 100).	49
18	Détermination de l'effet du pH sur la croissance de <i>P. gingivalis</i> .	52
19	Détermination de l'effet de la ménadione sur la croissance de <i>P. gingivalis</i>	53
20	Détermination de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance de <i>P. gingivalis</i> .	55
21	Détermination de l'effet du pH sur l'hydrophobicité de <i>P. gingivalis</i> .	57
22	Détermination de l'effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de <i>P. gingivalis</i> .	59

23	Détermination de l'effet de l'alpha-tocophérol sur l'hydrophobicité de <i>P. gingivalis</i> .	60
24	Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de <i>P. gingivalis</i> en fonction du pH.	63
25	Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de <i>P. gingivalis</i> en fonction de la ménadione.	66
26	Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de <i>P. gingivalis</i> en fonction d'alpha-tocophérol.	68
27	Détermination de l'effet du pH sur la capacité d'adhésion de <i>P. gingivalis</i>	69
28	Détermination de l'effet du pH sur la formation du biofilm de <i>P. gingivalis</i> .	70
29	Détermination de l'effet de la ménadione sur la capacité d'adhésion de <i>P. gingivalis</i> .	72
30	Détermination de l'effet de la ménadione sur la formation du biofilm de <i>P. gingivalis</i> .	72
31	Observation macroscopique des tapis cellulaires des fibroblastes gingivaux colorés au cristal violet.	73
32	Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé.	74
33	Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé.	75
34	Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS de <i>P. gingivalis</i> .	76
35	Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de <i>P. gingivalis</i> .	77
36	Sécrétion d'interleukine-1 β par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de <i>P. gingivalis</i> .	78
37	Sécrétion d'interleukine-6 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de <i>P. gingivalis</i> .	79
38	Sécrétion de HBD-1 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de <i>P. gingivalis</i> .	81
39	Sécrétion de HBD-2 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-	81

	tocophérol et le LPS du <i>P. gingivalis</i> .	
40	Cicatrisation des fibroblastes sous l'effet de l'alpha-tocophérol après 12 heures de l'induction de la plaie.	84
41	Taux de la cicatrisation des fibroblastes sous l'effet d'alpha-tocophérol.	85

Liste des tableaux

N° du tableau	Titre	Page
1	Antibiotiques testés et familles d'appartenance.	32
2	Composantes van der Waals (γ LW), accepteur d'électrons (γ +) et donneur d'électrons (γ -) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS	37
3	Résultats de l'identification biochimique à l'aide des galeries API 20 A	50
4	Profil de résistance de <i>P. gingivalis</i> aux antibiotiques testés.	51
5	Evolution de la croissance de <i>P. gingivalis</i> en fonction du pH.	51
6	Evolution de la croissance de <i>P. gingivalis</i> en fonction de la ménadione	53
7	Evolution de la croissance de <i>P. gingivalis</i> en fonction d'alpha-tocophérol.	55
8	Résultats du test MATS en fonction du pH.	62
9	Résultats du test MATS en fonction de la ménadione.	65
10	Résultats du test MATS en fonction d'alpha-tocophérol.	67

Introduction

Introduction

La cavité buccale représente un écosystème complexe dont la microflore résidente est très diversifiée. L'interaction directe ou indirecte entre la communauté microbienne et les tissus buccaux entraîne une forme de stabilité où les deux vivent en harmonie et en équilibre avec leur environnement (Socransky et Haffajee, 2005).

La microflore buccale se constitue progressivement avec l'âge, elle est principalement composée de bactéries, appartenant à plus de 700 espèces différentes (Socransky *et al.*, 1998; Aas *et al.*, 2005; Holt et Ebersole, 2005).

Les accumulations bactériennes à l'intérieur de cet écosystème se présentent majoritairement sous forme de biofilms (Socransky *et al.*, 1998; Socransky et Haffajee, 2005). Ce dernier apparaît comme une véritable entité écologique hautement organisée, permettant les échanges et les communications entre les différentes espèces bactériennes (Roman *et al.*, 2006). Ce mode d'organisation dynamique de la flore microbienne présente un élément essentiel de l'étiopathogénèse des maladies parodontales.

Les maladies parodontales constituent un problème de santé publique majeur compte tenu de leur fréquence relativement élevée dans la population (Roman *et al.*, 2006) et de leurs conséquences sur la perte de l'organe dentaire fonctionnels et leur association aux pathologies générales (maladies cardio-vasculaires, pneumopathies et des accouchements prématurés) (Teng *et al.*, 2002). L'initiation et la progression des parodontites dépend fortement de la virulence des bactéries parodontopathogènes modulée par la réponse immunitaire exagérée de l'hôte (O'Brien-Simpson *et al.*, 2004 ; Holt et Ebersole, 2005).

Elles sont reconnues comme des infections polymicrobiennes (Taba Jr *et al.*, 2012) dont l'espèce *Porphyromonas gingivalis*, un pathogène parodontal du complexe rouge (*P. gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et *Tannerella forsythensis*) est fortement impliquées dans la pathogénicité de ces maladies (Socransky *et al.*, 1998 ; Holt et Ebersole, 2005 ; Ximenez-Fyvie *et al.*, 2006; Ardila *et al.*, 2015). *P. gingivalis* exprime plusieurs facteurs contribuant à sa virulence lui permettant entre autres d'adhérer puis coloniser les sites sous-gingivaux, provoquer la destruction tissulaire et contourner les systèmes de défense de l'hôte. C'est pourquoi un contrôle efficace de cette bactérie est associé à une amélioration des conditions de la pathologie.

L'adhésion constitue l'étape initiatrice de la formation du biofilm bactérien. Elle met en jeu un certain nombre de mécanismes physicochimiques et biologiques complexes (Baillif *et al.*, 2009). Pour l'hôte humain, la capacité d'une bactérie d'adhérer est un facteur certain de virulence, de ce fait la compréhension de cette étape charnière et des mécanismes qui la régissent est primordiale à fin de définir de nouvelles stratégies pour prévenir les pathologies parodontales et les prendre en charge une fois installées.

En outre, au cours de ces dernières décennies plusieurs travaux se sont penchés et focalisés sur l'étude de composés naturels dotés de propriétés (antibactérienne, anti-inflammatoire, etc.) et vue l'efficacité limitée de l'antibiothérapie, l'identification de nouveaux composés alternatifs aux médicaments classiques capable de moduler la virulence de *P. gingivalis* s'avère donc d'intérêt.

Dans cette optique, notre travail a porté sur les objectifs suivant:

- Etude des propriétés physico-chimiques de la surface de *Porphyromonas gingivalis* impliqué dans le phénomène d'adhésion sous l'influence de différents paramètres.
- Détermination de la capacité d'adhésion et du pouvoir de formation du biofilm de *P. gingivalis* sous différentes conditions de culture.
- Etude du comportement (morphologie, croissance et composante inflammatoire) des cultures de fibroblastes gingivaux primaires en réponse à la stimulation par le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*.
- Evaluation de l'effet de l'alpha-tocophérol sur l'adhésion bactérienne et sur le pouvoir pathogène de *P. gingivalis*:



Synthèse
bibliographique

Partie 1. Synthèse bibliographique

1.1. Le biofilm dentaire

1.1.1. Définition

Au 17^{ème} siècle un drapier hollandais du nom Antonie Von Leeuwenhoeke observait pour la première fois la plaque dentaire à l'aide d'un système de microscope rudimentaire (Arampatzi *et al.*, 2011; Duffau, 2014). La plaque dentaire était probablement le premier biofilm à avoir été étudié en termes de composition microbienne ou sa sensibilité aux agents antimicrobiens.

La plaque dentaire, appelée aussi biofilm dentaire (Kolenbrander, 2011), est l'un des biofilms les mieux étudiés (Marsh, 2009). On peut la définir comme étant une accumulation hétérogène complexe composée d'une communauté bactérienne attachée à la surface des dents ou aux espaces gingivo-dentaires (l'émail, le ciment, les tissus épithéliaux mous) et enrobée dans une matrice extracellulaire de polymères d'origine microbienne et salivaire (Donlan et Costerton, 2002; Roman, 2006). Cette matrice peut représenter de 50% à 90% de la matière organique totale des biofilms (Flemming et Wingender, 2010; Arampatzi *et al.*, 2011).

Les biofilms sont des systèmes dynamiques structurellement complexes dont la formation représente un mode de vie permettant aux microorganismes non seulement de survivre dans des conditions environnementales hostiles et de coloniser de nouvelles niches mais aussi il favorise la collaboration métabolique et les échanges nutritionnels entre les différents membres de cette communauté (Hall–Stoodley *et al.*, 2004; Tremblay *et al.*, 2014).

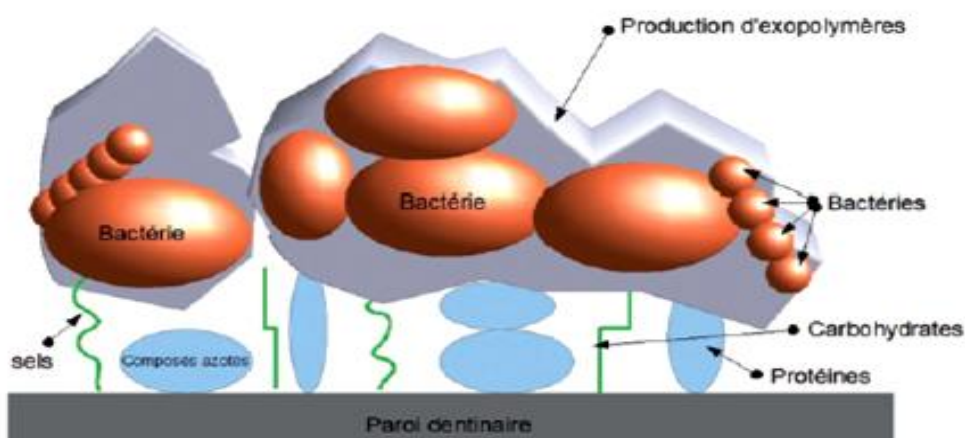


Figure 1. Schématisation du biofilm dentaire (Gouet, 2011).

1.1.2. Formation du biofilm

1.1.2.1. Formation de la pellicule acquise exogène (PAE)

La première étape de la formation du biofilm dentaire est la formation de la pellicule acquise exogène, que les biologistes qualifient aussi de « biofilm salivaire ». Cette PAE va jouer le rôle de film de conditionnement. L'attachement bactérien se voit, par conséquent, grandement facilité (Pellat *et al.*, 2002; Simain *et al.*, 2010; Duffau, 2014).

Ce film se forme naturellement et spontanément à la surface des dents après le brossage, par l'absorption sélective de protéines et d'autres macromolécules provenant de la salive ou du fluide crevulaire (Hannig et Joiner, 2006; Duffau, 2014). L'épaisseur de ce dépôt acellulaire, amicrobien varie entre 0,05 et 1µm.

Les glycoprotéines salivaires constituent 98% de la composante protéique de la PAE. (Hannig et Joiner, 2006). D'autres constituants comme les phosphoprotéines, les immunoglobulines (IgA, IgG) (Marsh et Martin, 2009), les mucines de poids moléculaire élevé (Haïkel, 2001), le lysozyme, l'albumine, l' α amylase, la glycosyl-transférase, les cystatines, la lactoferrine, l'anhydrase carbonique, les phosphoprotéines riches en prolines (PRPs), la stathérine, l'acide sialique et les sucres (galactose, mannose et glucose) participent également à la formation de la PAE.

Ce film protéique joue un rôle déterminant vis-à-vis de l'émail en le protégeant de la déminéralisation et en assurant une perméabilité sélective qui retarde la diffusion des acides (Pellat *et al.*, 2002).

1.1.2.2. Adhérence et colonisation bactérienne

Les micro-organismes sont généralement transportés passivement à la surface de la dent par l'écoulement de la salive. Ils adhèrent réversiblement à la pellicule acquise exogène, par l'intermédiaire de forces réversibles électrostatiques (répulsives) et celles de van der Waals (attractives) (Pellat *et al.*, 2002; Marsh et Martin, 2009) ou à la surface d'autres bactéries grâce à une adhésion spécifique, irréversible, par l'intermédiaire de connexions ligand contre récepteur (Kolenbrander *et al.*, 2002; Kolenbrander *et al.*, 2006; Duffau, 2014).

La colonisation de la pellicule acquise exogène est progressive. Les bactéries les plus précoces dites « pionnières » trouveront sur la surface dentaire de nombreux récepteurs contenus dans la pellicule. Les colonisateurs pionnières sont principalement des bactéries à Gram positif telles que *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*,

Streptococcus sanguinis ou encore *Actinomyces naeslundii* (Kolenbrander *et al.*, 2002; Kolenbrander *et al.*, 2006).

Les bactéries pionnières résistent aux fortes concentrations en oxygène et aux mécanismes d'élimination de la cavité buccale. Leur croissance s'accompagne de la modification et la création de nouvelles conditions environnementales (comme par exemple une diminution de la disponibilité en O₂) plus adaptées au métabolisme de certaines bactéries. Cela favorise alors le recrutement de nouvelles espèces: c'est les colonisateurs secondaires (Marsh et Martin, 2009).

C'est une deuxième vague de colonisation qui peut alors se mettre en place, trouvant sur ce lit bactérien de nouveaux moyens d'adhésion. Ces colonisateurs secondaires sont toujours considérés comme précoces, parmi lesquels figurent des bactéries telles qu'*Eikenella corrodens* ou *Capnocytophaga ochracea*, qui seront ensuite suivis de colonisateurs tardifs comprenant les parodontopathogènes les plus fréquemment suspectés (Duffau, 2014).

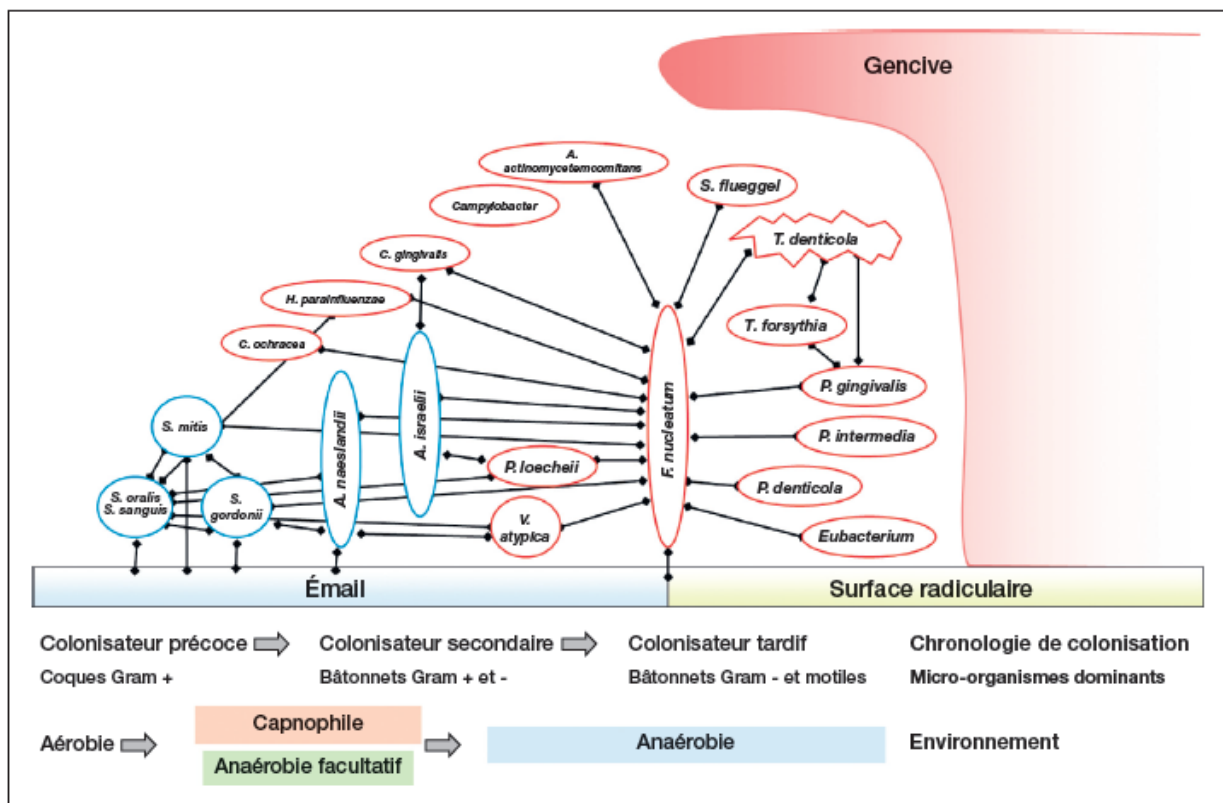


Figure 2. Organisation de la flore parodontale (Duffau, 2014).

1.1.2.3. Maturation

Lors de cette phase, on observe une modification importante de la taille du biofilm, résultat de nombreuses multiplications bactériennes. La matrice extracellulaire augmente en épaisseur avec des modifications des gradients d'oxygène, de substrats, voire de pH. Des mécanismes de communication intercellulaire s'installent durablement, la bactérie est ainsi informée de la densité et des interactions cellulaires dans son proche environnement. C'est le concept du «quorum sensing» (Simain *et al.*, 2010).

A ce stade, la plaque dentaire constitue une « véritable barrière de diffusion », en limitant l'entrée de certains composés comme les antimicrobiens contenus dans les dentifrices, elle a ainsi une sensibilité moindre à ces produits. De plus, elle provoque la rétention des produits du métabolisme bactérien (Rouch, 2015).

1.1.2.4. Dissémination

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu. Il s'agit du stade de dispersion, des formes planctoniques sont relarguées dans le milieu extérieur à partir du biofilm (Clutterbuck, 2007). Les bactéries libérées vont coloniser de nouvelles niches écologiques et par conséquent la formation d'autres biofilms aura lieu (Pantaléon, 2015).

Le décrochage des bactéries du biofilm peut être un phénomène passif ou actif. Lorsque le phénomène est passif, les bactéries peuvent se détacher de façon continue, en petites quantités : on parle d'« érosion » du biofilm. En revanche, on peut assister à un détachement massif et rapide « en lambeaux », où des mécanismes moléculaires sont mis en place afin d'induire le détachement des micro-organismes (Donlan, 2002; Wijman *et al.*, 2007; Arampatzi *et al.*, 2011). Les formes planctoniques ainsi libérées peuvent conserver des caractéristiques du biofilm, comme l'antibio-résistance (Donlan, 2002).

Des facteurs intrinsèques au biofilm comme la présence de bactériophages, de molécule du *quorum-sensing*, de surfactants ou d'acides aminés, peuvent induire le détachement des bactéries du biofilm (Kaplan, 2010; McDougald *et al.*, 2012; Pantaléon, 2015).

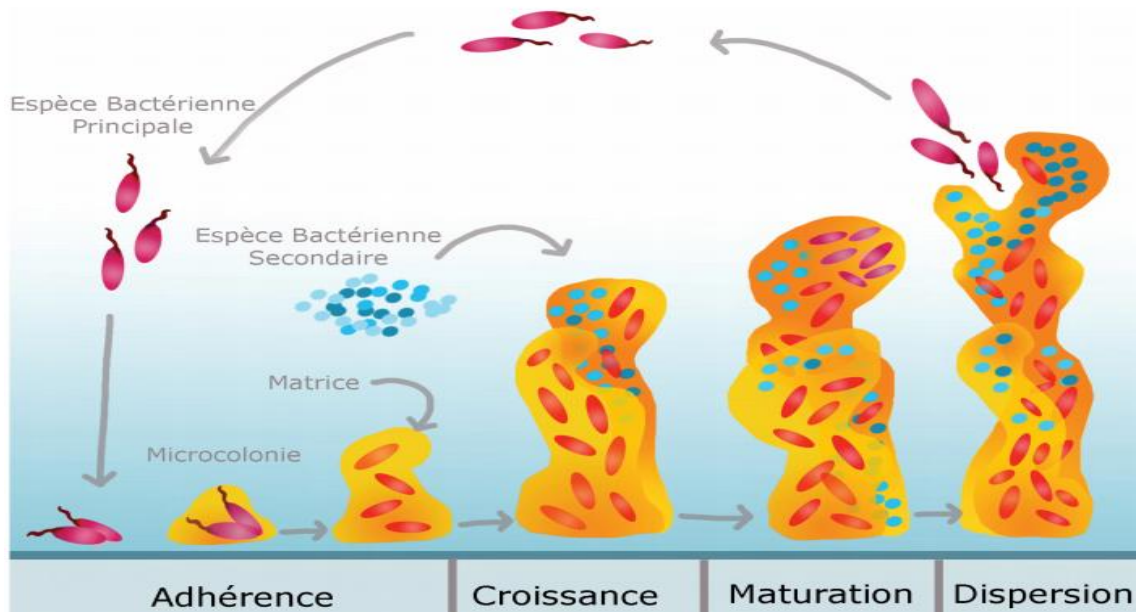


Figure 3.  tapes de la formation et de la dispersion du biofilm bactérien (Tremblay *et al.*, 2014).

1.1.3. Classification du biofilm dentaire

Deux types de plaque en fonction de leur localisation anatomique sont décrits : la plaque supra-gingivale impliquée dans la pathologie carieuse et la plaque sous-gingivale associée aux pathologies gingivales et parodontales (Haikel, 2001; Joachim et Charon, 2011).

1.1.3.1. Plaque supra-gingivale

Elle est surtout aérobie et baignée par la salive. Le premier stade de formation de la plaque supra-gingivale consiste en un dépôt de glycoprotéines salivaires sur les surfaces des tissus, nommé pellicule acquise exogène. Les premières bactéries qui se déposent sur la surface des dents au niveau supra-gingival sont principalement des bactéries à Gram positifs (*Streptococcus sp.*, *Actinomyces sp.*) qui vont adhérer définitivement à la pellicule acquise exogène.

Les métabolites de la flore bactérienne provoquent une augmentation de l'exsudation et la migration des leucocytes dans l'épithélium jonctionnel. Ce relâchement permet aux bactéries d'accéder plus facilement à l'espace entre la dent et la gencive et de provoquer des gingivites et la formation de poches gingivales (Wolf *et al.*, 2004; Bibette, 2013).

La composition de la flore supra-gingivale va influencer grandement la composition de la plaque sous-gingivale.

1.1.3.2. Plaque sous-gingivale

La plaque sous-gingivale se forme dans un environnement baigné par le fluide crévicaire dont la teneur en oxygène est faible, ce qui favorise le développement d'espèces bactériennes anaérobies. Le nombre de bactéries à Gram négatifs sous la gencive augmente, de même que la profondeur de sondage.

Des agrégats plus lâches de bactéries en parties mobiles non adhérentes (avec une forte proportion d'anaérobies et de spirochètes) sont rencontrés dans la poche. Du tartre peut également se former à partir de cette plaque (Wolf *et al.*, 2004; Bibette, 2013).

1.1.4. Diversité bactériennes de la plaque sous-gingivale

Les bactéries sous-gingivales sont rarement des colonisateurs uniques. Cette microflore est le plus souvent très diversifiée et organisée en complexes (Roman *et al.*, 2006).

Les travaux de Socransky et collaborateurs (Socransky *et al.*, 1998) ont permis de définir des complexes bactériens spécifiques. Ces complexes bactériens sont représentatifs des différents stades de la maladie parodontale (Socransky *et al.*, 1998; Socransky et Haffajee, 2005) et révélateurs de formes cliniques (Roman *et al.*, 2006).

Socransky et Haffajee (Socransky et Haffajee, 2005) ont regroupé les principales espèces bactériennes occupant la niche sous-gingivale en cinq complexes:

- Le complexe jaune comprend les espèces *Streptococcus* incluant *S. oralis*, *S. sanguinis* et *S. gordonii*.
- Le complexe vert est constitué des espèces *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens* et *Capnocytophaga sp.*
- Le complexe mauve est composé de *Veillonella parvula* et d'*Actinomyces odontolyticus*. Les membres de ce complexe associés aux précédents représentent les colonisateurs primaires.
- Le complexe orange est composé des espèces *Fusobacterium sp.*, *Prevotella sp.*, *Campylobacter sp.*, *P. micros* et *Streptococcus constellatus*. Les bactéries de ce groupe secrètent les substances nutritives nécessaires pour l'agrégation de bactéries, la croissance et la maturation du biofilm.
- Le complexe rouge est composé des espèces *P. gingivalis*, *T. denticola* et *T. forsythia*. Le complexe rouge représente les colonisateurs tardifs, il est associé avec le complexe orange aux stades avancés des parodontites.

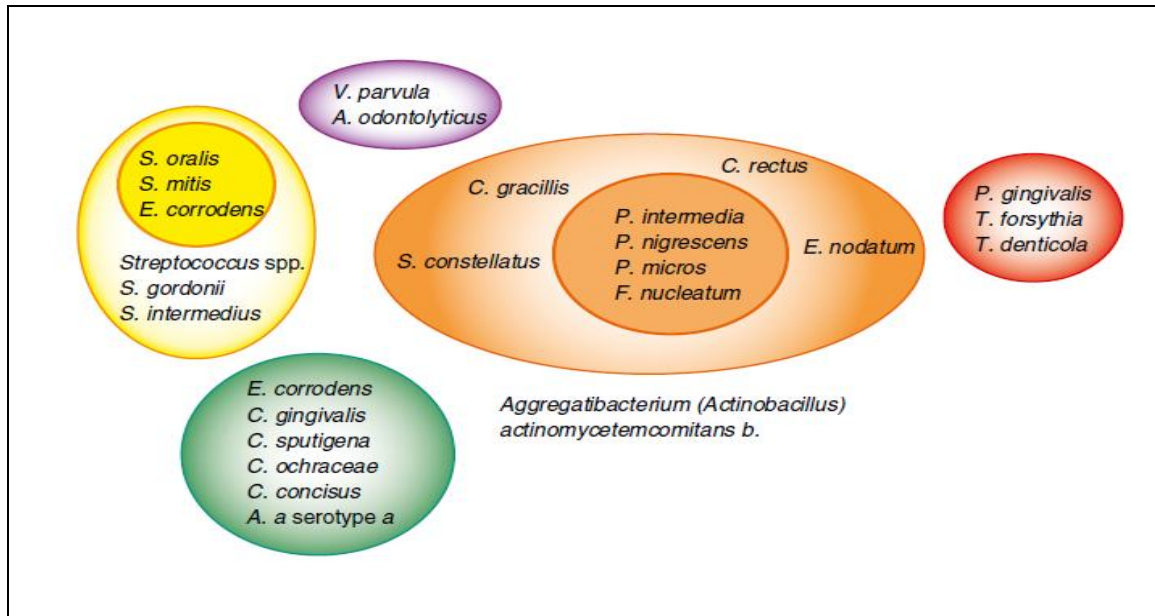


Figure 4. Représentation schématique de la composition des complexes bactériens et de leur organisation au sein d'un biofilm sous-gingival (Marsh et Martin, 2009).

1.2. Mécanismes biologiques de l'adhésion bactérienne

L'adhésion bactérienne sur un support est la première étape conduisant à la formation d'un biofilm bactérien. Elle met en jeu un certain nombre de mécanismes physicochimiques et biologiques complexes (Baillif *et al.*, 2010). L'adhésion peut se résumer en quatre étapes dynamiques successives:

1.2.1. Le transport

Le transport correspond à un transfert des bactéries à proximité de la surface réceptrice sur laquelle elles peuvent adhérer. L'origine de ces bactéries est soit le recrutement des cellules du milieu soit la redistribution des cellules issues de la phase de dispersion d'un biofilm situé à proximité (Branger *et al.*, 2012).

Le transfert des bactéries vers le support fait intervenir des phénomènes de nature physicochimique et biologique (An et Friedman, 1998; Katsikogianni et Missirlis, 2004; Branger *et al.*, 2012):

➤ **La diffusion passive:** Elle fait intervenir des mouvements browniens dus à l'agitation thermique, ce qui anime toutes les bactéries et leur permet un déplacement aléatoire à la vitesse moyenne de 40 µm par heure.

➤ **La sédimentation:** Elle est due aux forces de gravité, qui se produit par différence de gravité entre la bactérie et le fluide dans lequel elle se trouve (Fregaed, 1991; Branger *et al.*, 2012).

➤ **La convection:** Elle résulte de l'écoulement et les mouvements du fluide environnant. Le transport convectif semble être particulièrement important pour l'attachement des bactéries, un régime d'écoulement turbulent favorise l'adhésion en augmentant la probabilité de la rencontre entre la bactérie et la surface (Jacobs, 2007; Branger *et al.*, 2012).

➤ **La motilité:** Elle se définit par les mouvements propres autonomes de la bactérie, grâce à la présence sur sa surface de flagelles ou de pilis. Ce mécanisme peut être associé au chimiotactisme, qui permet aux bactéries de se rapprocher des surfaces (Jacobs, 2007; Branger *et al.*, 2012).

1.2.2. L'adhésion initiale

L'ensemble des bactéries et de la surface commencent à interagir l'un avec l'autre lorsque la distance qui les sépare est de 50 nm (Branger *et al.*, 2012); s'en suit d'une succession d'interactions de longue puis de courte distance, qui sont partiellement de nature physico-chimique. Cette phase d'adhésion est tout d'abord réversible puis devient irréversible (Jacobs, 2007).

1.2.2.1. Adhésion réversible

Dans de nombreux milieux biologiques, deux types d'interactions de longue distance sont décrits. Les bactéries sont tout d'abord attirées dans un minimum énergétique secondaire par des forces d'attraction : les forces de Van der Waals. Lorsque la distance de 20 nm est franchie, il apparaît des forces de répulsion électrostatiques (Branger *et al.*, 2012).

➤ Les forces de van der Waals

Ce sont des forces intermoléculaires de nature électrique, retenant ensemble des molécules et des atomes de deux corps et qui dépendent des attractions reliant les atomes et les molécules lorsqu'ils se rapprochent.

Ces forces ont une origine moléculaire résultant de l'interaction entre les électrons d'une molécule et les charges d'une autre. Les forces de van der Waals sont en général de faible intensité, elles diminuent rapidement avec la distance et il en existe trois natures résultant de trois effets physiques différents: effet d'orientation (force de Keesom), effet d'induction (forces de Debye) et effet de dispersion (forces de London) (Vergnault, 2004; Branger *et al.*, 2012).

- **Effet d'orientation** (interaction dipôle permanent / dipôle permanent) : une attraction entre deux molécules polaires.
- **Effet d'induction** (interaction dipôle permanent / dipôle induit) : une attraction entre une molécule polaire et une molécule non polaire.
- **Effet de dispersion** (interaction dipôle induit / dipôle induit) : une attraction entre deux molécules non polaires (Boutaleb, 2007; Branger *et al.*, 2012).

Les forces de Keesom et Debye sont négligeables en milieu aqueux, et seules les forces de London seront prises en compte par la suite. Ces forces appelées forces de Lifshitzvan der Waals sont universelles et interviennent quels que soient les corps considérés. Pour deux particules immergées dans un solvant, ces interactions vont intervenir entre la surface de la particule et le solvant, et entre les particules quand celles-ci sont suffisamment proches l'une de l'autre (Branger *et al.*, 2012).

Ces différentes interactions sont des forces d'attraction. Pour éviter l'interpénétration des nuages électriques des deux molécules, des forces de répulsion entrent en jeu, ce sont les forces électrostatiques.

➤ **Les forces électrostatiques de répulsion**

Les interactions électrostatiques interviennent dans le cas de composés chargés. L'immersion d'une particule, une bactérie ou une surface plane dans un fluide, lui acquiert, une charge de surface provoquée par l'adsorption ionique ou l'ionisation des groupements chargés présents en surface (Boutaleb, 2007). On observe alors une accumulation de contre-ions dans la zone entourant la particule, accumulation qui se traduit par la formation d'une double couche électrique (Fregaed, 1991).

Lorsque la surface de la bactérie, globalement chargée négativement, arrive en contact avec la surface du substratum, portant une charge de même signe, il se produit des interactions électrostatiques répulsives dues au chevauchement des deux couches superficielles chargées. (Fregaed, 1991).

L'épaisseur de la double-couche est inversement proportionnelle à la concentration en ions dans la phase aqueuse. Le pH du milieu, par son influence sur le nombre de groupements dissociés présents sur les surfaces, intervient également dans la valeur des interactions électrostatiques (Vergnault, 2004).

L'importance de ces événements initiaux n'est pas à négliger dans le développement du biofilm malgré la multitude d'événements ultérieurs qui auront lieu sur une échelle de temps beaucoup plus longue (Busscher *et al.*, 1995).

1.2.2.2. Adhésion irréversible

C'est une étape plus lente que la précédente, faisant appel à des interactions irréversibles de courte distance et à des énergies plus élevées (Branger *et al.*, 2012). Ces interactions interviennent lorsque la distance bactérie-substrat est proche du nanomètre (Fregaed, 1991). Ces interaction irréversibles aux quelles les bactéries sont soumises sont:

➤ **Les interactions électrostatiques**

Ces interactions apparaissent entre la surface des microorganismes et la surface réceptrice, elles sont dues au recouvrement des couches associées aux groupes chargés présents à la surface de la cellule microbienne et à ceux de la surface réceptrice (Boutaleb, 2007).

Ces interactions non sélectives se caractérisent par la formation de ponts par l'intermédiaire de cations divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+}) entre une charge négative de la bactérie et une charge négative du substratum. La charge négative de la surface bactérienne est fournie par l'acide lipotéichoïque pour les bactéries à Gram positif, et par le LPS des bactéries à Gram négatif. (Bonnaure Mallet *et al.*, 2006; Robin *et al.*, 2011).

➤ **Les interactions acide-base (accepteur/donneur d'électrons)**

Ces interactions permettent la formation de liaisons hydrogènes (interactions de Lewis). Ce sont des interactions de nature électrique forte, de courte distance, possibles lorsqu'un atome chargé négativement est en contact avec un atome d'hydrogène lié à un atome électronégatif (Branger *et al.*, 2012).

Un composé donné peut être hydrophile, c'est-à-dire capable d'intervenir avec des liaisons hydrogènes. Il existe différents degrés dans ce caractère, ce qui se traduit par l'existence d'interactions hydrophiles et hydrophobes plus ou moins importantes (Boutaleb, 2007).

➤ **Les interactions hydrophobes/hydrophiles**

▪ Attraction hydrophobe

Elles entrent en jeu lors d'une adhésion en milieu aqueux (Vergnault, 2004). L'hydrophobie est, dans cette définition, un terme utilisé pour rendre compte du comportement de molécules apolaires dans l'eau. Autour d'une particule hydrophobe, les molécules d'eau s'organisent en structure ordonnée (Vadillo-rodriguez *et al.*, 2003), cette organisation conduit à une baisse du désordre ou d'entropie, thermodynamiquement défavorable (Dague, 2006; Boutaleb, 2007).

L'eau va donc tendre à se dissocier de ce type de surface, ce qui se traduit par une énergie d'attraction hydrophobe et par conséquent la formation des liaisons entre les molécules apolaires. Cette attraction hydrophobe dépend de la nature des particules et de leur distance de séparation, cette interaction est effective à des distances de l'ordre de 10 nm et plus (Vergnault, 2004).

▪ Répulsion hydrophile

La répulsion hydrophile se produit entre particules dotées d'une forte affinité pour l'eau, qui se traduit par l'existence d'une couche d'eau liée à la surface et organisée en réseau (Vergnault, 2004).

Quand les deux surfaces hydratées s'approchent l'une de l'autre, la présence de cette eau liée induit une énergie de répulsion hydrophile. Cette répulsion hydrophile est également fonction de la nature des particules et de leur distance de séparation, mais elle est effective à des distances de l'ordre de 3 à 5 nm (Boutaleb, 2007).

1.2.3. L'attachement

Pour se maintenir sur les surfaces dentaires durant une longue période, les bactéries doivent être vivantes et capables d'exprimer un certain nombre de gènes conduisant à l'acquisition de nouvelles structures permettant l'établissement des liaisons de haute affinité. Ces éléments se révèlent importants dans la mise en place des interactions irréversibles ainsi que dans l'étape ultérieure de multiplication bactérienne, aboutissant à la formation d'un biofilm (Baillif *et al.*, 2010). Les interactions sont de deux ordres:

➤ Les interactions de type Adhésine-Récepteur

Les adhésines sont des protéines qui se fixent stéréochimiquement à des récepteurs de la PAE, essentiellement saccharidiques, en formant des ponts entre les deux surfaces (Jenkinson et Lamont, 1997). Certaines adhésines sont largement conservées chez les streptocoques oraux et sont susceptibles de jouer un rôle clé dans l'adhésion aux surfaces buccales.

La catégorie la plus connue d'adhésines bactériennes est représentée par les lectines qui sont retrouvées le plus fréquemment chez *Streptococcus mutans* (Fregaed, 1991).

Il existe également l'antigène I/II qui est constitué de protéines exprimées au niveau de la membrane des streptocoques commensaux oraux tels que *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. sanguinis*, (Jakubovics *et al.*, 2005). L'Ag I/II joue un rôle central dans la liaison à la glycoprotéine de la

salive intégrée dans la pellicule acquise exogène, cela favorise l'adhérence avec les streptocoques.

➤ **Les interactions de type Enzyme-Substrat**

L'exemple le mieux documenté est celui de *S. mutans*, cette bactérie produit des complexes enzymatiques: les Glycosyltransférases (GTF) (Bowen et Koo, 2011). Ces derniers sont intégrés à la surface de la bactérie et ils sont responsables de la synthèse des polymères de type glucane en présence de saccharose (Krzyściak *et al.*, 2014).

Ces glucanes sont fortement adhésifs, ils se fixent de manière spécifique aux récepteurs présents sur la PAE notamment les Glucan-Binding-Protein (GBP) (Lynch *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les récepteurs de la pellicule acquise exogène, au niveau des surfaces dentaires, autres que les GBP, on retrouve surtout des protéines riches en histidine et en Proline (PRP), le lysozyme et l'alpha-amylase (Jenkinson et Lamont, 1997).

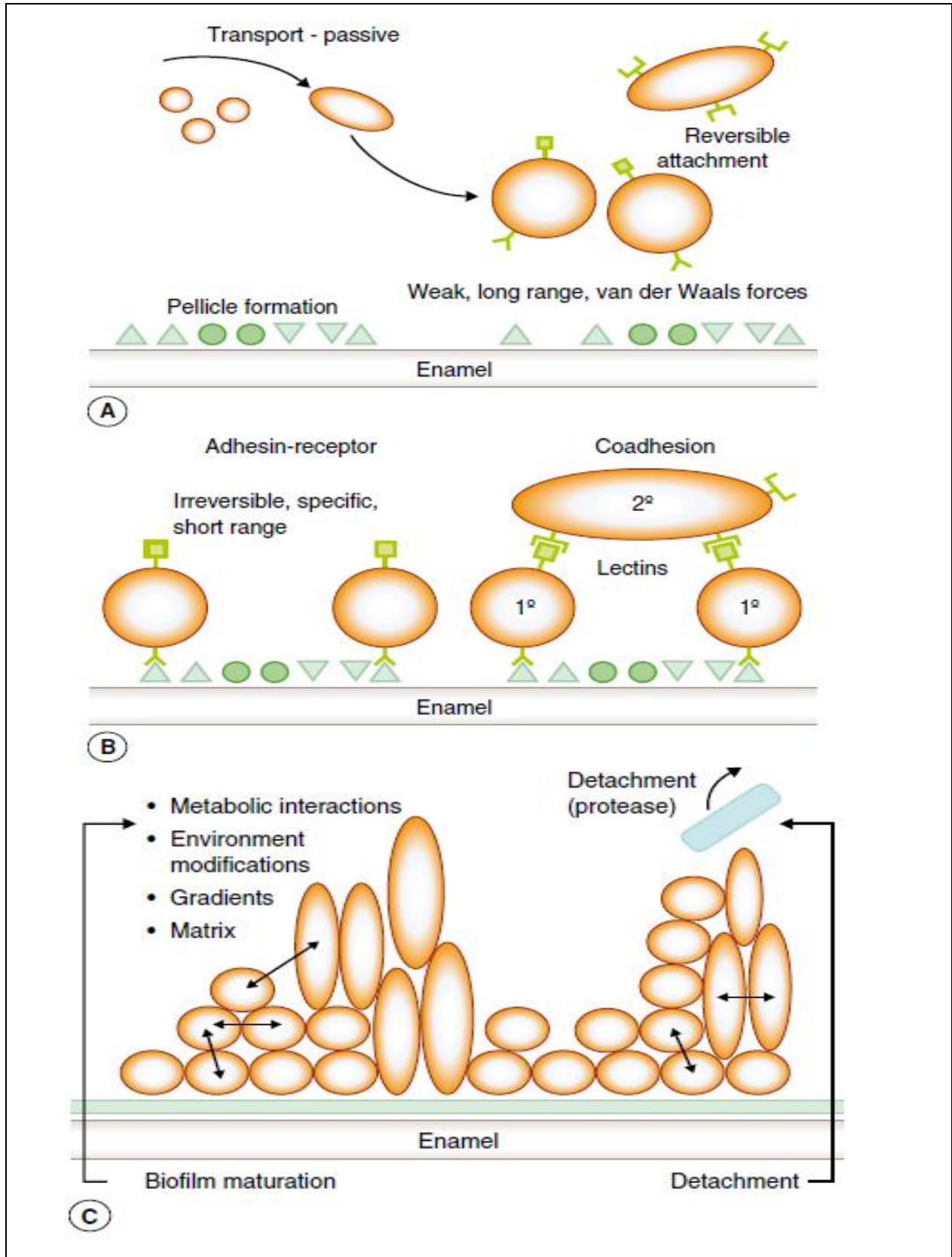


Figure 5. Les étapes de formation du biofilm dentaire (Marsh et Martin, 2009).

1.3. L'espèce *Porphyromonas gingivalis*

1.3.1. Caractéristiques de l'espèce

P. gingivalis est une bactérie à Gram négatif anaérobie stricte, appartenant à la famille des *Porphyromonadaceae*, ordre des *Bacteroidales* dans le phylum des *Bacteroidetes* connu anciennement sous le nom de *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB) (Nelson *et al.*, 2003). Cette bactérie est fréquemment rencontrée dans les biofilms associés aux sites sous-gingivaux, un environnement où la teneur en oxygène est faible.

Morphologiquement elle se présente sous forme de coccobacille, d'environ 2 µm de longueur et 1 µm de diamètre, isolée ou en courte chaînette. Sur gélose au sang, *P. gingivalis* a la particularité de former des colonies à pigmentation noire résultant de l'accumulation dans ses membranes de protoporphyrine dérivée de l'hémine contenue dans le milieu (Holt *et al.*, 1999; Gibson et Genco, 2006).

Ce microorganisme, comme la plupart des parodontopathogènes, est dit asaccharolytique, c'est-à-dire qu'il ne métabolise pas les sucres présents dans son environnement (Mouton et Robert, 1994; Gibson et Genco, 2006; Delost, 2014). Son fort pouvoir protéolytique lui permet d'utiliser les peptides et les acides aminés de son milieu comme source d'énergie et de carbone (Mouton et Robert, 1994; Dashper *et al.*, 2009).

Pour ce qui est de son implication dans les maladies parodontales, *P. gingivalis* est l'un des principaux agents étiologiques responsables de la parodontite (Holt et Ebersole, 2005; Greenwood *et al.*, 2012; Mysak, *et al.*, 2014). Cette bactérie représente le parodontopathogène le mieux caractérisé jusqu'à maintenant (Darveau, 2010; Cugini *et al.*, 2013).

1.3.2. Facteurs bactériens de virulence

La virulence d'un agent infectieux se définit comme la capacité d'un microorganisme à causer une maladie ou à interférer avec le métabolisme ou les fonctions physiologiques de l'hôte. Les facteurs de virulence des bactéries parodontopathogènes présentent les déterminants de son pouvoir pathogène (Holt *et al.*, 1999).

La multitude des facteurs exprimés leur permettent de coloniser efficacement l'espace gingivo-dentaire, de se multiplier et provoquer la destruction des tissus du parodonte (Amano, 2010). Ces facteurs leur donnent également la capacité d'échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (Kinane, 2000).

1.3.2.1. Les fimbriae

La capacité d'adhésion et de formation du biofilm par *P. gingivalis* est assurée en grande partie par les fimbriae, structures filamenteuses recouvrant la surface de la cellule bactérienne. Les fimbriae sont constitués par la juxtaposition d'une même protéine, la fimbrilline (Nagano *et al.*, 2012). *P. gingivalis* exprime deux fimbriae distincts, les fimbriae majeurs FimA *et* les fimbriae mineurs Mfa1 (Lin *et al.*, 2006).

Les fimbriae majeurs ont été proposés comme étant la première structure de la bactérie à entrer en contact avec les surfaces et les colonisateurs primaires (Enersen *et al.*, 2013).

En effet, FimA est responsable de la coadhésion à différentes bactéries par l'entremise de différents récepteurs comme la glycéraldéhyde-3-phosphate (GAPDH) déshydrogénase chez certains streptocoques (Park *et al.*, 2005).

Des mutants de *P. gingivalis* déficients en fimbriae n'adhèrent presque pas aux cellules eucaryotes (Weinberg *et al.*, 1997). Le fimbriae de *P. gingivalis* permet donc l'adhérence à des récepteurs spécifiques des cellules de l'hôte, en particulier les cellules épithéliales.

Le gène de FimA n'est présent qu'en une seule copie sur le chromosome de la bactérie (Nagano *et al.*, 2012) et la séquence protéique ne présente pas d'homologie avec d'autres protéines fimbriales (Enersen *et al.*, 2013).

Chez *P. gingivalis*, 6 types de FimA ont été identifiés, et il semblerait que la virulence de *P. gingivalis* soit influencée par le type de fimbriae exprimé (Enersen *et al.*, 2013).

Les fimbriae mineurs permettent eux aussi la coadhésion aux bactéries déjà présentes (Andrian *et al.*, 2006). Ces fimbriae proviennent du gène *mfa1* codant pour la sous-unité protéique Mfa. Cette dernière est nécessaire pour la reconnaissance entre *P. gingivalis* et *Streptococcus gordonii* (Lin *et al.*, 2006).

Les fimbriae sont immunogéniques modulant la production de cytokines pro-inflammatoires comme IL-1, IL-6, et le facteur tumoral de nécrose (TNF- α) et induisent l'activation des lymphocytes T (Gipson et Genco, 2006). Il a été démontré que la production de cytokines par les cellules dendritiques est grandement diminuée lorsque *P. gingivalis* n'exprime pas de fimbriae majeur (Jotwani et Cutler, 2004).

1.3.2.2. Les hémagglutinines

L'activité hémagglutinante de *P. gingivalis* est liée d'une part aux fimbriae, et d'autre part à des hémagglutinines distinctes des fimbriae à tout stade de la synthèse ou de l'assemblage mais les deux structures forment un complexe (Du *et al.*, 1997).

Ces protéines membranaires contribuent à l'établissement de la bactérie dans les sites sous-gingivaux (Du *et al.*, 1997 ; Ema *et al.*, 2003). Elles fonctionnent souvent comme des adhésines par lesquelles les bactéries se fixent aux cellules hôtes (Kozarov *et al.*, 2000; Ema *et al.*, 2003). Elles permettent aussi la fixation à l'hème des érythrocytes pour l'acquisition du fer (Song *et al.*, 2005).

Cinq hémagglutinines ont été identifiées (HagA à E), dont l'hémagglutinine HagA apparaît plus particulièrement impliquée. Elles sont codées par les gènes hagA, hagB, hagC, hagD, et hagE (Lépine et Progulske-Fox, 1996).

En effet, l'inactivation des gènes hagA, hagB et hagC a démontré une diminution de l'activité d'hémagglutination de la bactérie (Lamont et Jenkinson, 1998).

1.3.2.3. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS, constituant majeur de la membrane des bactéries à Gram négatif, est l'endotoxine bactérienne la plus étudiée et sans contredit, la mieux décrite actuellement dans la littérature (Kinane, 2001; Herath *et al.*, 2011).

Le lipopolysaccharide est un constituant amphipathique qui fait partie intégrale de l'enveloppe externe des bactéries à Gram négatif. Trois parties distinctes reliées ensemble par des liaisons covalentes forment cette structure bactérienne : le polysaccharide central, l'antigène O et le lipide A. L'activité toxique et immuno-stimulatrice des LPS est attribuée au lipide A (Okada et Murakami, 1998; Doucet et Lowenstein, 2006).

Le lipopolysaccharide de *P. gingivalis* est unique, tant au niveau de la structure chimique du polysaccharide et des lipides A de sa partie centrale, qu'au niveau de son activité biologique, par rapport à ceux des autres bactéries à Gram négatif (Ogawa, 1994; Ezzo et Cutler, 2003).

Le LPS est caractérisé par un faible pouvoir endotoxique : le lipide A de *P. gingivalis* est mille fois moins actif que celui des bactéries entériques. Il est probable que la faible action du lipide A, et surtout sa faible endotoxicité, permet à *P. gingivalis* de passer inaperçu dans l'hôte, et donc d'envahir le parodonte (Hirschfeld *et al.*, 2001)

Le LPS joue un rôle important dans la pathogenèse des maladies parodontales. Il est impliqué dans le déclenchement de la réponse immunitaire au cours d'une parodontite. Il stimule la sécrétion de médiateurs de l'inflammation notamment les cytokines pro-inflammatoires d'IL-1 β , d'IL-6 et TNF- α (Kinane, 2001; Doucet et Lowenstein, 2006; Herath *et al.*, 2011).

1.3.2.4. Les vésicules

Les vésicules sont des excroissances de la membrane externe de *P. gingivalis*. Elles sont exprimées à la surface cellulaire ou relâchées dans le milieu environnant (Mantri *et al.*, 2015). Les vésicules de *P. gingivalis* ont un diamètre compris entre 50 et 250 nm mais il est majoritairement autour de 50 nm (Xie, 2015).

Les vésicules servent de véhicule pour les toxines, les enzymes protéolytiques et les adhésines (Ho *et al.*, 2015), elles contiennent toutes les enzymes synthétisées par la bactérie et stockées avant leur excrétion (Mayrand et Grenier, 1989).

Des études ont montré que les vésicules sont impliquées dans l'adhérence, la formation de biofilm, l'invasion et la modulation des réponses immunitaires de l'hôte (Ho *et al.*, 2015).

Il est possible que les vésicules protègent ainsi la bactérie en fixant une partie des anticorps dirigés contre elle (Mantri *et al.*, 2015).

1.3.2.5. Les enzymes protéolytiques

P. gingivalis possède également des facteurs contribuant à l'inactivation des mécanismes de défense de l'hôte et à la destruction tissulaire, soient les protéinases (Kadowaki *et al.*, 2000). Ces dernières interviennent également dans l'acquisition de nutriments. Elles peuvent dégrader la transferrine, une protéine riche en fer et présente en grande quantité dans le liquide crévulaire, afin de fournir une source de fer à la bactérie (Brochu *et al.*, 2001; Olczak *et al.*, 2005)

Les enzymes protéolytiques de *P. gingivalis* sont soit extracellulaires, sous forme soluble ou incluses dans des vésicules, soit liées à la cellule. (Kadowaki *et al.*, 2000) Trois activités protéolytiques sont le fait de protéinases différentes:

La X-prolyl-dipeptidyl peptidase est active sur des aminopeptides, les collagénases actives sur le collagène de type I, II et III et les cystéine-protéinases (*trypsin-like proteinases*) aussi connues sous le nom de gingipaïnes.

Diverses protéinases de *P. gingivalis* ont été décrites, mais l'essentiel de l'activité protéolytique serait du aux gingipaïnes (Huang *et al.*, 2001; Hajishengallis *et al.*, 2006) qui

représentent 85% de l'activité protéolytique totale de *P. gingivalis* (Bostanci et Belibasakis, 2012; How *et al.*, 2016) et dont la fonction majeure est l'acquisition de nutriments via la dégradation des protéines en peptides (Kristoffersen *et al.*, 2015).

Leur activité catalytique est liée à la présence d'un groupement thiol dans la cystéine de la molécule. Sur la base de leur spécificité du substrat, les gingipaines sont divisés en Arg-gingipaine A et B (RgpA, RgpB) qui clivent la région carboxy-terminale des résidus arginine alors que la Lys-gingipaine (Kgp) clive la région carboxy-terminale des résidus lysine (Kadowaki *et al.*, 2000; Curtis *et al.*, 2001; Takashi *et al.*, 2006; How *et al.*, 2016).

En outre, l'inactivation des défenses immunitaires locales est aussi le résultat de cette activité protéolytique, les gingipaines R confèrent une résistance élevée aux mécanismes de défense de l'hôte, où certaines immunoglobulines, des cytokines et des facteurs de complément peuvent être dégradés, contribuant ainsi à la progression et au maintien de *P. gingivalis* à l'intérieur de la poche parodontale (Curtis *et al.*, 2001).

La capacité du gingipaine K à cliver l'hémoglobine, permet de fournir à *P. gingivalis* une source en hème requis pour la croissance et peut contribuer à la prolifération de *P. gingivalis* dans les poches parodontales où les érythrocytes sont abondants (Sroka *et al.*, 2001).

Les gingipaines jouent également un rôle dans l'adhésion aux sites sous gingivaux et la co-agrégation avec d'autres bactéries, un processus facilitant à *P. gingivalis* la colonisation dans les poches parodontales (Kamaguchi *et al.*, 2003; Olczak *et al.*, 2005).

1.3.3. Réponse de l'hôte

Bien que l'accumulation des bactéries dans les sites sous-gingivaux soit un facteur essentiel pour le développement de la maladie parodontale, la destruction tissulaire observée au cours des parodontites, semblerait plutôt liée à la réponse exagérée des systèmes de défense de l'hôte en réaction à la stimulation continue par la microflore pathogène résidante des poches parodontales (Schenkein, 2006; Mahtout, 2012; Abusleme *et al.*, 2013; Baek *et al.*, 2015).

La destruction du tissu conjonctif et de l'os, constitue une caractéristique clé du processus de la maladie (Graves, 2008).

Différentes cellules du parodonte, tels que les fibroblastes de ligament parodontal, les fibroblastes gingivaux et les cellules épithéliales gingivales sont impliqués dans la réponse

immunitaire de l'hôte au cours des parodontites (Konermann *et al.*, 2012; Rouabhia *et al.*, 2012).

P. gingivalis et ses facteurs de virulence notamment le LPS sont des stimulateurs puissants du système de défense inné de l'hôte (Shaddox *et al.*, 2013; Baek *et al.*, 2015) qui constitue la première ligne de défense de l'organisme contre l'agression par les microorganismes (Janeway *et al.*, 2003). L'activation de ce système implique des récepteurs cellulaires qui lient les structures conservées d'origine microbienne (González-Navajas *et al.*, 2014).

Au cours des infections parodontales, une cascade de signalisation intracellulaire est déclenchée, aboutissant à l'induction de la production de cytokines, de chimiokines, d'interférons, de peptides antimicrobiens, de la prostaglandine E2 (PGE2) et de métalloprotéinases (MMPs).

1.3.3.1. Les cytokines

Certaines bactéries parodontopathogènes notamment *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum* et *A. actinomycetemcomitans* sont capables d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α) (Sela, 2001; Holt et Ebersole, 2005; Bodet *et al.*, 2006; Mahtout, 2012).

Les cytokines sont des polypeptides de faible poids moléculaire produites par des cellules immunitaires et non-immunitaires (Okada et Murakami, 1998). Ces molécules ont grandement été associées à la progression de la maladie (Kornman *et al.*, 1997), elles sont retrouvées en quantité importante dans les sites sous-gingivaux en phase active de la pathologie parodontale (Okada et Murakami, 1998).

1.3.3.1.1. Les interleukines

L'IL-1 β est une interleukine synthétisée principalement par les macrophages ayant interagi avec un produit bactérien (Mahtout, 2012). Elle induit la résorption osseuse et la sécrétion de certaines protéases. Les concentrations élevées de IL-1 dans le fluide gingival sont associées à la présence de bactéries pathogènes au sein de la plaque sous gingivale (Barksby *et al.*, 2007).

L'IL-6 est sécrétée par les cellules épithéliales, les fibroblastes et les macrophages. Elle stimule la prolifération des lymphocytes B et la formation des ostéoclastes (Mahtout, 2012). Chez des patients réfractaires, les résultats corrélés avec la présence de *P. gingivalis* dans la

plaque sous gingivale montrent des taux importants d'IL-6 dans le fluide gingival (Nibali *et al.*, 2008; Olanié, 2008).

1.3.3.1.2. Le facteur de nécrose tumorale

Le facteur de nécrose tumorale TNF- α , est produit par les lymphocytes activés et les monocytes. C'est un puissant immuno-régulateur, capable de stimuler les fibroblastes et la résorption osseuse. Il est retrouvé en quantité variable dans le fluide gingival. Chez des patients atteints de parodontite chronique ou agressive, des taux élevés de TNF- α sont retrouvés en comparaison avec des sujets sains (Kurtis *et al.*, 2005; Nilson et Kopp, 2008; Olanié, 2008).

1.3.3.2. Les peptides antimicrobiens

L'immunité non spécifique, ou innée, fait intervenir de nombreux peptides dotés d'activité antimicrobienne (Jonard *et al.*, 2006). Plusieurs familles de peptides antimicrobiens ont été décrites dans la cavité buccale incluant les défensines (Dale *et al.*, 2001).

Les défensines constituent une famille de peptides cationiques antimicrobiens. Ce sont des petits peptides, de masse moléculaire variant de 3,5 à 6 kDa, qui possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne. Au sein de cette famille sont reconnues les β -défensines humaines (Jonard *et al.*, 2006).

Chez l'homme, il existe 17 sous-types de β -défensines, la β -défensines-1 (HBD-1) est produit de façon constitutive, elle est retrouvée dans le plasma humain et les épithéliums en contact avec l'environnement ou la flore microbienne, tandis que la β -défensines-2 (HBD-2) est exprimée de façon inductible (Chen *et al.*, 2006; Jonard *et al.*, 2006).

Outre le rôle des β -défensines humaines dans la lutte et la destruction de bactéries, elles sont impliquées dans le déclenchement de la réponse immunitaire adaptative, en recrutant sélectivement des cellules dendritiques et des lymphocytes T mémoires (Yang *et al.*, 1999).

1.4. Les maladies parodontales

1.4.1. Structure du parodonte

Le parodonte représente l'ensemble des tissus entourant et servant au soutien des dents. Il est composé de la gencive, du ligament parodontal, du cément et de l'os alvéolaire (Doucet et Lowenstein, 2006; Vigouroux, 2011).

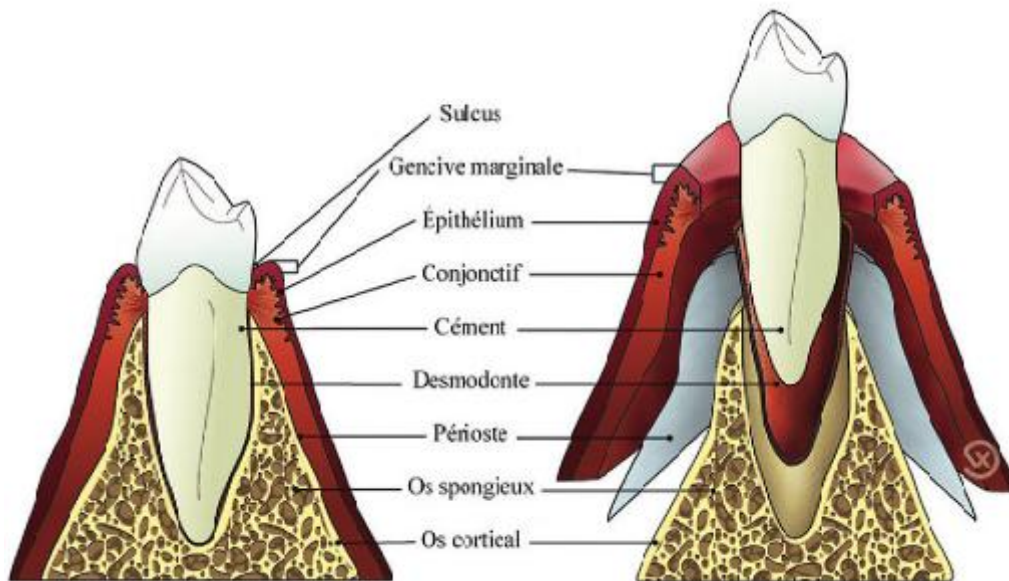


Figure 6. Représentation schématique des tissus de soutien de la dent (Vigouroux, 2011).

1.4.1.1. Gencive

La gencive fait partie de la muqueuse buccale et constitue aussi la partie la plus périphérique du parodonte (Wolf, 2005). Elle assure le rôle de manchon étanche autour de chaque dent. Elle couvre également l'os alvéolaire et peut être divisée en deux parties : la gencive marginale, aussi connue sous le nom de gencive libre et la gencive attachée. (Armitage, 2004; Doucet et Lowenstein, 2006).

La gencive marginale représente la portion de gencive située autour de la dent sans toutefois y être fixée. Le repli situé entre la gencive libre et la dent forme le sulcus (ou sillon gingival) (Wolf, 2005).

Chez les sujets sains, la profondeur du sulcus varie généralement entre 0.5 et 3 mm (Page et Eke, 2007). Dans les cas de parodontite, la profondeur du sillon peut atteindre jusqu'à 9 mm et constitue donc un signe évident de la destruction des tissus de soutien adjacents (Armitage, 2004). Il est alors question de poche parodontale.

Quant à la gencive attachée, cette dernière représente la continuité de la gencive libre et est fermement attachée au cément et à l'os alvéolaire tout en possédant une texture plus ferme que la gencive marginale (Armitage, 2004; Doucet et Lowenstein, 2006).

1.4.1.2. Ligament parodontal

Le ligament parodontal, aussi appelé desmodonte, est un tissu conjonctif richement vascularisé situé autour de la racine de la dent et qui s'étend de la partie interne de l'os alvéolaire jusqu'au ciment (Vigouroux, 2011). Outre la synthèse du réseau de fibres de collagène dont il est constitué, le ligament parodontal assure l'ancrage de la dent dans l'alvéole dentaire (Hassell, 1993; Wolf, 2005).

1.4.1.3. Cément

Le cément est une structure avasculaire et non innervée se présentant sous forme d'une mince couche de tissu minéralisé. Il recouvre la surface externe de la dentine au niveau de la racine et qui assure l'attache des fibres du ligament parodontal (Vigouroux, 2011).

Du point de vue de sa composition, ce tissu possède une organisation et une structure proche de l'os alvéolaire, à l'exception que celui-ci n'est pas vascularisé ni innervé (Bercy et Tenenbaum, 1996).

Le cément se partage en deux types distincts : le cément acellulaire constitué principalement de fibres de collagène aussi appelées fibres de Sharpey et le cément cellulaire qui renferme les cémentoblastes (Wolf, 2005).

1.4.1.4. Os alvéolaire

C'est un tissu calcifié situé au niveau des alvéoles dentaires qui sert au maintien de la dent dans l'arcade maxillaire. L'os alvéolaire est continuellement remodelé par l'action des ostéoblastes et des ostéoclastes qui sont respectivement responsables de la formation et de la résorption du tissu osseux (Charon et Mouton, 2003). Les os cortical et spongieux présentent une différence fonctionnelle et structurelle. La différence structurelle repose sur la différence de densité osseuse : 80 à 90 % de l'os cortical est occupé par du tissu osseux contre 20 à 25 % au niveau du tissu spongieux (Massif et Frappier, 2007).

1.4.2. Définition des maladies parodontales

Les maladies parodontales sont des maladies inflammatoires d'origine bactérienne affectant les tissus entourant et supportant les dents (Soskolne *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2009). Les deux formes principales sont les gingivites et les parodontites qui résultent d'un déséquilibre entre les réactions de défenses de l'hôte et les bactéries (Bouchard, 2015).

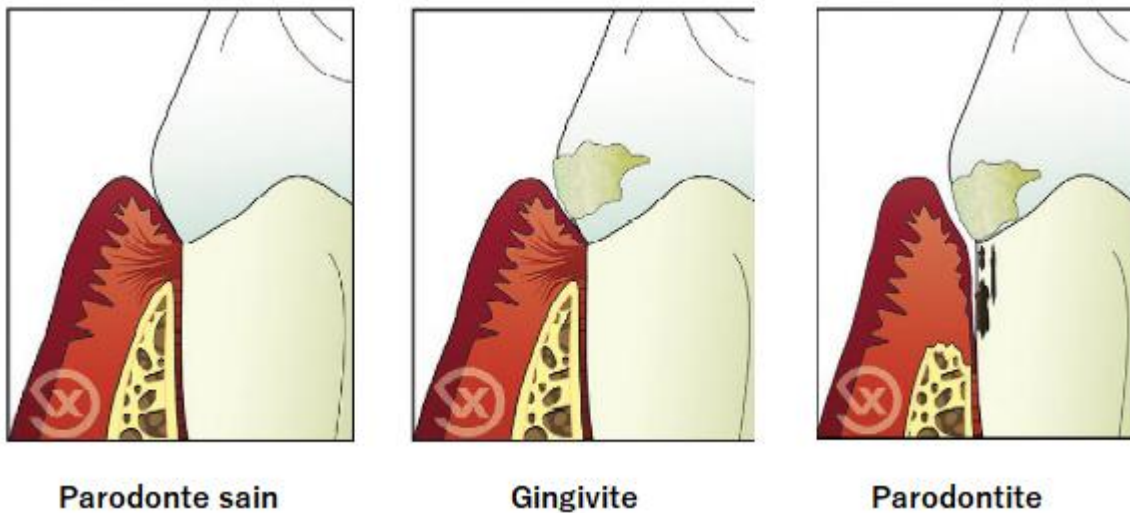


Figure 7. Présentation schématique du parodonte sain et pathologique (Adaptée de Vigouroux, 2011).

1.4.3. Classification des maladies parodontales

La classification des maladies parodontales est utile pour poser le diagnostic et établir le traitement et le pronostic d'un individu. La première classification a vu le jour en 1989 lors du *World Workshop in Clinical Periodontics*. Une révision consensuelle de cette classification a eu lieu en 1999 (Planëak *et al.*, 2001).

1.4.3.1. Les gingivites

Ce sont des lésions confinées aux tissus gingivaux (Ranney *et al.*, 1981). Les gingivites sont des réactions inflammatoires, non spécifiques, réversibles de la gencive marginale en réponse à une augmentation du nombre de bactéries accumulées près du sulcus gingival. Elles peuvent évoluer en lésions irréversibles appelées parodontites (Goldberg et Ardouin, 1999). On distingue les gingivites induites par la plaque et les gingivites non induites par la plaque.

1.4.3.1.1. La gingivite induite par la plaque

Elle est la forme la plus commune de la maladie gingivale. Elle entraîne une altération de la forme, de la couleur et de la texture du parodonte superficiel (épithélium gingival et tissus conjonctifs sous-jacents) en engendrant la rougeur, le gonflement et le saignement des gencives sans la présence de perte d'attache de la dent (Houle et Grenier, 2003; Arab *et al.*, 2011). Cette maladie est réversible, et ce, par une meilleure hygiène buccale et dans certains cas un traitement dentaire (Arab *et al.*, 2011; Pizzo *et al.*, 2010).

La gingivite induite par la plaque peut être associée à des facteurs systémiques, à la médication et à la malnutrition (Wiebe et Putnins, 2000; Bouchard, 2015).

1.4.3.1.2. La gingivite non-induite par la plaque

Les gingivites non induites par la plaque regroupent un ensemble d'affections gingivales hétérogènes classées en fonction de leur étiologie (Boschin *et al.*, 2004).

La maladie gingivale peut être une manifestation de maladies dermatologiques ou causée par une réaction allergique aux matériaux d'obturations dentaires, dentifrices, rince-bouches, aliments, et aux traumatismes thermiques et mécaniques (Armitage, 1999).

1.4.3.2. Les parodontites

Ce sont des lésions du parodonte profond, d'étiologie infectieuse, à manifestations inflammatoires affectant l'ensemble des structures de soutien de la dent (Listgarten, 1986).

Elle est causée par des microorganismes spécifiques. Ces derniers provoquent une destruction progressive du ligament parodontal et de l'os alvéolaire et s'accompagne de la formation d'une poche parodontale et d'une récession gingivale. Ce qui différencie une parodontite d'une gingivite est la perte d'attache clinique (Vigouroux, 2011).

Les différents stades de la maladie sont évalués en fonction du degré d'inflammation (saignement au sondage), de la profondeur de la poche et de la perte osseuse par rapport à l'âge (Aubrey et Gopalakrishnan, 2000; Rutger-Persson, 2011).

1.4.3.2.1. Les parodontites agressives

Les parodontites agressives ont comme particularité la destruction massive et plus ou moins accélérée des tissus parodontaux, la perte d'attache et la résorption osseuse sont aggravées par les facteurs de risque locaux et environnementaux (Tonetti et Mombelli, 1999; Massif et Frappier, 2007). Elles touchent des personnes de tous âges mais survenant généralement chez l'enfant, l'adolescent ou le jeune adulte (Massif et Frappier, 2007). Le sujet est le plus souvent en bonne santé, mais présente une prédisposition familiale et/ou une susceptibilité individuelle.

La classification se fait en fonction de l'étendue de l'atteinte et la gravité de la maladie. Elles peuvent être donc:

- Localisées: moins de 30% des sites sont atteints.
- Généralisées: plus de 30% de sites atteints.

La sévérité de la maladie parodontale peut être vue soit dans sa globalité (sur l'ensemble des dents de la bouche) ou au niveau d'une dent ou d'un site. En fonction de la perte d'attache on distingue les parodontites agressives:

- Légères: perte d'attache comprise entre 1 et 2 mm en moyenne
- Modérées: perte d'attache comprise entre 3 et 4 mm en moyenne
- Sévères: perte d'attache de 5mm et plus en moyenne (Tonetti et Mombelli, 1999).

Elles regroupent les anciennes appellations de parodontite précoce, prépubertaire, juvénile et parodontite à progression rapide (Goldberg et Ardouin, 1999; Roshna et Nandakumar, 2012).

1.4.3.2.2. Les parodontites chroniques

Les parodontites chroniques sont la forme la plus courante des parodontites. Elles débutent en général à l'âge adulte, mais peuvent être initiées dès l'adolescence chez certains sujets (Armitage, 2004). Pour ce type de parodontite, la perte d'attache et l'alvéolyse à prédominance horizontale sont progressives et font généralement suite à une longue période de gingivite. On retrouve des poches parodontales et une inflammation gingivale associées ou non à des récessions (Tonetti et Mombelli, 1999).

La parodontite chronique sera qualifiée de localisée si moins de 30% des sites parodontaux sont atteints, alors qu'elle sera considérée généralisée si plus de 30% des sites sont affectés. La résorption osseuse est qualifiée de légère, modérée ou sévère selon le degré de la perte osseuse déterminé par radiographie (Wiebe et Putnins, 2000; Armitage, 2004).

1.4.3.2.3. Les parodontites associées à des maladies systémiques

Les maladies parodontales peuvent être une manifestation fréquente de certaines maladies systémiques d'ordre hématologique ou génétique (Armitage, 1999).

Ces parodontites se développent suite à certains troubles généraux, qui vont affaiblir les capacités de défense de l'hôte en perturbant le métabolisme tissulaire et le fonctionnement du système immunitaire. Ceci peut rendre les sujets atteints plus vulnérables aux agressions bactériennes parodontales. (Wiebe et Putnins, 2000).

1.4.3.2.4. Les parodontites ulcéro-nécrotiques

Ce sont des infections caractérisées par une nécrose des tissus gingivaux, on observe une atteinte concomitante des tissus parodontaux profonds, avec une atteinte du ligament parodontal créant une perte d'attache et une fonte de l'os alvéolaire. Elles sont souvent associées à des pathologies systémiques majeures telle que l'infection par le VIH, une sévère malnutrition ou une immunodépression (Duyninh *et al.*, 2005).

1.4.3.2.5. L'abcès parodontal

L'abcès parodontal est une infection aigüe localisée et purulente qui peut être observée au cours d'une parodontite. Selon sa localisation il peut être gingival (atteinte de la gencive marginale et/ou papille interdentaire), parodontal ou péricoronnaire (Patel *et al.*, 2011). Son diagnostic et son traitement spécifique lui permettent de se distinguer au sein de la classification, sans pour autant constituer, à lui seul, une maladie parodontale (Duyninh *et al.*, 2005).

Les parodontites réfractaires ou récidivantes n'ont pas été conservées dans la classification, car elles forment un groupe hétérogène et ne correspondent pas à un type particulier de maladie parodontale (Armitage, 1999).

1.5. La vitamine E

1.5.1 Définition

La vitamine E est un terme générique qui désigne l'ensemble tocophérols et tocotriénols. Ces deux grandes familles sont les dérivés du 6-chromanol avec une chaîne latérale à 16 atomes de carbone de structure isoprénique. Les tocophérols présentent une chaîne latérale saturée tandis que les tocotriénols présentent la même chaîne avec trois doubles liaisons. (Leger, 2000; Grilo *et al.*, 2014).

Parmi les homologues des tocophérols (α , β , γ et δ -tocophérols), l'alpha-tocophérol est celui qui possède l'activité biologique la plus importante (Rimbach *et al.*, 2010).

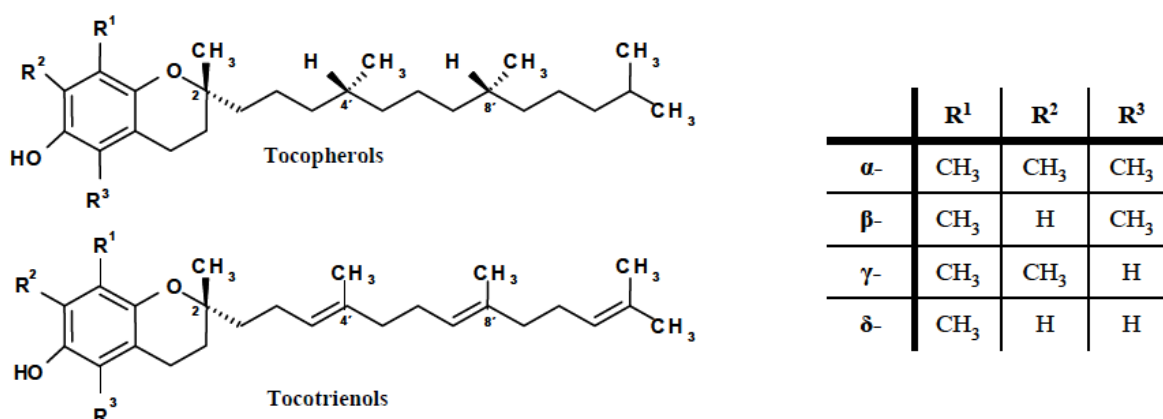


Figure 8. Structure chimique de tocophérols et tocotriénols (Rimbach *et al.*, 2010).

1.5.2. La fonction anti-oxydante de la vitamine E

La vitamine E est un anti-oxydant majeur des structures lipidiques (Leger, 2000). Au plan physiologique, cette vitamine constitue un antioxydant liposoluble puissant résidant principalement dans la membrane cellulaire (Shamama *et al.*, 2011).

Elle agit comme la première ligne de défense contre la peroxydation lipidique (Rizvi *et al.*, 2014). Ces propriétés antioxydantes sont exercées par l'intermédiaire de son groupe hydroxyle phénolique, qui donne de l'hydrogène aux radicaux peroxytes, ce qui résulte de la formation des espèces lipidiques stables. En donnant un atome d'hydrogène, la vitamine E devient un radical libre relativement non réactif (Rimbach *et al.*, 2010).

La vitamine E joue donc un rôle important dans la protection *in vivo* des structures sensibles à l'oxydation et par conséquent la prévention de nombreuses pathologies notamment le cancer (Rizvi *et al.*, 2014) et les maladies cardiovasculaires (Devaraj *et al.*, 1996).



Matériels et Méthodes

Partie 2. Matériels et Méthodes

2.1. Isolement et identification de *Porphyromonas gingivalis*

2.1.1. Prélèvements

Pour la réalisation de cette étude, des échantillons sous-gingivaux ont été prélevés chez des patients reçus en consultation dans le service de parodontologie du centre hospitalo-universitaire de Beni Messous d'Alger.

Les sujets sont atteints de parodontite agressive présentant des poches parodontales profondes, dont le site est de plus de 7 mm de profondeur au cours du sondage. Le saignement lors du sondage et la perte osseuse radiographique faisaient aussi partie des critères de sélection.

Les patients inclus, sont des personnes des deux sexes, âgés entre 18 et 35 ans, ne souffrant pas de maladies systémiques, et qui ne devaient pas avoir fait l'objet d'un traitement parodontal quelconque ou d'une antibiothérapie pour infection d'origine dentaire, au cours des six derniers mois. Ce délai minimise leur impact sur la progression de la maladie.

Les prélèvements doivent être effectués au moins deux heures après toute prise d'aliments, de boisson ou de brossage des dents. Au moment de la collecte, la plaque supra-gingivale est soigneusement retirée à l'aide d'une curette, de compresses et de sérum physiologique stériles, afin d'éviter la contamination de l'échantillon sous gingival.

Après nettoyage, les sites choisis sont isolés de la salive par des rouleaux de coton salivaire puis séchés à l'air. Deux pointes de papier stérile sont introduites dans la poche pour récolter la plaque sous gingivale parodontale. Après 20 à 30 secondes, les pointes sont retirées et sont immédiatement transférées dans un tube de transport pour l'analyse microbiologique. Celle-ci a été réalisée au niveau du laboratoire des anaérobies et du botulisme de l'institut Pasteur d'Algérie (I. P. A).

2.1.2. Transport des échantillons

Les prélèvements sont transportés dans du milieu Amies semi-gélosé dont la composition permet de maintenir la vitalité des bactéries anaérobies strictes. Ce milieu permet également de conserver les anaérobies pendant 24 à 48 heures.

Afin d'éviter les modifications qualificatives et quantitatives de la population sous-gingivale, les échantillons doivent être traités dans un délai de 48 heures après le prélèvement.

2.1.3. Isolement et purification de *Porphyromonas gingivalis*

L'isolement est conduit sur gélose au sang enrichie en hémine (10 µg/ml) et en ménadione (1 µg/ml). Il est réalisé par un simple ensemencement en surface à l'aide de stries transversales. L'incubation est conduite à 37°C pendant 5 jours en atmosphère anaérobie (10% H₂, 10% CO₂, 80%N₂) en déposant les boîtes à l'intérieur d'une jarre model «BD Gas Pak™ EZ, Becton, Dickinson and Company , USA» en présence de générateurs de gaz «Gas Pak™ EZ, Becton, Dickinson and Company , USA».

Les colonies présentant une morphologie et une pigmentation caractéristique sont soigneusement prélevées et repiquées de nouveau et séparément sur le milieu de culture sélectif. Ainsi plusieurs repiquages sont réalisés. Afin de s'acquérir de la pureté de la culture des observations microscopiques après coloration de Gram ont été réalisées.

2.1.4 Pré-identification de *Porphyromonas gingivalis*

Les différents tests de la pré-identification sont les suivants:

➤ Coloration de Gram

C'est une coloration différentielle qui divise les bactéries en deux classes : Gram + et Gram -. Elle est basée sur la composition différentielle de la paroi en lipides qui sont élevés (20%) chez les Gram- et faibles chez les Gram +.

➤ Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène).

➤ Recherche de l'oxydase

Le cytochrome oxydase ou oxydase est une enzyme de la chaîne respiratoire bactérienne qui catalyse des réactions d'oxydation.

2.1.5. L'identification biochimique (Galerie API 20 A)

L'identification est effectuée en tenant compte des critères morphologiques des colonies obtenues sur le milieu de culture ainsi que la morphologie cellulaire (observation sous microscope). Seules les souches dont l'aspect macroscopique et microscopique est caractéristique, ainsi dépourvues de catalase et d'oxydase seront retenues.

L'identification de cette espèce est facilitée par l'utilisation d'une galerie biochimique API 20A (BioMérieux, France). La galerie API 20 A est un système standardisé associant 20 tests biochimiques qui présentent un grand pouvoir discriminant.



Figure 9. Galerie biochimique API 20A (BioMérieux, France).

2.1.6. Etude de la sensibilité de *P. gingivalis* aux antibiotiques

L'antibiogramme est réalisé sur gélose Columbia au sang laqué enrichie en ménadione selon la technique de diffusion sur milieu solide.

A partir d'une culture pure sur milieu d'isolement, une suspension bactérienne a été préparée dans du milieu BHI réduit et supplémenté d'hémine (10 µg/ml) et de ménadione (1 µg/ml) (BHIB-HK). La suspension est bien homogénéisée et dont l'opacité est ajustée au standard Mc Farland 1 (10⁸ UFC/ml).

L'ensemencement est soigneusement réalisé à l'aide d'un écouvillon stérile de manière à obtenir une croissance bactérienne uniforme.

Les disques d'antibiotiques à tester (Tableau 1) sont ainsi appliqués sur la surface de la gélose, ces derniers doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. Ensuite les boîtes de pétri sont incubées pendant 48 heures à 37 °C en atmosphère anaérobie.

Tableau 1. Antibiotiques testés et familles d'appartenance.

Famille d'antibiotique	L'antibiotique testé	Charge du disque	L'abréviation
Polymixines	Colistine	10 µg	CT
Aminoside	Kanamycine	1000 µg	K
Glycopeptides	Vancomycine	5 µg	VA

Enfin, les diamètres des zones d'inhibition sont soigneusement mesurés. Les résultats obtenus sont comparés aux valeurs critiques figurants dans la table de lecture (Annexe 3) afin de classer les deux souches de *P. gingivalis* dans l'une des catégories: Sensibles (S), Intermédiaires(I) ou Résistantes (R).

2.1.6. Conservation des souches isolées

Afin de conserver les isolats à long terme et garder un stock bactérien, les cultures sont congelées à -80°C. 0,6 ml de glycérol stérile est additionné à 1,2 ml du bouillon de culture. Lors de cette étape, une nouvelle coloration de Gram est réalisée pour s'acquérir de la pureté des bouillons de culture.

2.2. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur la croissance de *P. gingivalis*

Une suspension bactérienne est aseptiquement préparée dans du milieu BHI-HK à partir d'une culture jeune de *P. gingivalis*. La densité optique de la suspension est ajustée à l'aide de dilutions, jusqu'à l'obtention de la valeur désirée, puis la suspension est répartie dans une microplaque de 96 puits. Cette dernière est incubée à 37°C pendant 48 heures.

Après incubation, la croissance bactérienne est quantifiée par une lecture de la DO à 620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques model «Filter Max F5, Molecular Devices, Inc, Autriche».

2.2.1. Effet du pH sur la croissance de *P. gingivalis*

A partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu BHI-HK à différents pH (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl des suspensions bactériennes sont ajoutés à des microplaques de 96 puits. Ces dernières sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.2.2. Effet de la ménadione (vitamine K) sur la croissance de *P. gingivalis*

A partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu dans du milieu BHI-H et ajustée à une DO de 0,2 à 620 nm en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione dont les dilutions ont été préalablement préparées. 200 µl des suspensions bactériennes sont ajoutés à des microplaques de 96 puits. Ces dernières sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol (vitamine E) sur la croissance de *P. gingivalis*

Préparation de l'alpha-tocophérol

L'alpha-tocophérol (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) à une concentration initiale de 2 M a été dilué avec l'éthanol afin d'obtenir une solution mère de 50 mM. Les concentrations utilisées dans les expériences ont été ramenées à 50, 100 et 200 µM dans le milieu de culture. La concentration finale en éthanol doit être minimale afin d'éviter la cytotoxicité de ce dernier. Le milieu de culture servant de contrôle négatif a été complété par le même volume d'éthanol.

La capacité d'alpha-tocophérol à inhiber la croissance de *P. gingivalis* a été évaluée dans du milieu BHI-HK additionné de différentes concentrations d'alpha-tocophérol (50; 100 et 200 µM). Les suspensions bactériennes sont préparées à partir des cultures jeunes de *P. gingivalis* et dont les DO sont ajustées à 0,3 à 620 nm.

Un volume de 3 ml de chaque suspension bactérienne est déposé dans des tubes en verre. Ces derniers sont ensuite incubés en anaérobiose à 37°C pendant 48 heures.

2.3. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur les caractéristiques pariétales de *P. gingivalis*

2.3.1. Préparation des suspensions bactériennes

Les souches bactériennes sont mises en culture à 37°C durant 48 heures dans du milieu BHI-HK à partir des cultures jeunes de *P. gingivalis*. Les cultures bactériennes en suspension sont centrifugées pendant 15 minutes à 5000 g à l'aide d'une centrifugeuse model «Sigma centrifuges 2-16 PK, Allemagne».

Les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile à 0.1 N et remis en suspension dans le même tampon dont le pH est ajusté selon la valeur souhaitée, la densité optique (A_0) est fixée entre 0,8 et 1.

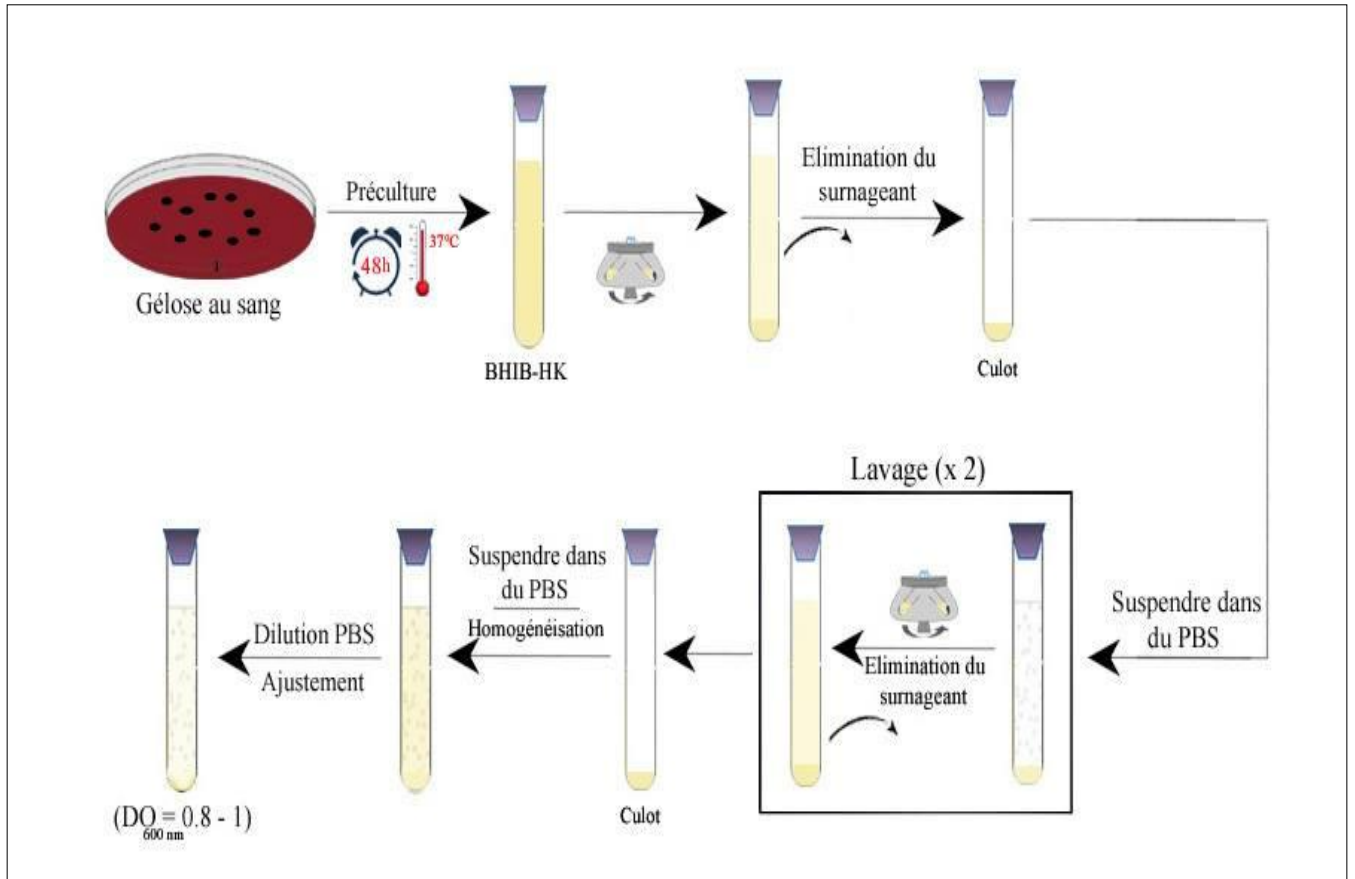


Figure 10. Préparation de la suspension bactérienne.

2.3.2. Détermination de l'hydrophobicité de la paroi de *P. gingivalis*

Le caractère hydrophobe/hydrophile de la paroi cellulaire est déterminé selon le protocole BATH "Bacterial Adhesion to hydrocarbon" (Rosenberg, 1980). L'estimation de l'hydrophobicité est basée sur l'affinité des souches pour hexadécane, un solvant apolaire.

Expérimentalement, 1,8 ml de la suspension bactérienne est vortexé avec 0,3 ml du solvant apolaire pendant 2 minutes afin d'obtenir une émulsion. Après 15 minutes de décantation, la densité optique de la phase aqueuse (A) est mesurée à 600 nm. Le pourcentage d'adhésion à hexadécane est alors donné par la relation suivante:

$$\% \text{ Adhesion} = (A - A_0/A_0) \times 100$$

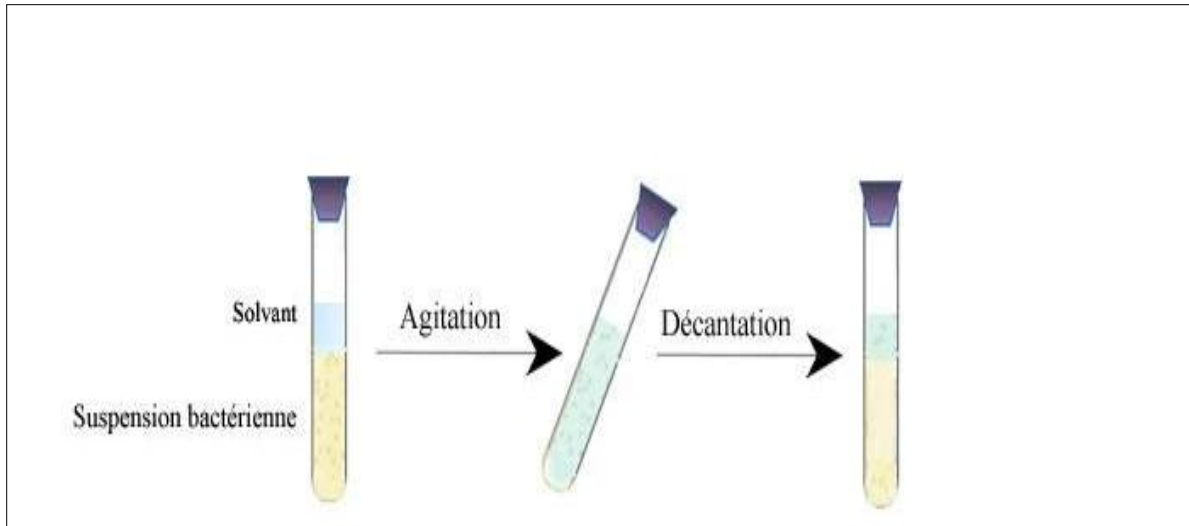


Figure 11. Présentation schématique du test BATH

2.3.2.1. Effet du pH sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence du pH, des cultures fraîches de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-HK. Après la période d'incubation les cellules sont récoltées suite à une centrifugation, les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile dont le pH est ajusté à différentes valeurs (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et resuspendus dans le même tampon à différent pH, les suspensions préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.2.2. Effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'effet de la ménadione, des cultures fraîche de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-H en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 $\mu\text{g/ml}$ final) de ménadione, les culots bactériens sont récupérés et l'expérience est réalisée solen le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur l'hydrophobicité du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'effet l'alpha-tocophérol, des cultures fraîches de *P. gingivalis* sont ensemencées la veille dans du milieu BHI-HK en présence de concentrations croissantes (50; 100 et 200 μM) d'alpha-tocophérol, les culots bactériens sont récupérés et l'expérience est réalisée solen le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3. Adhésion microbienne aux solvants (MATS)

L'adhésion microbienne aux solvants, communément appelé MATS "Microbial Adhesion To Solvents" méthode mise au point par Bellon-Fontaine *et al.*, (1996). C'est une technique inspirée de la méthode d'adhésion aux hydrocarbures (MATH pour Microbial Adhesion To Hydrocarbon) (Rosenberg, 1980), et couramment employée pour déterminer l'hydrophobicité relative des cellules microbiennes, ainsi que leur caractère donneur/accepteur d'électrons (acide-base au sens de Lewis) (Bellon- Fontaine *et al.*, 1996).

Cette méthode est basée sur la comparaison de l'affinité d'une souche pour un solvant apolaire et un solvant monopolaire. Le solvant monopolaire peut être acide ou basique (au sens de Lewis), mais les deux solvants doivent posséder la même énergie libre de surface liée au caractère de Lifshitz-van der Waals (Tableau 2). Sur cette base, deux couples de solvants ont été choisis : le couple chloroforme (Sigma), solvant accepteur d'électrons/ hexadécane (Sigma) et le couple acétate d'éthyle (Sigma), solvant donneur d'électrons/ décane (Sigma).

Tableau 2. Composantes van der Waals (γ^{LW}), accepteur d'électrons (γ^+) et donneur d'électrons (γ^-) de l'énergie libre de surface des solvants utilisés pour le test MATS (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Solvants	γ^{LW} (mJ/m ²)	γ^+ (mJ/m ²)	γ^- (mJ/m ²)
Chloroforme	27,2	3,8	0
Hexadécane	27,2	0	0
Acétate d'éthyle	23,9	0	19,4
Décane	23,9	0	0

1,8 ml de la suspension bactérienne obtenue sont introduits dans un tube à essai et additionnés de 0,3 ml du solvant. Le mélange est agité au vortex pendant environs 2 minutes. Une séparation complète entre les phases organique et aqueuse est obtenue après une période de décantation de 20 minutes, la phase aqueuse est alors prélevée et une mesure de la densité optique à 600 nm est effectuée (A). Le pourcentage d'adhésion aux solvants est alors donné par la relation suivante:

$$\% \text{ Adhesion} = (A - A_0/A_0) \times 100$$

2.3.3.1. Effet du pH sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet du pH sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, les cellules sont récoltées suite à une centrifugation des cultures fraîches en milieu BHI-HK. Les culots obtenus sont lavés deux fois à l'aide d'un tampon PBS stérile dont le pH est ajusté à différentes valeurs (5,5; 6,5; 7 et 8,5) et resuspendus dans le même tampon à différent pH. Les suspensions préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3.2. Effet de la ménadione sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet de la ménadione sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, des cultures fraîches en milieu BHI-H sont préparées en présence de concentrations croissantes (0; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione. Les culots bactériens sont récupérés et les suspensions ainsi préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.3.3.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Afin de déterminer l'effet de l'alpha-tocophérol sur le caractère donneur/accepteur d'électrons des isolats de *P. gingivalis*, des cultures fraîches en milieu BHI-HK sont préparées en présence de concentrations croissantes (50; 100 et 200 µM) d'alpha-tocopherol. Les culots bactériens sont récupérés et les suspensions ainsi préparées sont traitées selon le protocole déjà mentionné ci-dessus.

2.4. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur l'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

2.4.1. Préparation des suspensions bactériennes

A partir des cultures fraîches obtenues sur milieu d'isolement, des suspensions bactériennes sont préparées dans du milieu BHI-HK.

Les suspensions bactériennes préparées sont soigneusement homogénéisées, l'inoculum est ajusté à l'aide d'un spectrophotomètre jusqu'à l'obtention d'une DO de 0,2 à 620 nm.

2.4.2. Adhésion et formation du biofilm sur microplaque

Des microplaques de 96 puits sont inoculées avec des suspensions bactériennes à raison de 200 µl par puit. Ces puits servent de support à l'adhésion et l'établissement du biofilm bactériens.

Afin de déterminer la capacité d'adhésion et de formation du biofilm les microplaques sont incubées pendant 4 h et 48 h respectivement à 37°C. Après incubation la biomasse fixée est quantifiée selon la méthode du cristal violet.

2.4.2.1. Effet du pH sur l'adhésion et la formation du biofilm du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence du pH sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes à différents pH (5,5; 6,5; 7 et 8,5) sont aseptiquement préparées dans du milieu BHI-HK et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl de différentes suspensions bactériennes sont ensuite inoculées dans des microplaques de 96 puits. Celles-ci sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 4 heures.

Pour l'étude de la formation du biofilm, les microplaques sont inoculées avec les différentes suspensions préparées à raison de 200 µl par puit et sont ensuite incubées en anaérobiose pendant 48 heures.

La quantité de biomasse adhérente est proportionnelle à la quantité du cristal violet retenu dont l'absorbance est mesurée à 570 nm après chaque période d'incubation.

2.4.2.2. Effet de la ménadione sur l'adhésion et la formation du biofilm du *P. gingivalis*

Afin d'étudier l'influence du ménadione sur la capacité d'adhésion du *P. gingivalis*, des suspensions bactériennes sont aseptiquement préparées dans du milieu BHI-H en présence de concentrations croissantes (0 ; 0,5 et 1 µg/ml final) de ménadione et ajustées à une DO de 0,2 à 620 nm.

200 µl de différentes suspensions bactériennes sont introduites dans des microplaques de 96 puits. Celles-ci sont incubées en anaérobiose à 37°C pendant 4 heures.

Pour l'étude de la formation du biofilm, les microplaques sont inoculées avec les différentes suspensions préparées à raison de 200 µl par puit et sont ensuite incubées en anaérobiose pendant 48 heures.

La quantité de biomasse adhérente est proportionnelle à la quantité du cristal violet retenu dont l'absorbance est mesurée à 570 nm après chaque période d'incubation.

2.4.3. Quantification de la biomasse fixée

La biomasse fixée est quantifiée par coloration au cristal violet 1 %. En bref, la phase liquide (bactéries planctoniques) de chaque puit est débarrassée et ces derniers (puits) sont lavés trois fois à l'eau distillée. 200 µl de cristal violet sont alors ajoutés et les microplaques sont incubées à la température de la pièce pendant 45 minutes.

L'excès de colorant est éliminé suivi d'un lavage abondant des parois des puits à l'eau distillée, les microplaques sont incubées à 37°C. 200 µl d'une solution d'un mélange éthanol-acétone (75 : 25) sont ajoutés dans chaque puit, dans le but de relarguer le cristal violet adsorbé par la biomasse fixée.

L'absorbance de la solution obtenue est mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques. La quantité de colorant retenue étant alors directement proportionnelle à la quantité de bactéries fixées.

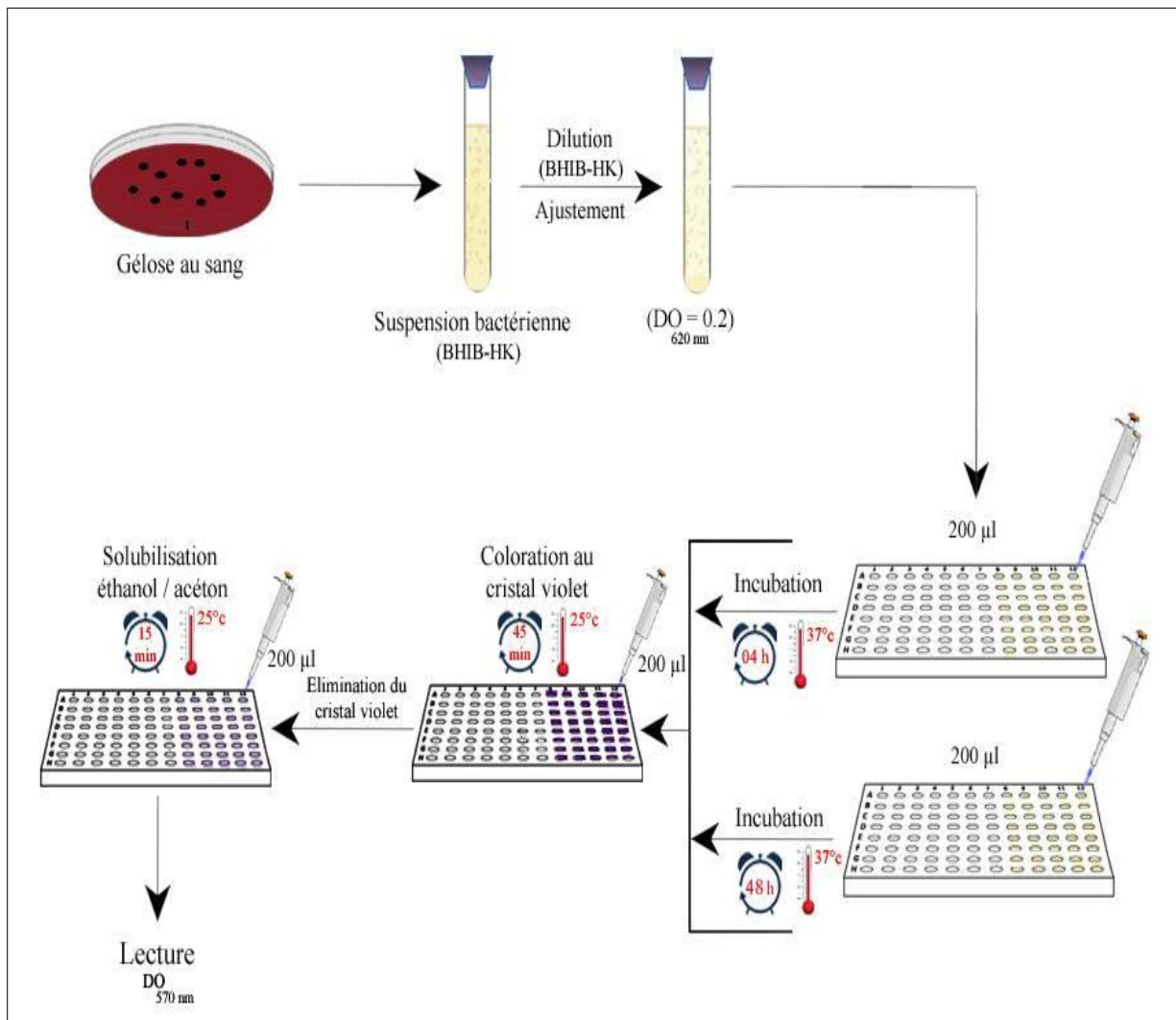


Figure 12. Présentation schématique des tests *in vitro* d'adhésion et de formation du biofilm.

2.5. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur les fibroblastes gingivaux stimulés avec le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*.

2.5.1. Culture des cellules fibroblastiques gingivales

2.5.1.1. Milieu de culture utilisé

Le milieu utilisé est le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DME) additionné de 5% de sérum foetal bovin (FBS; Sigma-Aldrich) préalablement inactivé à la chaleur (60°C; 30 minutes.), la pénicilline 100 U/ml et la streptomycine 25 pg/ml (Sigma-Aldrich).

2.5.1.2. Isolement et culture des fibroblastes gingivaux

Les fibroblastes gingivaux sont amplifiés à partir de déchets opératoires de gencives provenant d'extractions dentaires ou lors d'une greffe de gencive.

Des biopsies de la muqueuse gingivale sont prélevées lors d'opérations chirurgicales effectuées à la clinique dentaire de la faculté de médecine dentaire de l'université Laval Canada sur des patients qui ne présentent aucune pathologie parodontale.

Afin de séparer l'épithélium de la lamina propria, les biopsies préalablement dilacérées au bistouri sont traitées avec la thermolysine à raison de 500 µg/ml.

L'isolement et la dissociation des fibroblastes gingivaux consistent à découper le plus finement possible la lamina propria. Cette dissociation mécanique est complétée par une digestion enzymatique en transférant les petits morceaux récupérés dans une solution de collagénase P à 0.125 U/ml (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada) pendant 45 minutes à 37°C.

Un rinçage de la collagénase est effectué en centrifugeant la suspension cellulaire. Le culot récupéré est repris dans du milieu de culture complet pour fibroblastes.

Les cellules ainsi isolées et individualisées sont mises en culture dans un flacon de culture de 75 cm² et incubées à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Les cultures de fibroblastes sont utilisées lorsque la confluence atteint 90%.

2.5.1.3. Repiquage des cellules (Trypsination).

Lorsque le tapis cellulaire atteint la confluence, les cellules doivent être réensemencées à une plus faible densité. Cela correspond aux étapes de dissociation du tapis cellulaire au moyen d'enzyme, de lavage (centrifugation et reprise du culot) des cellules dissociées, puis de l'ensemencement de nouvelles boîtes de culture dans un milieu de culture complet.

Le tapis est rincé délicatement avec 2 ml de trypsine préchauffée en éliminant le milieu après chaque lavage. Le lavage est nécessaire afin d'éliminer les cellules mortes en suspension et le FBS, inhibiteur puissant de l'enzyme. Le tapis cellulaire reçoit dans un deuxième temps 5 ml de trypsine avant d'être incubé pendant 5 minutes à 37°C.

Après incubation, le décollement du tapis cellulaire du support et l'individualisation des cellules sont vérifiés sous microscope inversé. Dès que le décollement et l'individualisation se sont produits, l'action de la trypsine est arrêtée.

L'inactivation de la trypsine est effectuée par l'ajout de 5 ml du milieu de culture complet. Le culot est récupéré après une centrifugation pendant 10 minutes à 1200 rpm puis résuspendu dans du milieu de culture neuf. La suspension cellulaire est alors répartie dans les boîtes de culture selon la densité désirée.

2.5.1.4. Numération

10 µl de la suspension cellulaire sont transférés dans un tube à hémolyse stérile afin de réaliser une numération en présence de 10 µl de bleu Trypan (concentration finale: 0,2%) sur cellule de Malassez.

2.5.2. Préparation du lyopolysaccharide de *P. gingivalis*

L'isolement du LPS de *P. gingivalis* (ATCC 33277) est réalisé par la méthode décrite précédemment par Darveau et Hancock (1983). Les principes de digestion des protéines cellulaires au moyen de la protéinase K est à la base de cette méthode.

Le degré de pureté du LPS obtenu (absence des protéines contaminantes) est confirmé par un dosage des protéines dans la préparation au moyen d'une trousse commerciale (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) avec l'utilisation de l'albumine sérique de bœuf comme contrôle. Les stocks du LPS lyophilisés sont entreposés à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

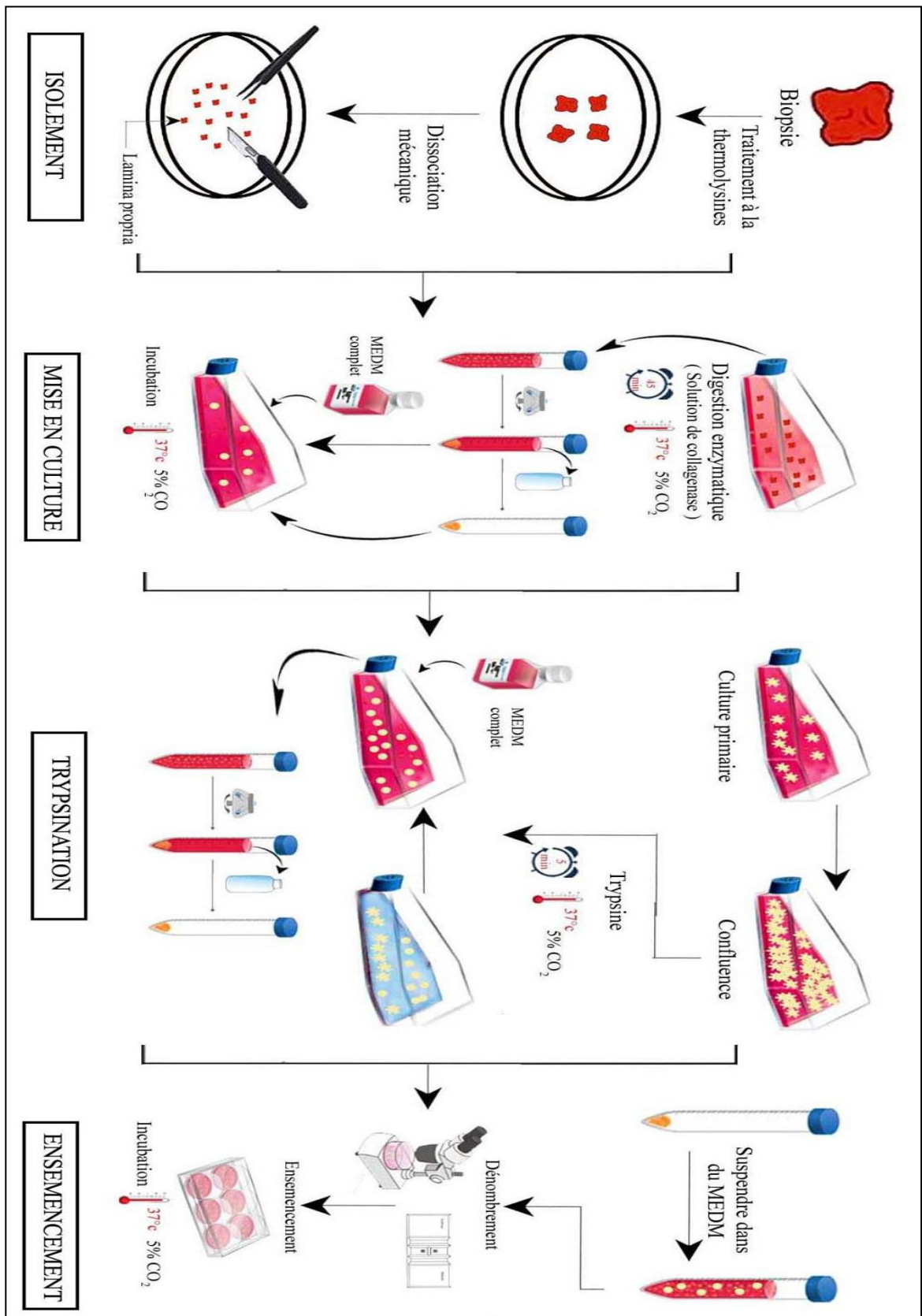


Figure 13. Présentation schématique du protocole expérimental de la culture des fibroblastes gingivaux.

2.5.3. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées ou non avec le LPS de *P. gingivalis*

2.5.3.1. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques non stimulées avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sontensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Ensuite les cultures sont mises en contact avec de l'alpha-tocophérol à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

Après chaque période d'incubation, les cellules fibroblastiques sont soigneusement lavées avec du PBS puis colorées au cristal violet (1%) à raison de 1 ml par puit. Les plaques sont incubées à la température de la pièce pendant 15 minutes. Après incubation, l'excès du colorant est éliminé puis les plaques sont soigneusement lavées à l'eau déminéralisée. Après séchage, les cultures cellulaires sont observées puis photographiées à l'aide d'un microscope inversé.

2.5.3.2. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sontensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. L'alpha-tocophérol est ensuite ajouté aux fibroblastes à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

Après chaque période d'incubation, les cellules fibroblastiques sont soigneusement lavées avec du PBS puis colorées au cristal violet (1%) à raison de 1 ml par puit. Les plaques sont incubées à la température de la pièce pendant 15 minutes. Après incubation, l'excès du colorant est éliminé puis les plaques sont soigneusement lavées à l'eau déminéralisée. Après séchage, les cultures cellulaires sont observées puis photographiées à l'aide d'un microscope inversé.

2.5.4. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés ou non avec le LPS de *P. gingivalis* (mesure de l'activité mitochondriale des cellules vivantes)

2.5.4.1. Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes non stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*.

Les fibroblastes sontensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. Ensuite les cultures sont mise en contact avec de l'alpha-tocophérol à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) puis incubées pendant 24 h et 48 h.

La croissance cellulaire est évaluée après chaque période de culture à l'aide de l'essai de réduction du MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium).

Ce test est basé sur la capacité de la déshydrogénase mitochondriale (NADH⁺) des cellules viables à réduire le MTT de couleur jaune, en cristaux de formazan pourpres, ce qui est mesuré par quantification spectrophotométrique à 570 nm après son dissolution dans l'isopropanol. La densité optique est directement proportionnelle au nombre de cellules viables.

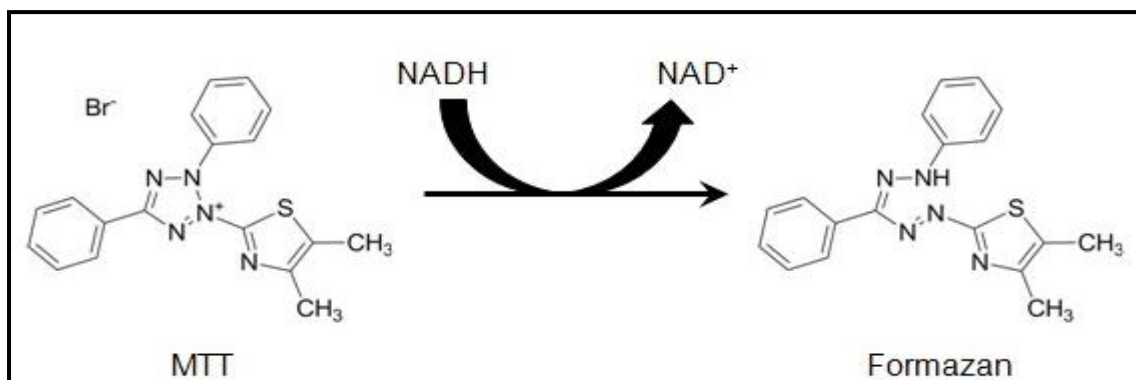


Figure 14. Principe de la réaction de réduction du MTT (Riss *et al.*, 2013).

La solution stock de MTT (Sigma-Aldrich) est préparée dans du PBS à une concentration de 5 mg/ml, puis filtrée. Après chaque période d'incubation, le milieu de culture est éliminé puis remplacé par 2 ml de milieu de culture additionné de 200 µl de MTT dissous dans du PBS.

Après 4 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité, 2 ml d'isopropanol-HCl 0.04 N sont additionnés puis les cultures sont incubées pendant 30 minutes à 37°C à l'obscurité.

Enfin, 200 µl de la solution obtenue dans chaque puit sont prélevés puis disposés dans une plaque 96 puits. Les changements colorimétriques sont mesurés à 550 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Model 680; Bio-Rad Laboratories).

2.5.4.2. Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*

Les fibroblastes sontensemencés à raison de 2×10^4 cellules par puit dans des boites de culture de six puits et incubés pendant 24 heures à 37°C en présence de 5% CO₂ en atmosphère humide. L'alpha-tocophérol est ensuite ajouté aux fibroblastes à des concentrations croissantes (50, 100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures. Les cellules sont ensuite stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) puis incubées pendant 24 h et 48 h. La croissance est évaluée en réalisant l'essai de MTT précédemment décrit.

2.5.5. Mesure des cytokines et des peptides antimicrobiens après le contact des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*.

Les fibroblastes sontensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit et incubés pendant 24 heures. Ensuite l'alpha-tocophérol est ajouté aux cellules fibroblastiques à des concentrations croissantes (50,100 et 200 µM) pour un pré-traitement de 2 heures puis les cellules sont stimulées avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml).

48 heures après le début de la stimulation avec le LPS, les surnageants de chaque condition de culture sont récupérés dans des tubes contenant 1 µl de cocktail inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) et immédiatement filtrés en utilisant des filtres de 0.22 µm.

Les surnageants obtenus sont analysés par la technique d'ELISA sandwich (enzyme linked immunosorbent assay) afin de déterminer les taux des peptides antimicrobiens (HBD-1 et HBD-2) et de cytokines (IL-1β et IL-6) sécrétés.

Les interleukines (IL-1β et IL-6) et les beta-défensines (HBD-1 et HBD-2) ont été dosés au moyen d'un kit ELISA selon les instructions du fabricant (R&D System, Minneapolis, MN) et (Peprotech, Rocky Hill, NJ) respectivement (Annexe 4). Les plaques ont été lues à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Model 680; Bio-Rad Laboratories). Les concentrations détectables minimales étaient de 1 pg/ml pour l'IL-1β, 0,7 pg/ml pour l'IL-6, 4 pg/ml pour HBD-1 et 16 pg/ml pour HBD-2 comme indiqué par le fabricant.

Les expériences ont été répétées quatre fois et les moyennes ± SD ont été calculées. Les résultats sont présentés comme étant les niveaux de cytokines ou de β-défensines par mg de

protéines totales extraites des mêmes cultures cellulaires. En effet, après la collecte des surnageants, les cellules adhérentes dans les boîtes de culture ont été d'abord détachées par l'ajout de trypsine puis centrifugées pendant 10 minutes à 270 g. Les culots récupérés sont remis en suspension dans 300 µl de tampon de lyse cellulaire (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) et incubés à 4 °C pendant 5 minutes, puis déposés pendant 10 minutes dans une microfuge froide. Les surnageants sont utilisés pour doser la concentration totale en protéines à l'aide de la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

2.5.6. Migration des fibroblastes gingivaux «scratch test»

La migration est évaluée par la capacité des cellules à recouvrir la blessure faite dans la monocouche confluente, communément nommée le «scratch test». Les fibroblastes gingivaux sontensemencés à une densité de 2×10^4 cellules par puit, en absence ou en présence de concentrations croissantes d'alpha-tocophérol (50,100 et 200 µM) avec ou sans stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* (1 µg/ml) et incubés jusqu'à confluence.

A l'aide d'un cône de prélèvement stérile de 200 µl, des brèches sont faites dans la monocouche avec l'extrémité pointue du cône de prélèvement.

La plaie créée est d'une largeur approximativement entre 0,44 et 0,50 mm. Les cultures ont été rafraîchies avec un milieu de culture neuf et maintenues sous incubation.

Des photographies numériques de chaque plaie ont été prises à l'aide d'un Coolpix 950; Nikon Canada, Montréal, QC, Canada) à différentes périodes après avoir fait la brèche. Les images sont évaluées à l'aide des logiciels ImageJ (NIH) afin de mesurer la surface relative parcourue par les cellules fibroblastiques. L'expérience est répétée six fois et les résultats sont présentés sous forme de pourcentage de la zone cicatrisée après 12, 24 et 48 heures par rapport à la zone de la plaie initiale (à temps zéro).

2.5.7. Analyses statistiques

Les résultats présentés correspondent à la moyenne d'au moins quatre expériences indépendantes \pm SD.

Les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du test t de Student et l'ANOVA one-way. Une valeur *p* inférieure ou égale à 0.05 est considérée comme statistiquement significative.

Résultats et discussion

Partie 3. Résultats et discussion

3.1. Isolement et identification de *Porphyromonas gingivalis*

La recherche de *Porphyromonas gingivalis* a été réalisée à partir d'une série de prélèvements parodontaux (parodontite agressive). Son implication en tant que facteur étiologique des parodontites a été démontré par plusieurs auteurs (Kamma *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002 ; Holt et Ebersole, 2005; Davey *et al.*, 2006; Bodet *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Boyanova, 2009; Greenwood *et al.*, 2012; Mysak, *et al.*, 2014).

La mise en culture sur gélose au sang enrichie en ménadione et en hémine a permis l'isolement de différentes bactéries parodontopathogènes. Selon Holt et Bramanti (1991), une forte proportion de bactéries anaérobies à Gram négatif est associée à la parodontite. Seuls les colonies suspectées appartenir au genre *Porphyromonas* sont retenue et repiquées sur milieu neuf.

A l'issu des repiquages successifs seulement deux isolats ont été retenus. En effet l'examen macroscopique réalisé a révélé la présence de colonies rondes, lisses et à pigmentation noire (Figure 15). L'examen microscopique après coloration de Gram, montre des coccobacille à Gram négatif regroupées en deux (cocco-diplobacilles), ou sous forme de courtes chainettes (Figure 16 et 17).



Figure 15. Aspect macroscopique de *Porphyromonas gingivalis*.

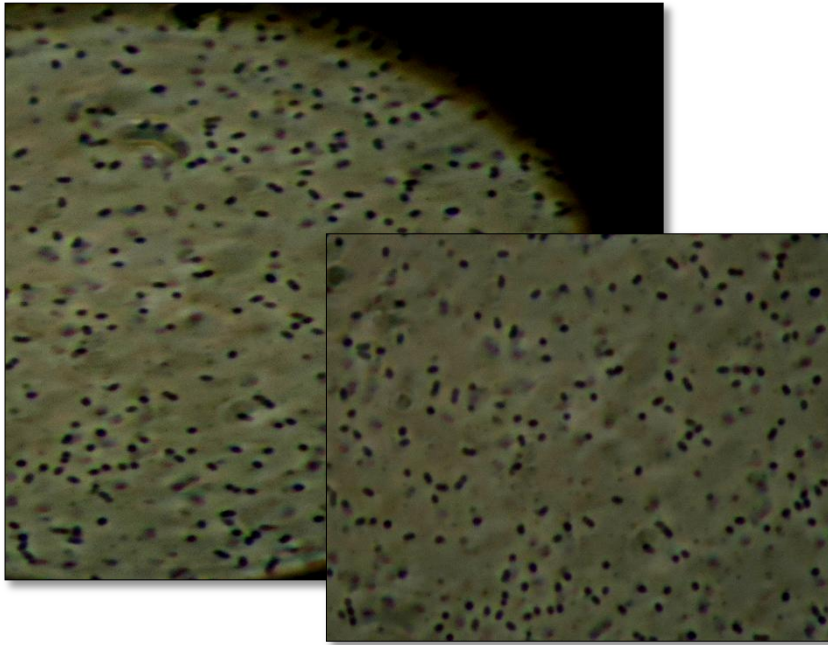


Figure 16. Observation microscopique de *Porphyromonas gingivalis* au microscope à contraste de phase (Grossissement x 100).

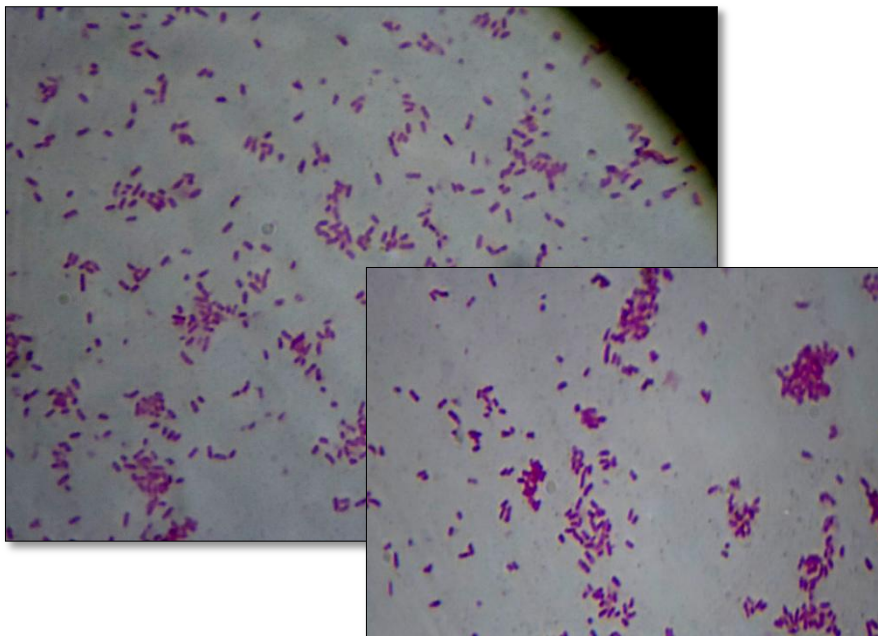


Figure 17. Observation microscopique de *Porphyromonas gingivalis* au microscope photonique après coloration de Gram (Grossissement x 100).

La recherche des enzymes a révélé chez les deux souches isolées l'absence d'oxydase et de catalase.

L'interprétation des caractères biochimiques révélés par l'API 20A (Tableau 3), a permis d'identifier les souches isolées comme appartenant à l'espèce *P. gingivalis*, dont les résultats évocateurs sont l'absence de la fermentation des sucres et la présence de la production d'indole.

Tableau 3: Résultats de l'identification biochimique à l'aide des galeries API 20 A.

Tests	IND	URE	GLU	MAN	LAC	SAC	MAL	SAL	XYL	ARA
RESULTATS	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Tests	GEL	ESC	GLY	CEL	MNE	MLZ	RAF	SOR	RHA	TRE
RESULTATS	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Les résultats obtenus suite aux examens macroscopiques, microscopiques, biochimiques ainsi que les réactions enzymatiques réalisés, peuvent être en mesure de confirmer l'appartenance des souches isolées à l'espèce *P. gingivalis*. Ainsi les critères révélés sont tout à fait en accord avec ceux rapportés dans la bibliographie (Gibson et Genco, 2006; Ludwig *et al.*, 2011; Samaranyake, 2011; Delost, 2014).

La détermination des profils de résistance des isolats aux antibiotiques testés constitue une aide précieuse à l'identification de cette bactérie.

Les valeurs des diamètres des zones d'inhibition obtenus sont comparées aux valeurs critiques établies par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (SFM, 2012) (Annexe 3).

Les résultats présentés dans le tableau 4 révèlent que *P. gingivalis* est sensible à la vancomycine et résistant à la kanamycine et la colistine. Les profils obtenus au cours de cette étude sont en accord une fois de plus, avec plusieurs résultats antérieurs (Mcbride *et al.*, 2012; Ludwig *et al.*, 2011; Delost, 2014).

Le choix des antibiotiques utilisés a été réalisé de manière à pouvoir différencier l'espèce *P. gingivalis* des autres bactéries parodontopathogènes à pigmentation noire notamment *Prevotella intermedia*.

Selon Wakabayashi *et al.*, (2009) et Loesche (1999), cette bactérie est fortement incriminée dans la parodontite chronique en association avec *P. gingivalis*. Delost (2014), a observé la sensibilité de *P. intermedia* à la colistine et sa résistance à la vancomycine, contrairement au comportement de *P. gingivalis* vis-à-vis de ces deux antibiotiques. Cette différence de comportement rend ainsi possible l'orientation et l'identification de l'espèce recherchée.

Tableau 4. Profil de résistance de *P. gingivalis* aux antibiotiques testés.

L'antibiotique testé	Diamètre	Résultats
Colistine	< 10 mm	sensible
Kanamycine	< 10 mm	sensible
Vancomycine	> 10 mm	résistante

3.2. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur la croissance de *P. gingivalis*

3.2.1. Effet du pH sur la croissance de *P. gingivalis*

La cavité buccale contient de nombreux compartiments micro-environnementaux, dans lesquels le pH et les niveaux d'oxygène sont variables (Aframian *et al.*, 2006).

L'expression et la production des enzymes responsables de la survie et de la virulence de *P. gingivalis* est nettement influencée par ces conditions environnementales (McDermid *et al.*, 1988).

L'évolution de la croissance des deux isolats cultivés dans du BHIB-HK à différents pH (5,5; 6,5; 7 et 8,5) est révélée par le tableau 5 et illustrée par la figure 18.

Tableau 5. Evolution de la croissance de *P. gingivalis* en fonction du pH.

pH	Densité optique (620 nm)	
	souche (A)	souche (B)
5,5	0,42±0,023	0,40±0,017
6,5	0,67±0,035	0,57±0,042

7	0,62±0,032	0,59±0,006
8,5	0,77±0,017	0,67±0,002

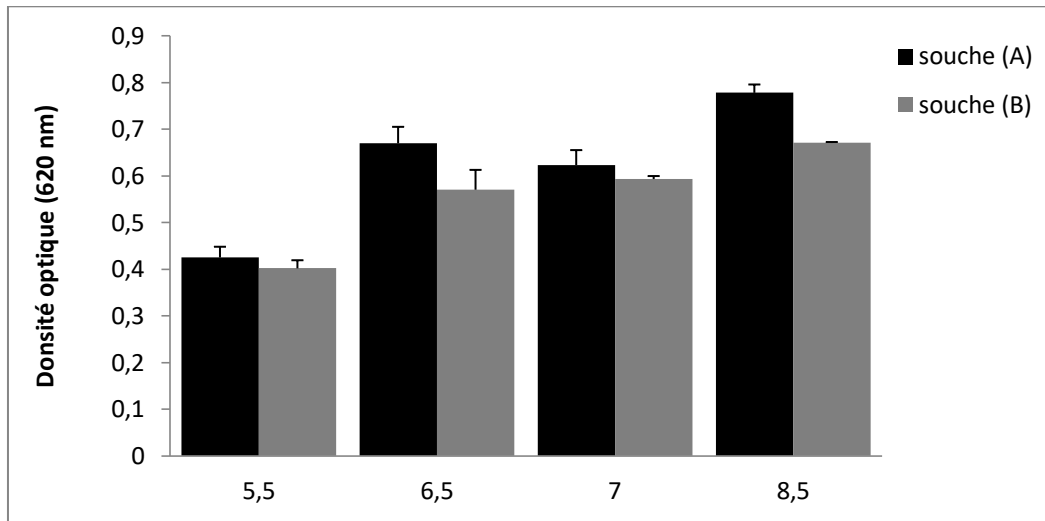


Figure 18. Détermination de l'effet du pH sur la croissance de *P. gingivalis*.

Les résultats obtenus montrent une croissance remarquable de *P. gingivalis* à pH compris entre 6,5 et 8,5. Ceci semble être en accord avec les observations faites par Takahashi et Schachtele, (1990); Takahashi *et al.*, (1997); Smalley *et al.*, (2006).

Cependant la croissance des isolats atteint son maximum à pH 8,5. Un pH qui semble caractérisé l'environnement de la poche parodontale et particulièrement le fluide gingival au cours des parodontites (Pöllänen *et al.*, 2013) et qui augmente avec la sévérité de l'inflammation et la profondeur de la poche (Murakami *et al.*, 2004). Un optimum de croissance de *P. gingivalis* dans les environnements alcalins a été démontré par plusieurs auteurs (Nelson *et al.*, 2003; Smalley *et al.*, 2006; Zilm *et al.*, 2010; Wan Ismail *et al.*, 2013; Nakayama, 2015) et qui est associé également à une augmentation de l'activité protéolytique de la bactérie (Zilm *et al.*, 2010).

Par contre, à pH acide (5,5), une diminution de la croissance est constatée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Yamawaki *et al.*, (2015), ou une inhibition importante de la croissance de *P. gingivalis* est observée en réponse à la production d'acide par *S. mutans*. Suzuki *et al.*, (2012) ont indiqué qu'à pH de 5,5 une diminution importante de la croissance de *P. gingivalis* est observée.

3.2.2. Effet de la ménadione (vitamine K) sur la croissance de *P. gingivalis*

Le fluide gingival représente une excellente source de nutriments pour les micro-organismes exigeants. En effet il contient des facteurs de croissance tels que l'hémine et la vitamine K requise par *P. gingivalis* (Marcotte et Lavoie, 1998).

Les résultats obtenus suite à la recherche de l'effet de la ménadione sur la croissance de *P. gingivalis* sont mentionnés dans le tableau 6 et illustrés par la figure 19.

Tableau 6. Evolution de la croissance de *P. gingivalis* en fonction de la ménadione.

Ménadione (µg/ml)	Densité optique (620 nm)	
	souche (A)	souche (B)
1	0,66±0,024	0,59±0,006
0,5	0,64±0,040	0,59±0,012
0	0,63±0,023	0,57±0,015

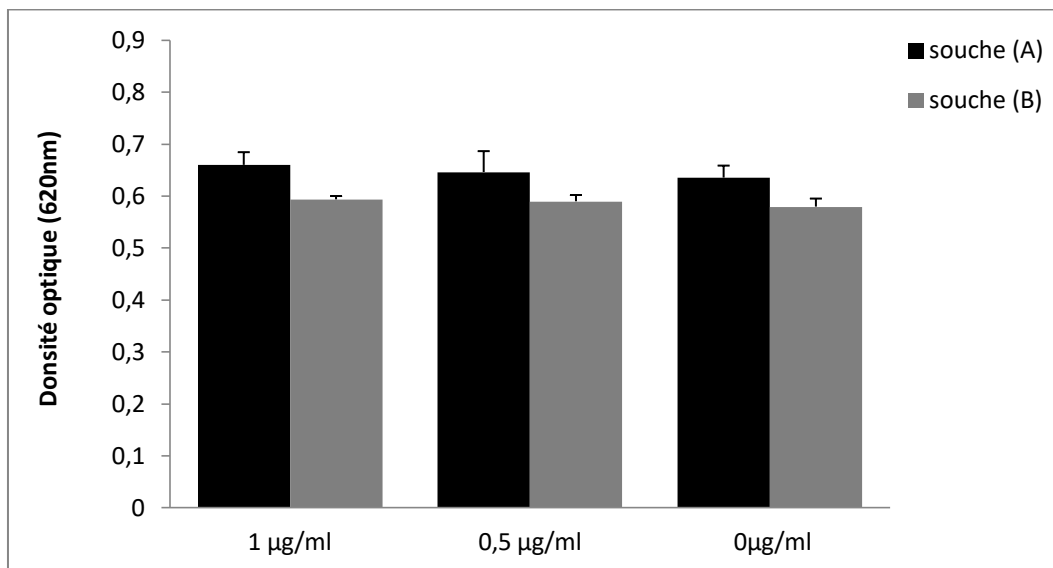


Figure 19. Détermination de l'effet de la ménadione sur la croissance de *P. gingivalis*.

Il semble que le substrat additionné au milieu de culture à des concentrations de 0,5 et 1 µg/ml n'a visiblement, eu aucun effet marquant sur la croissance des deux souches bactériennes mis à l'étude.

Selon Pizzorno et Murray, (2013), la vitamine K fonctionne en tant que cofacteur dans la production d'énergie (porteur d'électrons dans le transport d'électrons) et d'après Mayrandi et Holt (1988), cette vitamine joue un rôle dans la stimulation de la synthèse des phosphosphingolipides de l'enveloppe cellulaire, ce qui suggère un rôle possible dans la perméabilité de la membrane.

D'après Mayrand et Holt, (1988) l'exigence en ménadione pour la croissance de *P. gingivalis* est variable. Des résultats similaires sont obtenus par l'étude réalisée par Wyss, (1992) où certaines souches de *P. gingivalis* sont capables de croître en absence de ménadione dans le milieu de culture, tandis qu'une croissance plus active est notée en présence de son précurseur (l'acide 1,4-dihydroxy-2-naphthoïque). Ces données confirment l'effet négligeable de la vitamine K sur la croissance de nos isolats.

En revanche Hojo *et al.*, (2007), ont évalué la possibilité que les bifidobactéries entrent en concurrence avec *P. gingivalis* pour la vitamine K. Cette étude a montré une diminution des niveaux de croissance de *P. gingivalis* dans les milieux de cultures où la vitamine K est déjà épuisée par les bifidobactéries. Également l'étude de Kim *et al.*, (1997) indique qu'en condition limitante d'hémine et de vitamine K l'expression des facteurs de virulence de *P. gingivalis* est nettement réduite.

3.2.3 Effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance de *P. gingivalis*

Plusieurs effets bénéfiques de la vitamine E ont déjà été rapportés dans la littérature, notamment son potentiel antioxydant (Mirbagheri *et al.*, 2008; Ozler *et al.*, 2011; Pierpaoli *et al.*, 2011; Masadeh *et al.*, 2012) et son effet anti-inflammatoire (Ekstrand-Hammarström *et al.*, 2006; Tahan *et al.*, 2011).

L'activité antibactérienne de l'alpha-tocophérol envers *P. gingivalis* a été évaluée. Pour ce faire, *P. gingivalis* a été mis en culture pendant 48 h en condition d'anaérobiose. L'alpha-tocophérol a été additionné dans le milieu de culture à des concentrations variant de 50 à 200 µM.

Les résultats mentionnés dans le tableau 7 et illustrés par la figure 20 révèlent clairement qu'à une concentration de 200 µM, la vitamine E inhibe de façon significative la croissance de *P. gingivalis*. Toutefois, à des concentrations de 50 et 100 µM la vitamine s'est avérée nettement moins efficace pour réduire la croissance bactérienne.

Tableau 7. Evolution de la croissance de *P. gingivalis* en fonction de l'alpha-tocophérol.

Alpha-tocophérol (µM)	Densité optique (620 nm)	
	souche (A)	souche (B)
ctrl	0,66±0,025	0,59±0,021
50	0,64±0,009	0,58±0,012
100	0,63±0,007	0,57±0,009
200	0,56±0,003	0,47±0,002

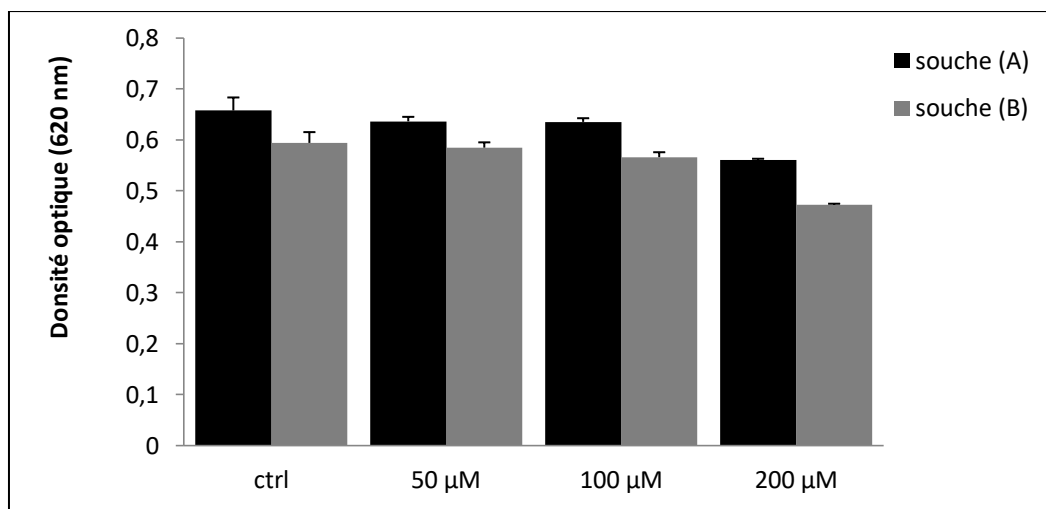


Figure 20. Détermination de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance de *P. gingivalis*.

Les propriétés antibactériennes de la vitamine E ont été démontrées au cours de plusieurs travaux. Selon l'étude de Pierpaoli *et al.*, (2011) réalisée sur un model animal, la vitamine E a inhibé significativement la croissance de *Staphylococcus aureus*. Egalement l'étude *in vitro* réalisée par Abd Al Kader Al-Salih *et al.*, (2013) a démontré la sensibilité des *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E.coli* à la vitamine E. Ces travaux semblent être

en accord avec les résultats obtenus au cours de cette étude relative à l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance de *P. gingivalis*.

Les mécanismes impliqués dans l'activité antibactérienne de l'alpha-tocophérol sont encore mal connus. Il semble que les vitamines agissent par des mécanismes spécifiques qui dépendent à la fois de la souche bactérienne et de la structure moléculaire même de la vitamine (Tintino *et al.*, 2016).

L'activité antibactérienne de l'alpha-tocophérol pourrait être liée à la lipophilie de cette substance qui par conséquent peut altérer la structure des lipoprotéines membranaires de la bactérie, ce qui entraîne des dommages au niveau des composants essentiels pour l'intégrité de la membrane et, par conséquent, les transporteurs membranaires peuvent être significativement affectés par cette vitamine (Gibbons, 2004; Tintino *et al.*, 2016).

Selon Sikkema *et al.*, (1994) le potentiel membranaire peut aussi être affecté, ce qui conduit à la perte d'ions, du cytochrome C, les protéines et les radicaux et enfin, l'effondrement du système de pompes à protons et la diminution de l'ATP intracellulaire.

D'autre part l'étude *in vivo* de Schanaider *et al.*, (2003) réalisée sur des rats avec obstruction intestinale a permis de démontrer que l'alpha-tocophérol peut empêcher la translocation bactérienne et exercer donc un effet protecteur sur la muqueuse intestinale après obstruction.

3.3. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur les caractéristiques pariétales de *P. gingivalis*

3.3.1. Etude de l'hydrophobicité de la paroi de *P. gingivalis*

3.3.1.1. Effet du pH sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

La nature moléculaire de la surface bactérienne est une caractéristique cruciale dans l'interaction entre les micro-organismes et l'hôte (Mamo, 1989). L'hydrophobie / hydrophilie est l'une des propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne qui sont associées au phénomène d'adhésion aux cellules hôtes et aux surfaces inertes (Weiss *et al.*, 1982; Bendinger *et al.*, 1993; van der Mei *et al.*, 1997; Teixeira *et al.*, 2005; Oufriid *et al.*, 2014).

L'hydrophobicité de la surface microbiennes est estimée par le pourcentage de cellules adhérentes au solvant apolaire; l'hexadécane. Selon l'étude de Lee et Yii (1996) la surface bactérienne est dite hydrophobe quand le pourcentage d'affinité aux solvants apolaires est

supérieur à 50%, hydrophile quand ce pourcentage est inférieur à 20% et moyennement hydrophobe quand ce dernier est entre ces deux valeurs. La figure 21 présente l'évolution du caractère hydrophobe de *P. gingivalis* en fonction de la variation du pH.

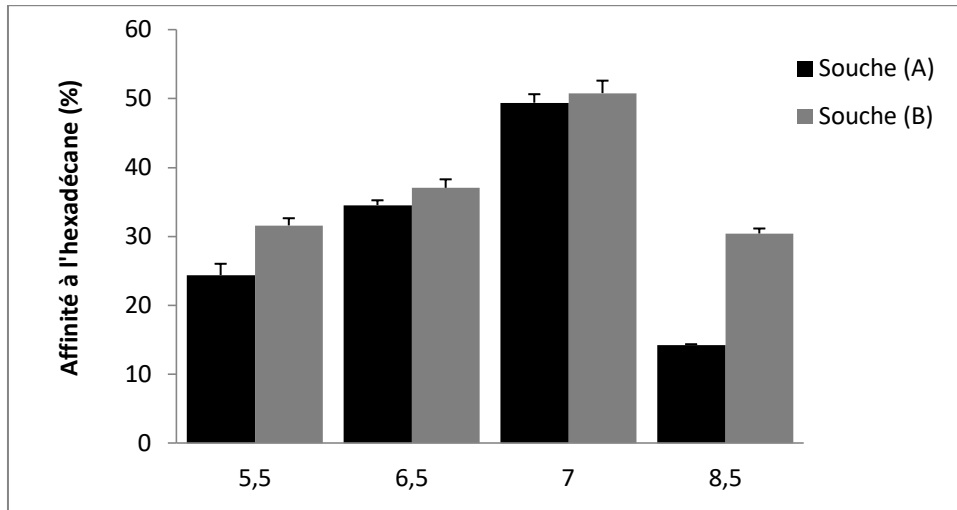


Figure 21. Détermination de l'effet du pH sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*.

D'après les résultats obtenus et en se basant sur le principe de Lee et Yii, énoncé précédemment, l'hydrophobicité des deux isolats étudiés passe d'un caractère modérément hydrophobe à des pH de 5,5 et 6,5 à un caractère hydrophobe plus marqué au pH 7, révélé par un maximum d'affinité à l'hexadécane estimée à 49,38% et 50,77% respectivement pour les souches A et B mises à l'étude.

Certains travaux, ont rapporté que l'hydrophobicité pouvait augmenter avec la diminution du pH; plus le pH est acide, plus la bactérie est chargée positivement, ce qui rend les répulsions électrostatiques entre la bactérie et l'hexadécane moins importantes. Ce ci est dû à la neutralisation des groupements chimiques chargé sur la surface bactérienne et par conséquent, l'hydrophobicité augmente. (Briandet *et al.*, 1999 ; Hamadi *et al.*, 2004).

Les études de (Rosenberg *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1992; Hamada *et al.*,1994; Davey et Duncan, 2006) montrent que les souche de *P. gingivalis* cultivées dans des conditions optimales de pH (pH neutre) et de nutriments, sont hydrophobes. Ces résultats confirment le caractère hydrophobe exprimé par les isolats. Oyston et Handley, (1990) supposent que l'hydrophobicité de la surface bactérienne peut être due à la présence de certaines macromolécules telles que les fimbriae. Watanabe et collaborateurs (1992) ont montré que l'hydrophobicité de *P. gingivalis* est en relation avec le nombre de fimbriae exprimé. Tandis

que Malek *et al.*, (1994) ont démontré, quant à eux, que l'inactivation du gène *fimA* codant pour l'expression des fimbriae majeurs n'affecte pas l'hydrophobicité de *P. gingivalis*.

La diminution de l'hydrophobicité des isolats notée à des pH de 5,5 et 6,5 peut être due au changement de conformation et à la réorganisation spatiale de macromolécules membranaires. (Boutaleb, 2007; Boutaleb, 2008). Ces modifications structurales peuvent changer les charges exposées à la surface cellulaire ce qui fait que l'hydrophilicité soit peu perceptible.

Le maintien ou le changement de la conformation des composantes de la paroi est en relation avec les interactions attractives/répulsives qui dépend, bien évidemment, de la nature de la souche microbienne étudiée et de la neutralisation des charges les unes par les autres (Boutaleb, 2007).

D'autre part la diminution de l'affinité à l'hexadécane, marquée à ces deux pH, peut être également due à la synthèse de macromolécules de nature hydrophile. Davey et Duncan, (2006) ont montré que les LPS peuvent contribuer à la faible hydrophobicité de ces souches.

Selon Hamadi *et al.*, (2004) la surface bactérienne expose plus de charges négatives avec l'augmentation du pH, ce qui conduit à des interactions répulsives plus importantes entre l'hexadécane et la surface bactérienne et par conséquent la réduction du caractère hydrophobe. Ceci peut expliquer la diminution de l'hydrophobicité lors du passage du pH neutre (7,5) au pH basique (8,5). Les mêmes résultats ont été observés par Boutaleb, (2007) sur *P. aeruginosa* et *E. coli* en passant d'un pH 6,5 à un pH 7,5.

3.3.1.2. Effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Les propriétés physico-chimiques de la cellule bactérienne semblent très dépendantes de la composition structurale de la surface (Cowan *et al.*, 1992 ; El Ghmari *et al.*, 2002) et des conditions environnementales telles que la température, la composition du milieu, et le pH (Hamadi *et al.*, 2004; Lý *et al.*, 2007). L'altération de ces conditions peut par conséquent affecter l'adhésion du pathogène (Bonaventura *et al.*, 2008; Zeraik et Nitschke, 2012).

A partir de la figure 22, nous pouvons déduire que les souches de *P. gingivalis* cultivées en présence de concentration de 1 µg/ml de ménadione présentent un maximum d'affinité à l'hexadécane, 49,38% et 53,13% respectivement. Elles sont donc jugées hydrophobes. Avec la diminution de la concentration en ménadione dans le milieu de culture, une réduction significative de l'hydrophobicité est notée, où un caractère moyennement hydrophobe voire hydrophile est marqué quand les souches sont cultivées en présence de 0,5 µg/ml de

ménadione. Contrairement à ce constat et en absence totale de vitamine K, les souches demeurent relativement hydrophobes.

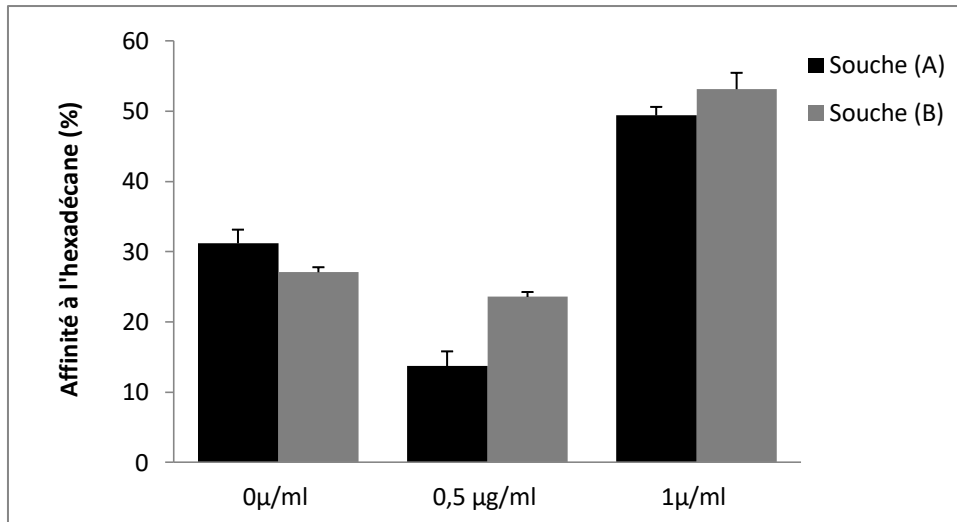


Figure 22. Détermination de l'effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*.

L'effet du milieu de culture sur l'hydrophobicité de surface a été abordé par plusieurs études. Briandet *et al.*, (1999) ont montré que le milieu de croissance additionné d'acide lactique affecte significativement l'hydrophobicité de *Listeria monocytogenes*. Selon Latrache *et al.*, (2000), les variations de la composition du milieu de culture influencent significativement le caractère hydrophobe des souches d'*E.coli*. Egalement, Zeraik et Nitschke, (2012), ont conclu que l'hydrophobicité de *P. aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* et *L. monocytogenes* est fortement influencée par les conditions nutritionnelles.

A ce jour, aucune recherche portant sur l'effet de la ménadione sur l'hydrophobicité de surface n'a été réalisée, d'où l'impossibilité de toute comparaison possible avec les résultats obtenus au cours de cette présente étude.

Les différences d'affinité à l'hexadécane révélées par nos isolats peuvent être expliquées par le changement de la composition élémentaire de la surface de *P. gingivalis*. L'étude de Hamadi *et al.*, (2005), a révélé l'effet du milieu de culture sur les différentes propriétés de surface d'*E.coli*: la charge, les groupements fonctionnels et la composition moléculaire en protéines et en polysaccharides.

En effet, plusieurs auteurs et en se basant sur la technique XPS (spectroscopie de photoélectrons X), ont montré que l'hydrophobicité, peut par exemple augmenter avec le taux de protéines membranaires (dédduit du rapport N/C) présentes à la surface de la bactérie, et

diminuer en présence de composés de nature polysaccharidique (représentés par le rapport O/C) (Kos *et al.*, 2003; Hamadi *et al.*, 2004; Hamadi *et al.*, 2008).

3.3.1.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*

Bien que l'hydrophobicité soit l'une des propriétés physico-chimiques permettant d'expliquer l'établissement de l'adhérence irréversible, il est important d'avoir à l'esprit que l'hydrophobicité de surface est un paramètre fragile. Il a été démontré qu'elle peut être significativement altérée par l'exposition à des concentrations subinhibitrices d'antibiotiques ou de surfactants (Absolom, 1988; Samot, 2012).

De ce fait, nous avons essayé d'évaluer la capacité de l'alpha-tocophérol, une molécule à effet antioxydant, sur l'hydrophobicité de la surface bactérienne.

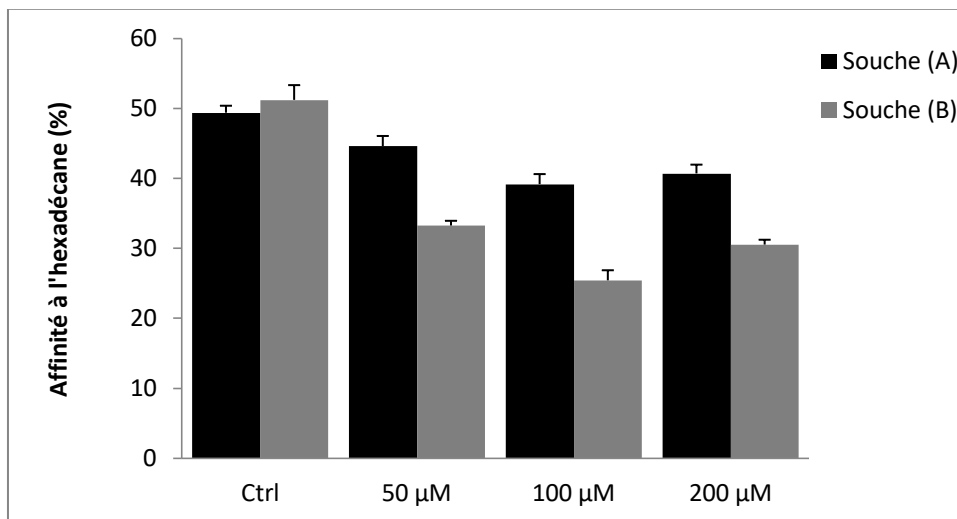


Figure 23. Détermination de l'effet de l'alpha-tocophérol sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*.

En absence d'alpha-tocophérol, les surfaces bactériennes semblent présenter un caractère hydrophobe, révélé par un pourcentage d'affinité de 49,38% et 51,22% à l'hexadécane. Cependant en présence de l'alpha-tocophérol à des concentrations de 50 µM et 100 µM le caractère hydrophobe tend, de manière significative vers l'hydrophilie.

En outre, l'évolution de l'hydrophobicité semble avoir été, dépendante de la concentration en alpha-tocophérol utilisée. Plus la concentration est élevée, plus l'hydrophobicité est réduite.

Pour une concentration en vitamine de 200 µM, le caractère hydrophobe, bien qu'il demeure sensiblement réduit comparativement à celui du contrôle, semble paradoxalement exprimer une hydrophobicité supérieur à celle révélée en présence de 100 µM.

Le pouvoir antibactérien ainsi que d'autres effets bénéfiques de la vitamine E ont été précédemment rapporté (Mirbagheri *et al.*, 2008; Ozler *et al.*, 2011; Pierpaoli *et al.*, 2011; Masadeh *et al.*, 2012). Cependant très peu de travaux menés sur l'évaluation de sa capacité d'apporter des modifications sur les propriétés physico-chimiques de la surface bactérienne ont été réalisés.

Uberos et ces collaborateurs (2001) ont évalué la relation possible entre l'effet antioxydant de la vitamine E et l'hydrophobicité de la surface des souches d'*E.coli*. Ces chercheurs ont démontré que cette vitamine affecte d'une façon très significative l'hydrophobicité de ces souches. Nos résultats précédemment décrits sont en accord avec ceux obtenus par ces chercheurs. Il est probable que l'alpha-tocophérol, se lie ou masque les macromolécules hydrophobes de la surface cellulaire telles que les protéines.

En outre, d'autres substances à effet antioxydant comme l'extrait de la canneberge ont été testées afin de déterminer leurs capacités à apporter des modifications sur l'hydrophobicité de *P. gingivalis*.

Les constituants de la canneberge sont connus pour leurs propriétés cariosatitiques Yamanaka-Okada *et al.*, (2008). Leur pouvoir de prévenir l'adhérence aux surfaces apatitiques et d'inhiber la formation de biofilms par les bactéries orales a été démontré par plusieurs auteurs (Weiss *et al.*, 2002 ; Yamanaka *et al.*, 2004 ; Duarte *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2010; Sethi et Govila, 2011).

Du fait que l'hydrophobicité de la surface cellulaire joue un rôle important dans l'adhérence des bactéries orales aux surfaces dentaires, Yamanaka *et al.*, (2004) ont démontré une réduction importante de l'hydrophobicité des streptocoques oraux et leur capacité d'adhérence en présence d'extrait de la canneberge. Des résultats similaires sont obtenus par Yamanaka-Okada et collaborateurs (2008) suite au traitement des *S. mutans* et *S. sobrinus* avec le polyphénol de la canneberge.

Cependant, selon l'étude de Labrecque *et al.*, (2006) l'hydrophobicité de *P. gingivalis* n'a pas été affecté par l'extrait de la canneberge.

3.3.2. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis*

3.3.2.1. Effet du pH sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

Certains auteurs considèrent l'hydrophobicité de la surface bactérienne comme étant le paramètre clé qui gouverne l'adhésion bactérienne (Boutaleb, 2007). Cependant des données de la littérature (Rouxhet et Mozes, 1990; Djeribi *et al.*, 2013) ont rapporté que

l'hydrophobicité et la charge étaient insuffisantes pour expliquer le phénomène d'adhérence. Ainsi, l'implication des propriétés donneur / accepteur d'électrons (caractéristiques acide-base de Lewis) pourrait être à l'origine des processus d'adhésion des micro-organismes aux surfaces (Oufrid, 2014).

Le caractère acide-base de Lewis de la surface bactérienne est quantifié par la capacité de la bactérie à s'adsorber sur un solvant accepteur d'électrons (acide) tel que le chloroforme ou donneur d'électrons (basique) comme l'acétate d'éthyle (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Les résultats de la technique MATS obtenus pour les deux isolats de *P. gingivalis* sous différents pH sont présentés dans le tableau 8 et illustrés par la figure 24.

Tableau 8. Résultats du test MATS en fonction du pH.

	pH	Affinité aux solvants (%)			
		Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
Souche (A)	5,5	88,19±1,36	24,37±1,64	47,79±0,69	32,27±1,99
	6,5	84,77±0,61	34,53±0,69	38,35±2,41	23,29±1,84
	7	83,53±0,71	49,38±1,23	37,32±1,96	38,14±1,05
	8,5	74,11±1,17	14,23±0,11	26,98±2,47	15,18±1,85
Souche (B)	5,5	68,69±2,53	31,58±1,04	44,3±1,40	30,79±0,68
	6,5	68,39±1,72	37,03±1,23	50±2,11	43,90±0
	7	65,12±2,08	50,77±1,81	49,34±2,53	42,79±0,71
	8,5	69,83±1,86	30,41±0,72	36,08±1,18	29,51±0,85

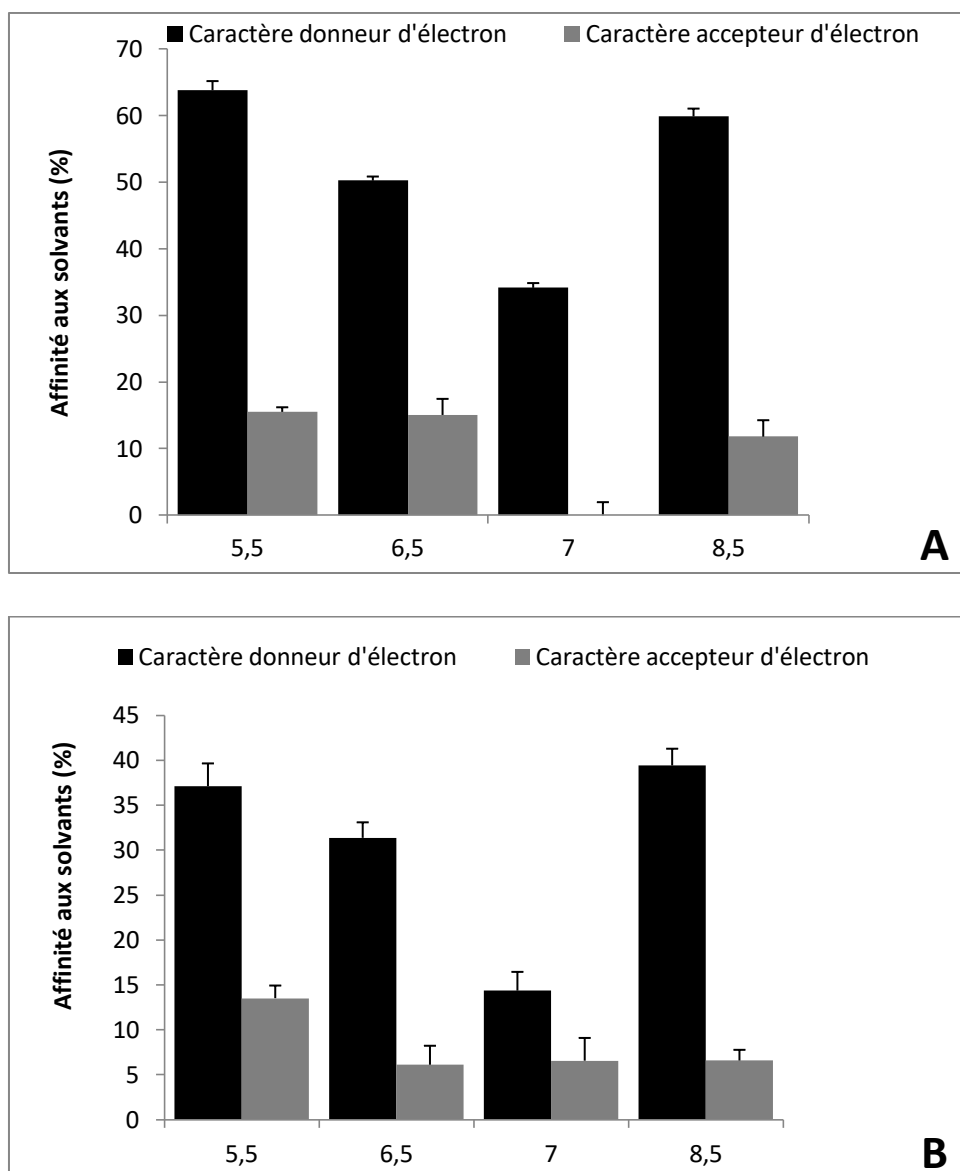


Figure 24. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction du pH.

Quel que soit le pH, les isolats semblent présenter un fort caractère donneur d'électrons prononcé du fait de leur affinité marquée au chloroforme qu'à l'hexadécane (solvant apolaire) avec un taux d'adhésion compris entre 65 et 88%. Pour des pH de 5.5 et 8.5, un maximum de caractère basique au sens de Lewis est observé, où une plus grande affinité au chloroforme a été constatée.

Des résultats similaires ont été révélés avec *S. aureus*, où une nette augmentation est notée dans les deux pH limites; acide (pH 3) et basique (pH 11) (Hamadi *et al.*, 2004).

Boutaleb, (2007) a montré que chez la bactérie *P. aeruginosa*, une diminution du caractère donneur d'électrons a été remarquée avec l'augmentation du pH. Les modifications du

caractère donneur d'électrons de la bactérie découlent nécessairement du déplacement des équilibres de protonation /déprotonation des groupements basiques.

Le caractère donneur doit se révéler important si les groupements, de type COO^- sont déprotonés, à pH neutre ou alcalin (Boutaleb, 2007; Djeribi *et al.*, 2013) du fait que la déprotonation de divers groupements augmentent avec l'augmentation du pH (Briandet *et al.*, 1999; Djeribi *et al.*, 2013). Cependant les souches isolées pour cette étude exhibent un comportement différent vis-à-vis de la variation du pH. En effet, une diminution de ce caractère a été notée à des pH variant de 5,5 à 7. Des résultats similaires ont été démontrés par l'étude de Djeribi *et al.*, (2013) sur *Acinetobacter baumannii*.

Quant au caractère accepteur d'électron, ce dernier est estimé par la différence entre le pourcentage d'adhésion à l'acétate d'éthyle et celui du décane (solvant apolaire), mais seulement les valeurs positives ont été prises en considération.

Comme mentionné dans le tableau 8, l'affinité est plus élevée avec l'acétate d'éthyle qu'avec le décane pour tous les pH, ce qui indique la présence du caractère accepteur d'électron. Ce caractère peut être attribué à la présence de groupements acides (Rubio, 2002; Djeribi *et al.*, 2013) ou aux charges négatives exposées à la surface cellulaire (Bergeron *et al.*, 2009).

Néanmoins ce caractère est relativement faible en comparaison avec le caractère donneur d'électron des deux souches. Il est à noter qu'à pH 7, le caractère Lewis-acide a été négligeable pour une des deux souches testées. Certaines études ont estimé le caractère acide-base de la surface des cellules microbiennes à pH neutre. Celles-ci, ont révélé que la surface des cellules présente un caractère fortement donneur et faiblement accepteur d'électrons. Ceci étant particulièrement net pour la souche *P. aeruginosa*. (Pelletier *et al.*, 1997; Hamadi *et al.*, 2004).

Nous pouvons constater selon les résultats mentionnés dans le tableau 8 que le caractère donneur d'électrons de la surface de *P. gingivalis* est significativement plus élevé que le caractère accepteur d'électron. Ces résultats indiquent donc une basicité de la surface.

3.3.2.2. Effet de la ménadione sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 9 et illustrés par la figure 25, il apparaît que les deux souches cultivées en absence et en présence de différentes concentrations en ménadione présentaient plus de caractère donneur d'électron. Ce résultat est révélé par une affinité supérieure au chloroforme (solvant accepteur d'électrons) qu'à l'hexadécane (solvant

apolaire). Cependant le caractère (Lewis-base) semble diminuer avec l'augmentation de la concentration en ménadione.

En ce qui concerne le caractère accepteur d'électron, les pourcentages d'affinité à l'acétate d'éthyle indiquent un caractère Lewis-acide relativement faible. Il à noter qu'en présence de 0,5 µg/ml de ménadione les surfaces bactériennes montrent un caractère accepteur d'électron plus marqué, bien qu'il reste relativement réduit en comparaison avec le caractère donneur d'électron.

Tableau 9. Résultats du test MATS en fonction de la ménadione.

Ménadione (µg/ml)	Affinité aux solvants (%)			
	Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
0	72,28±3,18	31,19±1,95	49,38±2,46	40,16±0,69
Souche A 0,5	50,9±0,85	13,71±2,11	31,6±2,69	16,23±0,74
1	83,99±1,29	49,38±1,23	39,23±2,03	38,02±1,61
0	85,83 ±1,90	27,08±0,72	29,59±0,56	25,12±0,54
Souche B 0,5	67,88±1,86	23,57±0,70	41,74±0,97	23,17±1,21
1	90,24±1,25	53,13±2,33	50,52±0,67	45,41±1,44

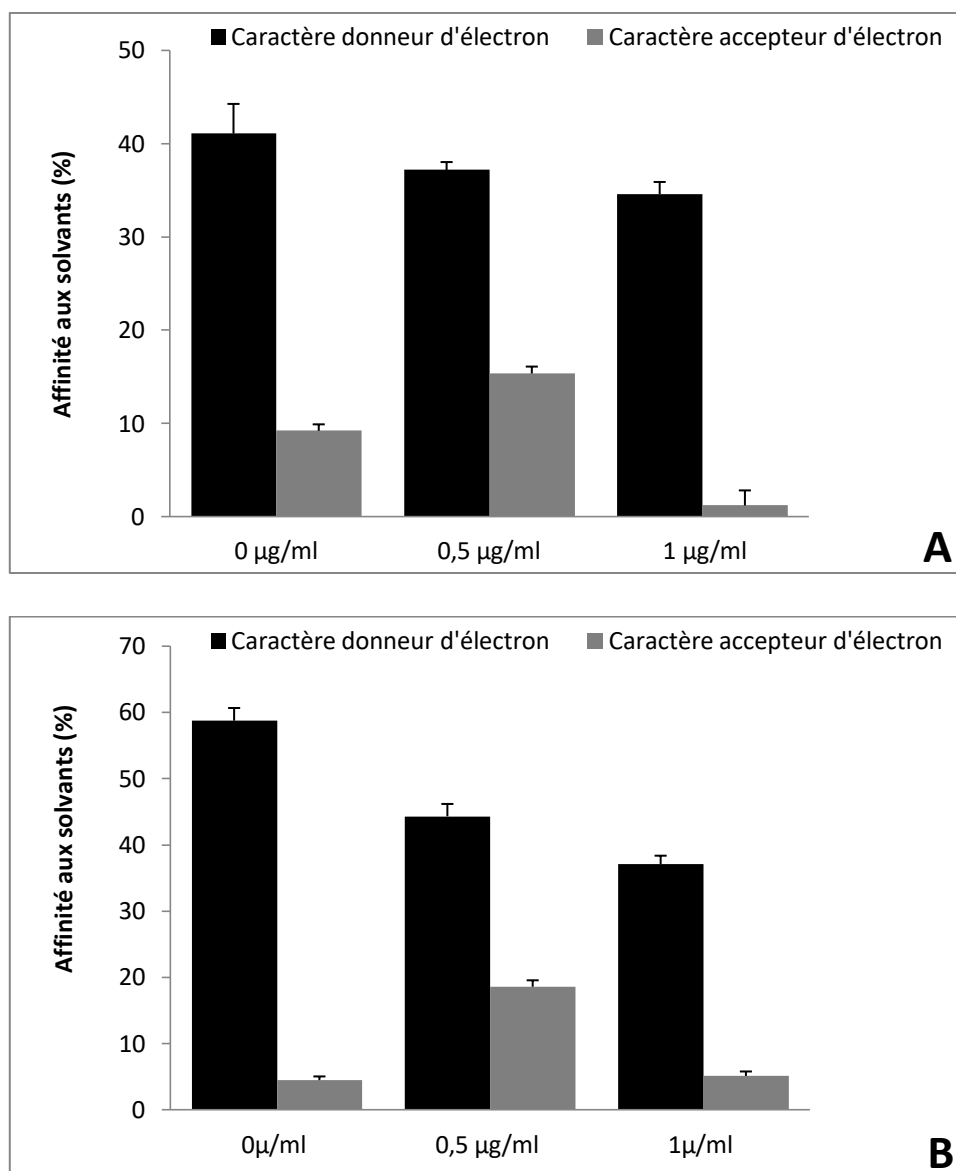


Figure 25. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction de la ménadione.

Les bactéries sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire, et par conséquent leurs propriétés physico-chimiques de surface.

Au cours des travaux de (El Gghmari *et al.*, 2002; Hamadi *et al.*, 2008; Hamadi *et al.*, 2009) réalisés sur la relation entre les propriétés physico-chimiques et la composition chimique de surface, il a été rapporté que chaque propriété est engendrée par des éléments chimiques particuliers.

La prédominance du caractère donneur d'électrons peut constituer une indication sur la nature des groupements chimiques exposés, puisque l'importance du caractère donneur d'électrons

est attribué aux groupements chimiques généralement chargés négativement ou neutres, comme les groupements carboxylates (COO⁻), les groupements amine (NH₂) et phosphate (PO₄⁻) des phospholipides, lipoprotéines et les lipopolysaccharides (Briandet *et al.*, 1999; Rubio, 2002; Hamadi *et al.*, 2004; Polak-Berecka *et al.*, 2014). Le caractère accepteur d'électrons est généralement attribué aux groupements acides comme RNH₃⁺ (Rubio, 2002).

Cependant, ces propriétés ne sont pas « figées » et peuvent évoluer en fonction de l'environnement physique et chimique des micro-organismes.

Certaines études ont évalué l'effet que pourraient apporter les conditions stressante de culture sur les propriétés acide-base au sens de Lewis, Bereksi *et al.*, (2002) ont montré que l'ajout du NaCl dans le milieu de culture affecte les propriétés physico-chimiques de surface de *L. monocytogenes*.

3.3.2.3. Effet de l'alpha-tocophérol sur le caractère donneur/ accepteur d'électrons

L'analyse des résultats mentionnés dans le tableau 10 et illustrés par la figure 26, permet de dresser le constat suivant : La surface des deux souches de *P. gingivalis* présente une légère diminution du caractère donneur d'électron à la concentration de 50 µM d'alpha-tocophérol. Puis à des concentrations de 100 µM et 200 µM. Ce caractère augmente d'une manière significative. Il est à noter que pour toutes les concentrations en vitamine E, une forte affinité au chloroforme qu'à l'hexadécane a été observée. Ce qui indique la dominance du caractère basique au sens de Lewis.

Quant au caractère accepteur d'électron, il, s'est maintenu presque constant et relativement faible pour les différentes concentrations d'alpha-tocophérol testées. Il a été révélé par des pourcentages d'affinité à l'acétate d'éthyle très proches.

Tableau 10. Résultats du test MATS en fonction de l'alpha-tocophérol.

Alpha-tocophérol (µM)	Affinité aux solvants (%)			
	Chloroforme	Hexadécane	Acétate d'éthyle	Décane
Ctrl	82,51±1,12	49,38±0,99	37,9±0,44	37,48±2,50
50	75,58±1,33	44,61±1,44	47,91±1,90	31,66±0,38
Souche				

A	100	85,94±1,39	39,16±1,44	58,23±1,84	41,8±0,75
	200	88,33±0,72	40,7±1,25	54,75±2,83	37,35±2,38
	Ctrl	79,79±1,06	51,21±2,11	50,85±1,99	43,49±1,66
Souche	50	58,36±1,39	33,25±0,67	38,99±1,88	34,13±2,44
B	100	60,41±1,90	25,41±1,44	33,75±2,03	28,08±0
	200	64,51±1,50	30,52±0,69	30,35±1,15	24,49±1,84

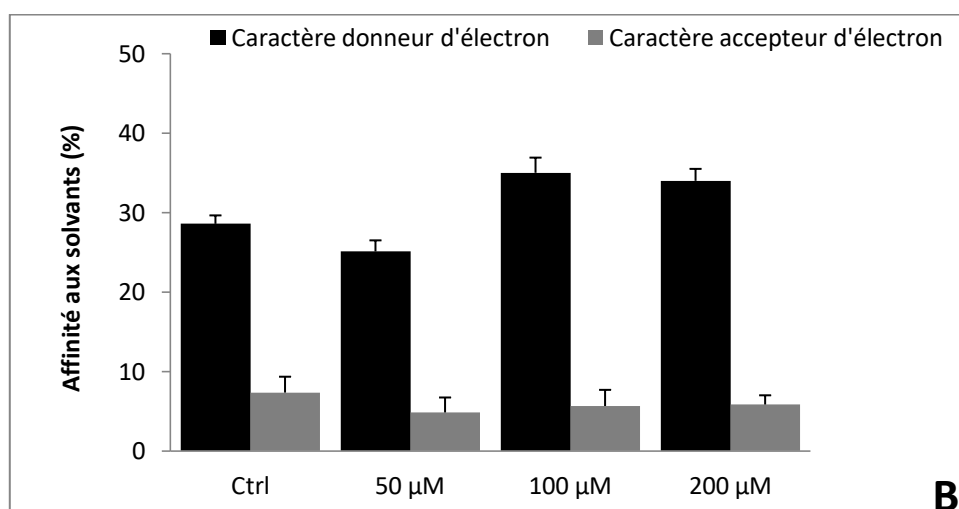
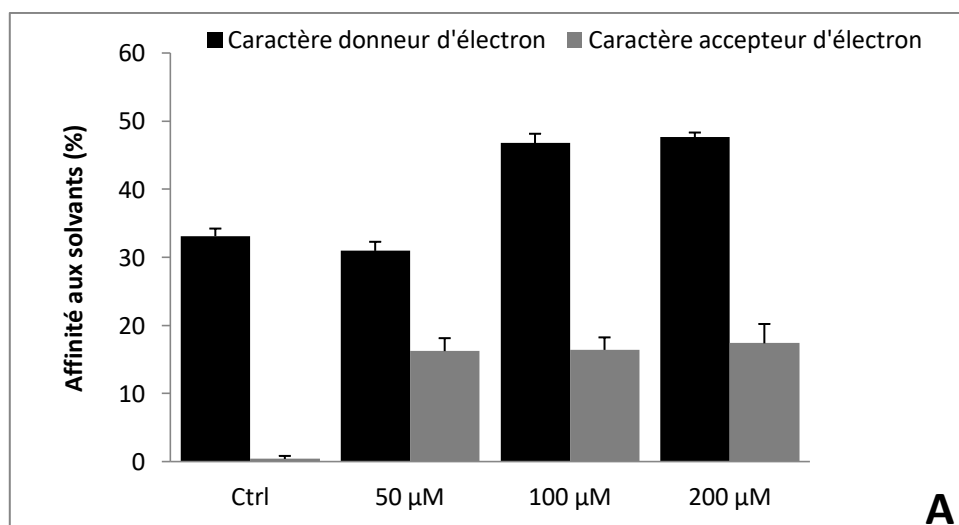


Figure 26. Détermination du caractère donneur/accepteur d'électrons de *P. gingivalis* en fonction de l'alpha-tocophérol.

Aucune explication ne peut être fournie afin d'expliquer l'évolution du caractère acide-base de Lewis révélée par les isolats de *P. gingivalis*. Sachant que tout caractère reste dépendant de la souche bactérienne considérée, Boutaleb, (2007) soupçonne que ce comportement pourrait découler d'une certaine réactivité des groupements acides présents à la surface cellulaire avec ceux basiques du fait de la nette prépondérance du caractère donneur d'électrons sur celui d'accepteur.

3.4. Effet de certains paramètres physico-chimiques sur l'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

3.4.1. Effet du pH sur l'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

Lors de l'adhésion et l'établissement du biofilm, les cellules bactériennes demeurent sensibles aux changements environnementaux, elles doivent être en mesure de maintenir un équilibre approprié entre le passage de l'état planctonique au biofilm. Un processus qui fait impliquer l'interaction de divers facteurs cellulaires bactériens (Lo *et al.*, 2010). Ces interactions peuvent être modifiées par les changements de pH et des forces ioniques (Hirose *et al.*, 1996).

Des tests d'adhésion ont donc été réalisés dans ce sens. Les résultats sont donnés en ratio par rapport aux puits témoins (BIHB-HK sans bactéries) afin de s'affranchir de la coloration non spécifique de la surface des puits des microplaques par le cristal violet. Il est admis, arbitrairement, qu'une souche adhère lorsque le ratio est supérieur à 2, ce qui veut dire que l'absorbance est 2 fois supérieure par rapport aux puits témoins.

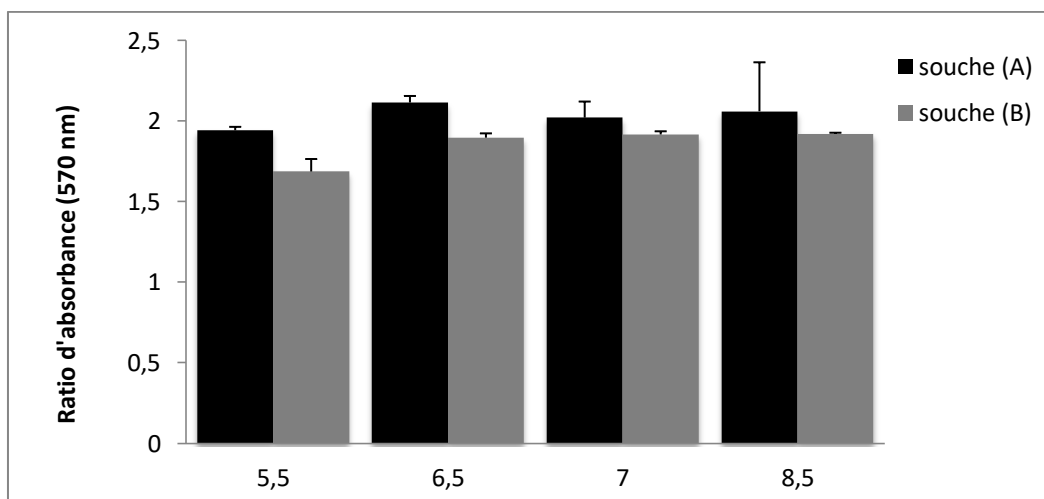


Figure 27. Détermination de l'effet du pH sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*.

La densité bactérienne adhérente sous l'influence des différentes valeurs de pH, révèle une adhésion proche pour des pH de 6,5, 7 et 8,5 tandis qu'à pH 5,5 la capacité d'adhésion est relativement moindre (figure 27).

Une adhérence stable de *P. gingivalis* aux cellules épithéliales gingivales humaines a été observée à des niveaux de pH compris entre 6,5 et 8,0, avec une adhérence maximale obtenue à pH 7,5. (Mori *et al.*, 1998). Hirose et collaborateurs, (1996) ont montré l'élévation de la capacité d'adhésion de *P. gingivalis* aux cellules gingivales humaines lors du passage d'un pH de 7 à 8.

De plus, l'expression des fimbriae de *P. gingivalis* peut être régulée par les conditions environnementales. Ces molécules sont impliquées dans l'adhésion aux composants revêtant la cavité buccale, telles que les cellules parodontales et par conséquent induisant la formation du biofilm au niveau de parodonte (Kato *et al.*, 2007). D'après Mori *et al.*, (1998) une synthèse protéique fimbriale élevée a été observée à pH 7,5. Ces résultats indiquent que le pH de l'environnement régule la croissance, l'adhésion de *P. gingivalis* et l'expression des fimbriae. Ils suggèrent également que le pH de la poche parodontale augmente pendant la réponse inflammatoire de l'hôte et que la synthèse des fimbriae augmente nettement.

En outre, les travaux de (Kontani *et al.*, 1996) ont révélé une augmentation significative de l'attachement des fimbriae de *P. gingivalis* aux monocouches fibroblastiques traitées avec les gingipaines. Ces derniers participent au démasquage des récepteurs au niveau des sites sous-gingivaux. Selon les essais de Tenorio *et al.*, (2011), une diminution de l'activité des gingipaines a été notée sous l'effet des acides organiques.

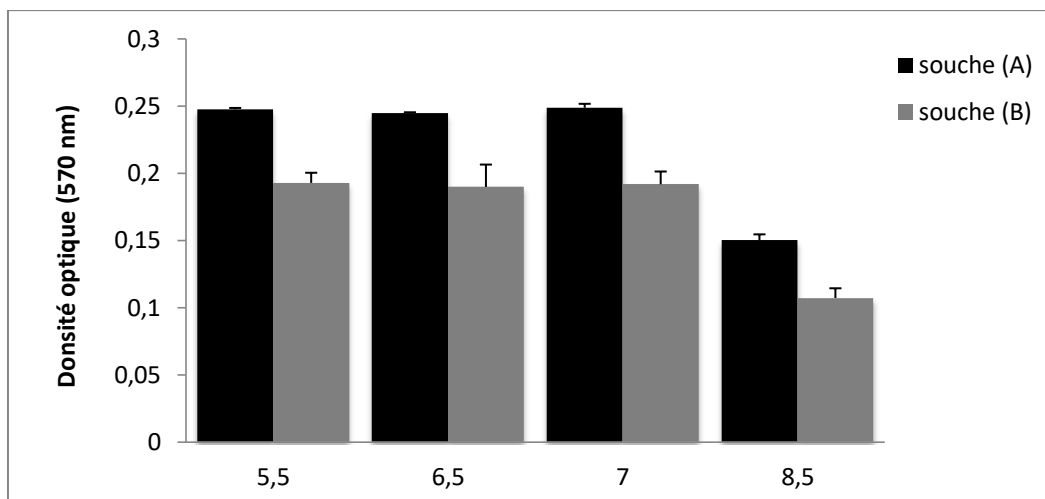


Figure 28. Détermination de l'effet du pH sur la formation du biofilm de *P. gingivalis*.

Les interactions métaboliques peuvent modifier le microenvironnement local (Takahashi, 2003). Certains travaux ont démontré l'effet du pH sur les biofilms de la plaque dentaire et ceux des voies urinaires (Jones *et al.*, 2014). L'effet du pH sur la formation du biofilm par *P. gingivalis* a été évalué dans le milieu BHI-HK.

Les résultats illustrés par la figure 28 montrent que les milieux de culture dont les pH variant de 5,5 à 7, n'influencent aucunement la formation du biofilm de *P. gingivalis*. Ce constat est révélé par des taux d'adhérence approximativement similaires.

A un pH de 8, il est possible d'observer une réduction très significative du pouvoir de formation du biofilm chez les deux souches. Elles présentaient une capacité de plus de 50% moindre. D'après l'étude de Zmantar *et al.*, (2010) la production de biofilm dépend de la valeur du pH du milieu. A des niveaux très acides (pH 3) et alcalins (pH 12), la formation du biofilm était faible tandis qu'à pH 7, elle s'est révélée modérée.

Par contre, l'étude de Hostackà *et al.*, (2010) menée sur l'estimation de la production quantitative du biofilms par *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Vibrio cholerae* sous l'effet du pH, montre que l'élévation du pH est associée à une augmentation de la production du biofilm par tous les microorganismes étudiés. Une production du biofilm significativement plus élevée a été observée à pH 7.5 et 8.5 par rapport au pH 5,5.

3.4.2. Effet de la ménadione sur la capacité d'adhésion et la formation du biofilm de *P. gingivalis*

Les figures 29 et 30 illustrent respectivement l'évolution de la capacité d'adhésion et du pouvoir de formation du biofilm de *P. gingivalis* cultivé en condition limitante en ménadione ou en présence de cette molécule (0,5 µg/ml et 1 µg/ml). D'après ces résultats, il est possible d'observer qu'il n'existe pratiquement pas de différences significatives. Les taux d'absorbance demeurent approximativement inchangés, indiquant ainsi que la vitamine K n'exerce pas un effet marquant sur les isolats.

Toutefois, nous observons qu'une des souches est plus adhérente et plus formatrice de biofilm tout en notant que l'évolution de l'adhésion est semblable pour les deux souches isolées.

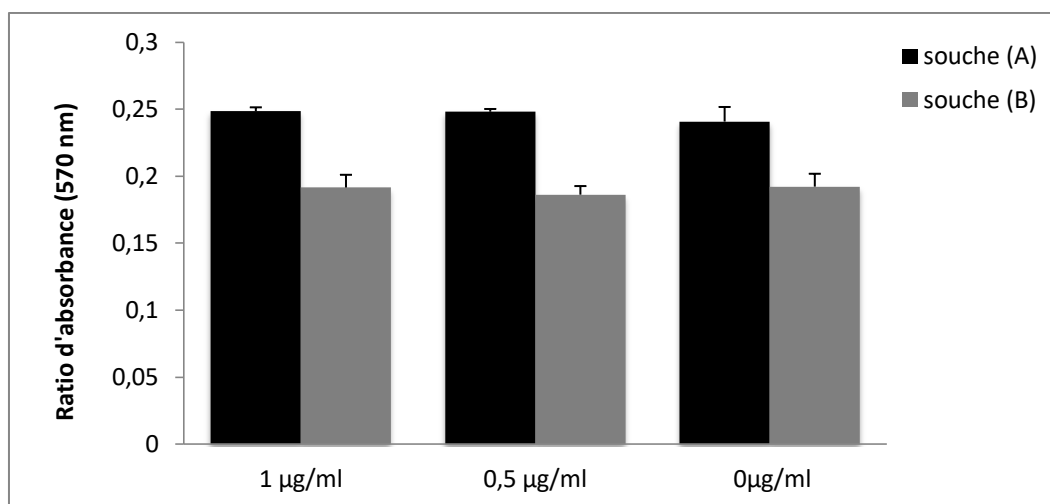


Figure 29. Détermination de l'effet de la ménadione sur la capacité d'adhésion de *P. gingivalis*.

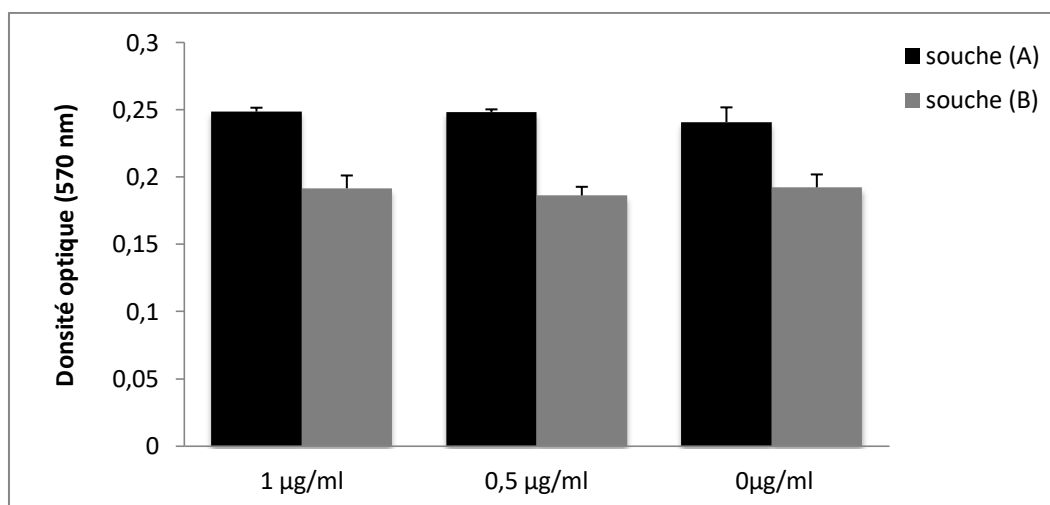


Figure 30. Détermination de l'effet de la ménadione sur la formation du biofilm de *P. gingivalis*.

A notre connaissance, aucune étude n'a été menée sur l'évaluation de la l'adhésion et la formation du biofilm par *P. gingivalis* en limitation de ménadione. Tandis que le rôle de cette vitamine en tant que facteur de croissance fourni par les bactéries résidentes du biofilm dentaire notamment *Veillonella sp* a été démontré (Simon *et al.*, 2012; Izumi *et al.*, 2015).

3.5. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur les fibroblastes gingivaux stimulés avec le lipopolysaccharide de *P. gingivalis*

3.5.1. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des cellules fibroblastiques stimulées ou non avec le LPS de *P. gingivalis*

Afin de déterminer l'effet de l'alpha-tocophérol sur l'attachement et la morphologie cellulaire, les fibroblastes gingivaux sont cultivés en présence de diverses concentrations (50, 100 et 200 μM) de la vitamine pendant 24 et 48 heures. Les résultats obtenus révèlent qu'aucun effet notable n'a été observé jusqu'à une concentration de 200 μM (figure 32). Les fibroblastes ont été allongés avec un noyau dense et une petite quantité de cytoplasme.

En présence de LPS de *P. gingivalis* (1 $\mu\text{g/ml}$), aucun effet inverse de l'alpha-tocophérol sur l'adhérence et la morphologie des fibroblastes n'a été observé (figure 33). A l'inverse, les cellules fibroblastiques normales de poumon présentait des changements morphologiques modérés telles que la formation de petites vésicules et des extensions cytoplasmiques suit au traitement avec l'alpha-, gamma- et delta-tocotriénol, des isoformes d'origine naturelle de la vitamine E (Lim *et al.*, 2014).

En outre, la vitamine E est connue pour son rôle protecteur de la membrane cellulaire, qui à son tour, assure la stabilité de la cellule (Rizvi *et al.*, 2014). Des essais *in vitro* réalisés sur culture cellulaire, ont montré des changements morphologiques uniformes dans les cellules tumorales après leur contact avec la vitamine E (Schwartz et Shklar, 1992).

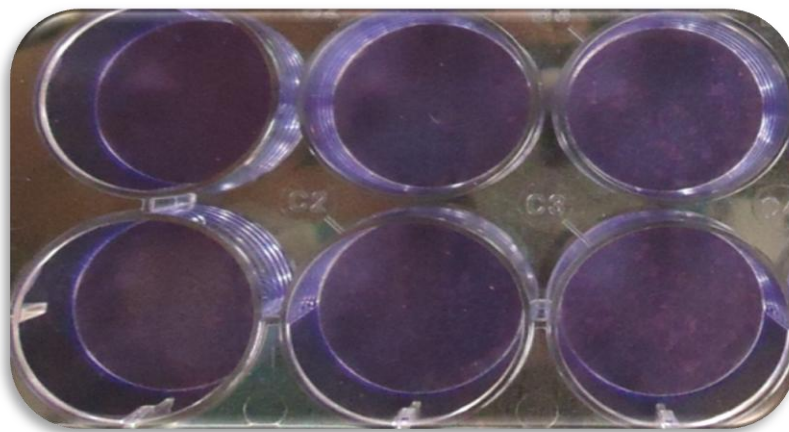


Figure 31. Observation macroscopique des tapis cellulaires des fibroblastes gingivaux colorés au cristal violet.

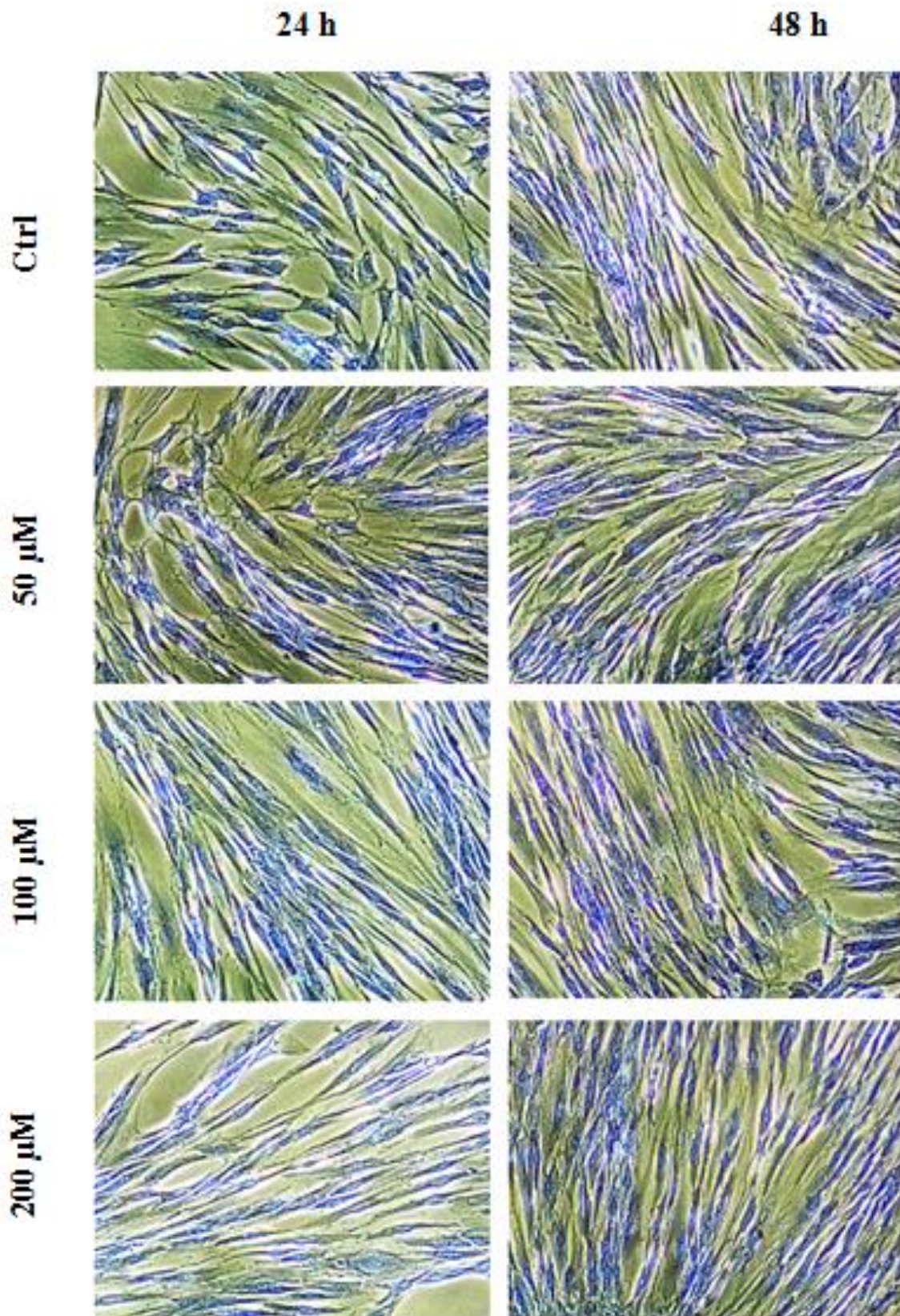


Figure 32. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé. Les barres d'échelle, 50 μm .

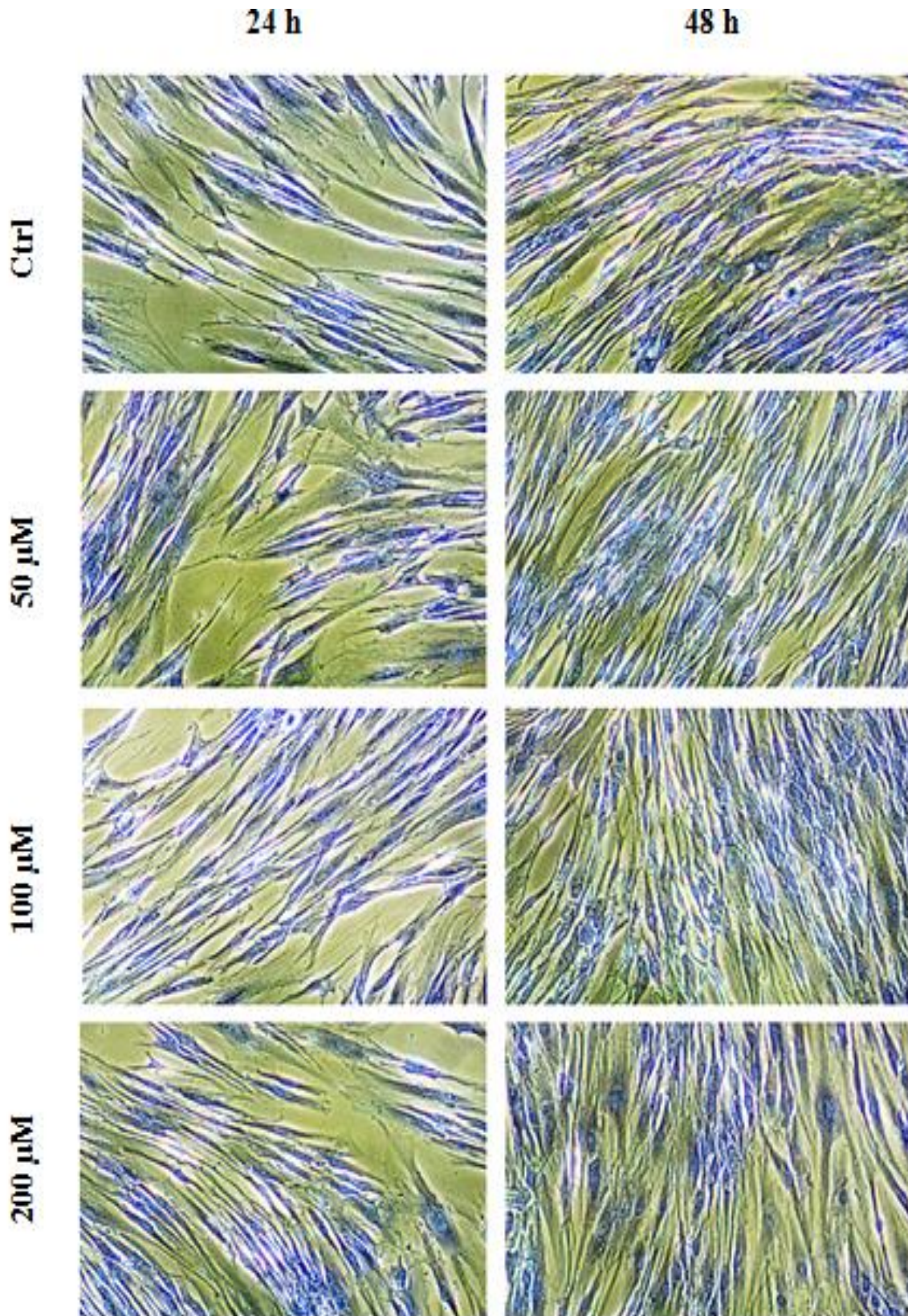


Figure 33. Effet de l'alpha-tocophérol sur la morphologie des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS. Photos des cellules colorées avec le cristal violet sous microscope inversé. Les barres d'échelle, 50 μ m.

3.5.2. Etude de l'effet de l'alpha-tocophérol sur la croissance des fibroblastes stimulés ou non avec le LPS de *P. gingivalis* (mesure de l'activité mitochondriale des cellules vivantes)

Après une période d'incubation de 24 heures, les analyses quantitatives suite à l'utilisation du test MTT indiquent qu'aucun effet significatif de l'alpha-tocophérol sur la croissance des cellules fibroblastique n'a été remarqué (Figure 34), par contre, pour une période de culture plus longue (48 heures), la croissance cellulaire est significativement ($P < 0,01$) favorisée par l'alpha-tocophérol (Figure. 34). Plus la concentration en alpha-tocophérol est élevée plus la croissance cellulaire est importante.

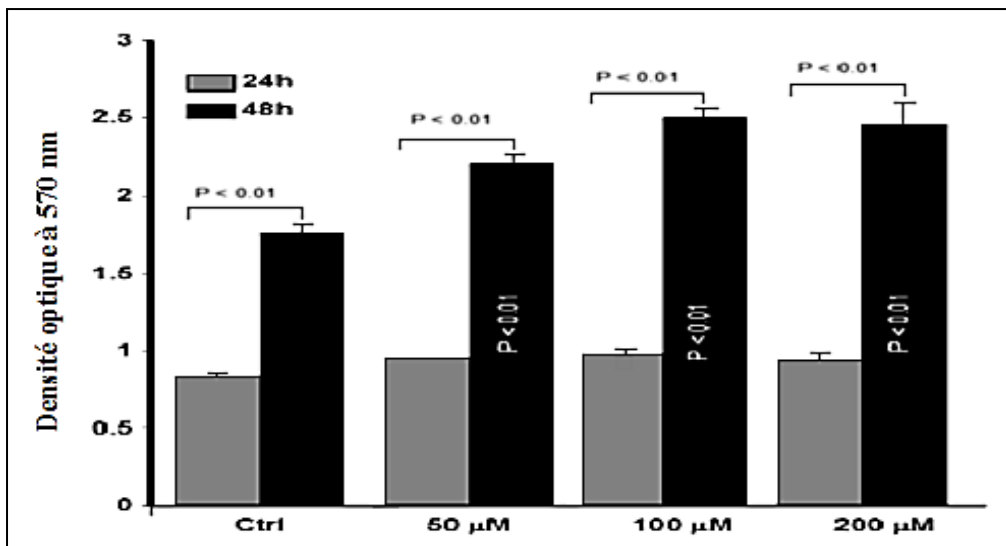


Figure 34. Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux non stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 µM de l'alpha-tocophérol).

Ces résultats semblent être en accord avec les travaux antérieurs, indiquant que l'alpha-tocophérol améliore la prolifération des cellules endothéliales mises en culture (Kuzuya *et al.*, 1991). Cependant, avec d'autres types cellulaires tels que l'aorte de muscle lisse humain, les fibroblastes de souris et les cellules cancéreuses, l'alpha-tocophérol a induit une inhibition de la croissance (Boscoboinik *et al.*, 1991; Ozer *et al.*, 1993).

Les différents effets de l'alpha-tocophérol sur la prolifération cellulaire peuvent éventuellement être dûs au type de cellule. Des études standardisées sur différents types de cellules seront nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

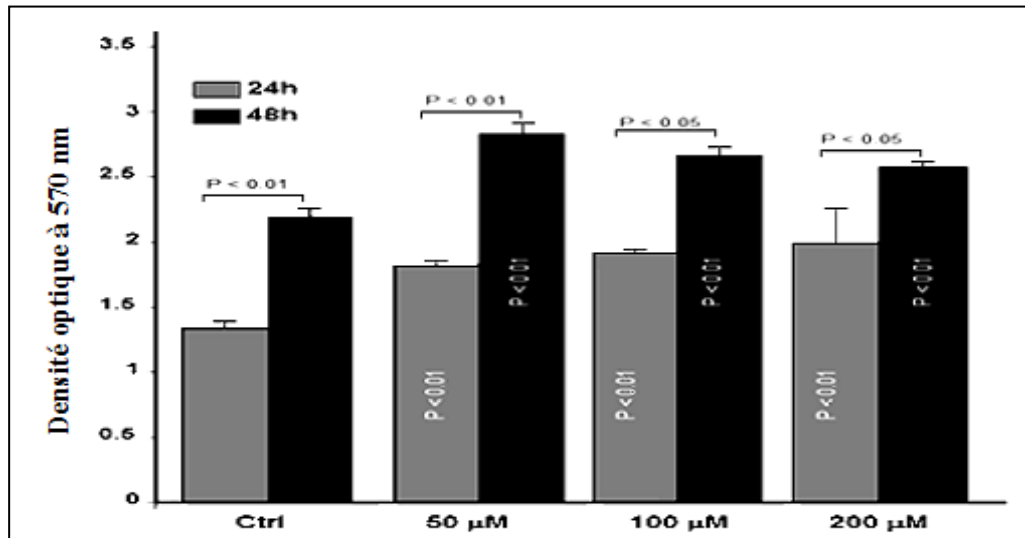


Figure 35. Effet de l'alpha-tocophérol sur la viabilité des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 µM de l'alpha-tocophérol).

Au bout de 24 heures d'incubation, l'augmentation de la croissance des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis* et non traités avec l'alpha-tocophérol est observée. Pour une période d'incubation plus allongée (48 heures) la croissance est significativement plus élevée (figure 35).

En présence de l'alpha-tocophérol la croissance des fibroblastes gingivaux stimulés avec le LPS de *P. gingivalis* s'est avérée significativement supérieure ($P < 0,01$). Aucune différence n'a été observée avec des concentrations plus élevées d'alpha-tocophérol. La croissance cellulaire observée après 48 heures demeure plus importante que celle de 24 heures.

Les cellules orales sont exposées à de multiples bactéries ainsi qu'à leurs produits de virulence, tels que les LPS, qui conduisent à une altération des propriétés et des fonctions cellulaires. D'après Yamaji *et al.*, (1995), les LPS de *P. gingivalis* ont induit une augmentation de la croissance des cellules fibroblastiques du ligament parodontale humain (Yamaji *et al.*, 1995).

Cela semble conforter les résultats obtenus au cours de cette présente étude, qui montrent une augmentation de la croissance des fibroblastes gingivaux suite à une stimulation avec les LPS de *P. gingivalis*. Cette surcroissance peut s'expliquer par le comportement cellulaire en réponse à une stimulation avec des endotoxines (Hattar *et al.*, 2013) ou, éventuellement, un

comportement cellulaire spécifique contre les effets nocifs de *P. gingivalis* et ces facteurs de virulence, ainsi une prévention contre les maladies parodontales (Tang *et al.*, 2013).

Le fait que la croissance cellulaire semble être favorisée par l'alpha-tocophérol, ceci suggère un rôle préventif assuré par cette molécule contre la maladie parodontale.

3.5.3. Mesure des cytokines et des peptides antimicrobiens suivant le contact des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*.

3.5.3.1. Mesure des cytokines (Interleukine-1 β et -6)

Les infections sont des promoteurs de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires par les cellules infectées (Collins *et al.*, 2014).

Dans la cavité buccale, les fibroblastes gingivaux sont le constituant principal du parodonte et sont les acteurs clés contre l'infection en produisant divers cytokines pro-inflammatoires en réponse à un contact direct avec des bactéries parodontopathogènes ou leur facteurs de virulence, tels que les LPS (Andrukhov *et al.*, 2014). L'évolution de la sécrétion d'interleukine-1 β et -6 par les fibroblastes gingivaux en contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis* est illustrée par les figures 36 et 37.

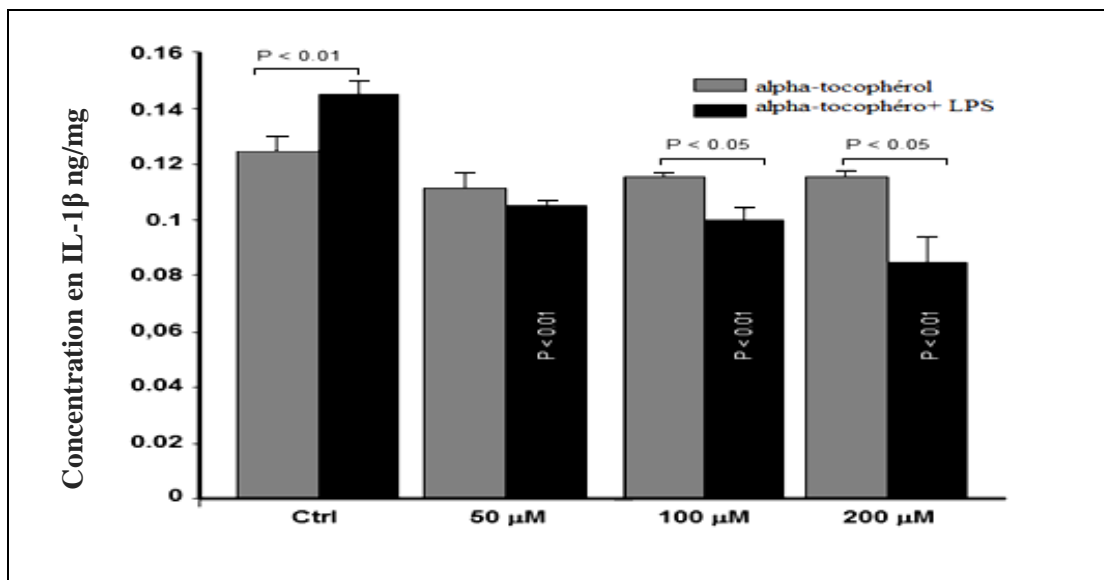


Figure 36. Sécrétion d'interleukine-1 β par les fibroblastes gingivaux après un contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

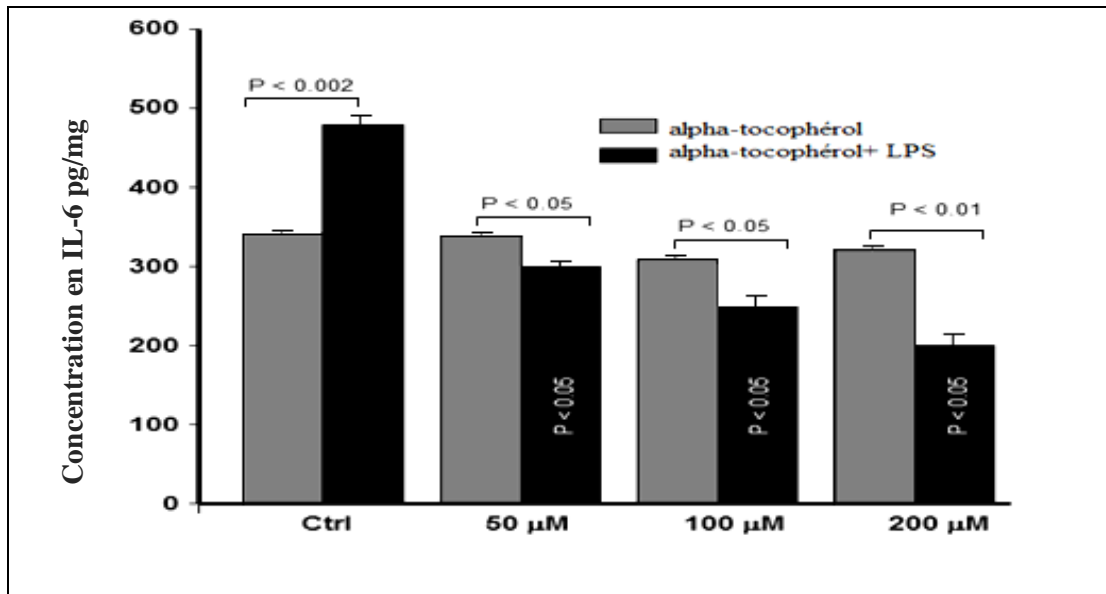


Figure 37. Sécrétion d'interleukine-6 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l'alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l'alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l'alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

Après une stimulation des fibroblastes gingivaux avec l'alpha-tocophérol pendant 48 h, la sécrétion d'IL-1β est restée inchangée par rapport à celle observée dans le témoin (figure 36). Cependant, l'addition de LPS de *P. gingivalis* à la culture a conduit à une augmentation significative ($p < 0,02$) de la sécrétion d'IL-1β.

L'alpha-tocophérol semble être capable de réguler négativement l'effet de LPS sur la sécrétion d'IL-1β. Ce résultat est révélé par les faibles niveaux d'IL-1β sécrétées par les cellules cultivées en présence de l'alpha-tocophérol et le LPS, par rapport à celles stimulées avec le LPS seul.

Quant à la sécrétion de l'IL-6, des observations similaires ont été notées. Aucun effet visible de l'alpha-tocophérol sur la sécrétion d'IL-6 par les fibroblastes gingivaux n'a été constaté. (figure 37). Cependant, les cellules stimulées avec le LPS ont montré une augmentation des niveaux de sécrétion d'IL-6. D'une manière significative ($P < 0,05$) cette sécrétion a été négativement régulée par l'alpha-tocophérol.

L'augmentation de la sécrétion des l'IL-1β et IL-6 par les fibroblastes gingivaux suite à leur stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* a ainsi été démontrée. Des résultats similaires ont été précédemment rapportés sur l'action des LPS d'*E. coli* et de *P. gingivalis* (Herath *et al.*, 2011; Andrukhov *et al.*, 2014).

La libération des cytokines pro-inflammatoire peut être considérée comme un processus de protection des fibroblastes gingivaux en réponse à l'infection (Bamias *et al.*, 2012). Cependant, de multiples études ont indiqué que l'augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires peut contribuer à la progression de la maladie parodontale (Reis *et al.*, 2014; Baek *et al.*, 2015.). La modulation négative de la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires peut ainsi être bénéfique pour la cellule hôte. Ce processus peut se produire avec la contribution de l'alpha-tocophérol. Ainsi il a été, clairement démontré que l'alpha-tocophérol diminue de manière significative la sécrétion de l'IL-1B et IL-6 par les fibroblastes gingivaux primaires stimulés avec le LPS de *P. gingivalis*.

Le rôle de l'alpha-tocophérol contre les effets délétères des LPS a été l'objet des études *in vitro* et *in vivo* montrant que cette vitamine supprime la réponse inflammatoire et les dommages oxydatifs induits par les LPS sur des systèmes de culture cellulaire ou sur des modèles animaux (Suntres et Shek, 1996; Qureshi *et al.*, 2010). Il a été également montré que l'alpha-tocophérol peut efficacement prévenir la dégénérescence des neurones dopaminergiques induite par l'interféron- γ en réponse aux LPS (Shibata *et al.*, 2006) et réguler négativement la sécrétion d'IL-6 et peroxydation lipidique dans les cellules microgliales murines induite par les LPS (Godbout *et al.*, 2004). En outre, l'alpha-tocophérol a permis de favoriser le rétablissement chez les souris âgées présentant des infections induites par le LPS (Berg *et al.*, 2005). Ces découvertes et nos résultats soulignent le potentiel d'alpha-tocophérol dans la prévention des infections microbiennes.

3.5.3.2. Mesure des peptides antimicrobiens (β -défensines humaines HBD-1 et HBD-2)

Prévenir ou guérir les infections microbiennes peut être atteint par l'utilisation des molécules chimiques antimicrobiennes, telles que des antibiotiques, mais aussi à travers la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules hôtes (Stempel *et al.*, 2014). La famille des peptides antimicrobiens comprend plusieurs molécules telles que les HBDs.

Au cours de cette étude nous avons recherché les profils de sécrétion de deux bêta-défensines induites lors de la culture des fibroblastes gingivaux en présence de l'alpha-tocophérol avec ou sans stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* (figures 38 et 39).

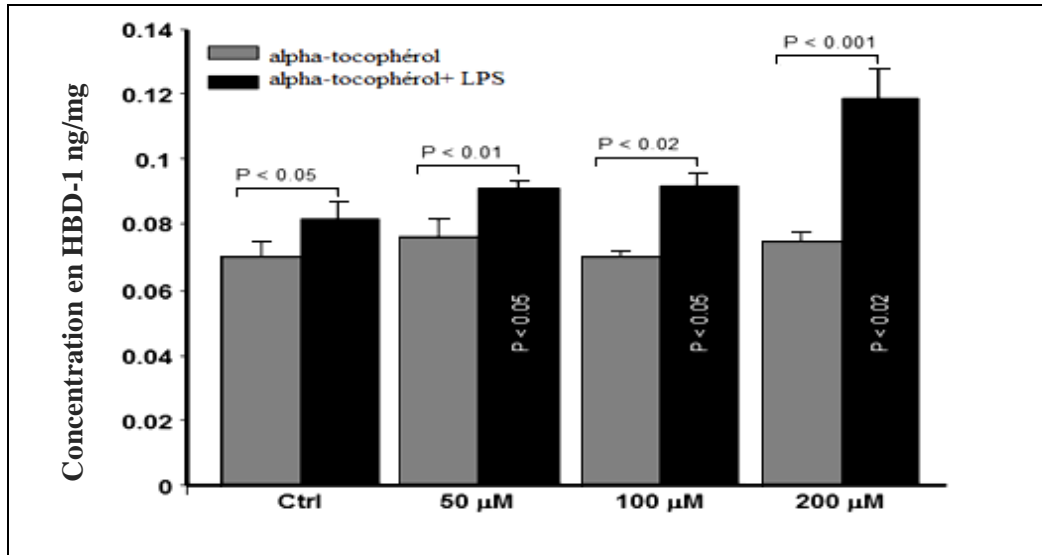


Figure 38. Sécrétion de HBD-1 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l’alpha-tocophérol et le LPS de *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l’alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l’alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

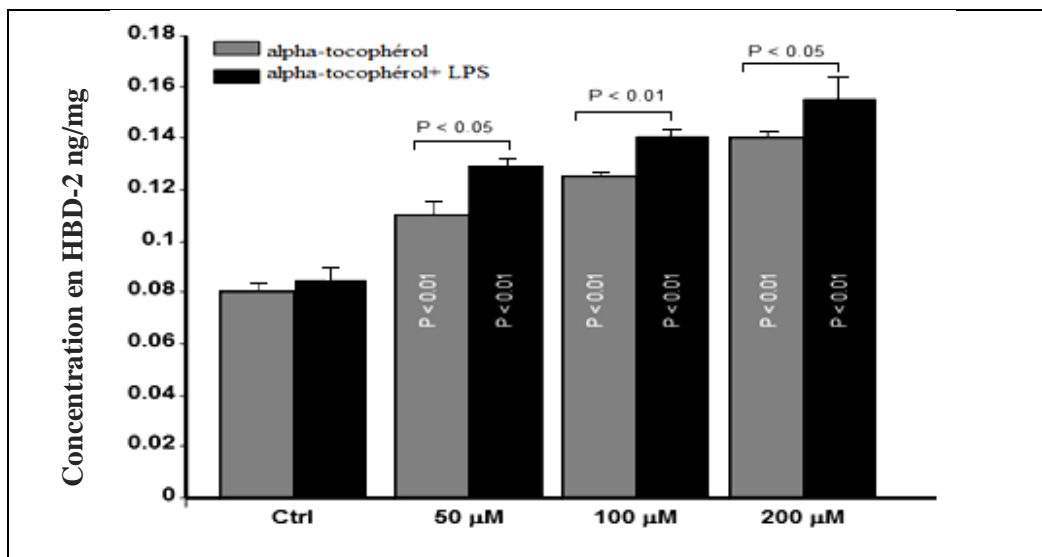


Figure 39. Sécrétion de HBD-2 par les fibroblastes gingivaux après contact avec l’alpha-tocophérol et le LPS du *P. gingivalis*. La signification statistique est obtenue en comparant les différentes concentrations de l’alpha-tocophérol avec le contrôle (0 μM de l’alpha-tocophérol) en présence ou en absence de LPS.

Les résultats illustrés par la figure 38, montrent que l’alpha-tocophérol n’influçait aucunement les taux de HBD-1 sécrétées par les fibroblastes gingivaux primaires. Les niveaux de sécrétion sont très similaires en présence des différentes concentrations de cette

molécule. En revanche, Les résultats des dosages révèlent une notable augmentation des taux de HBD-1 sécrétées après la stimulation des cellules fibroblastiques avec le LPS de *P. gingivalis*.

Des niveaux plus élevés de HBD-1 ont été observés lorsque les cellules ont été stimulées avec Le LPS en présence de l'alpha-tocophérol. Une augmentation significative ($p < 0,05$) de HBD-1 sécrétées a été constatée après une exposition des fibroblastes au LPS et l'alpha-tocophérol, comparativement à ceux cultivés qu'en présence du LPS.

Quant à la sécrétion de HBD-2 par les cultures fibroblastiques primaires, cette dernière est modulée par l'alpha-tocophérol (figure 39). Une augmentation importante ($P < 0,01$) de la sécrétion de HBD-2 est observée comparativement à celle mesurée dans les cultures non traitées par l'alpha-tocophérol. Les taux de sécrétion de HBD-2 augmentent de manière significative avec l'augmentation de la concentration en alpha-tocophérol utilisée.

La stimulation des fibroblastes avec le LPS seul a conduit à des niveaux de sécrétion de HBD-2 plus élevés, ces taux sont encore plus importants en présence de l'alpha-tocophérol. Les résultats de dosage montrent que l'effet de LPS sur la sécrétion des HBD-2 est positivement régulée par l'alpha-tocophérol.

Ainsi, il a été démontré pour la première fois, la sécrétion des HBD-1 et HBD-2 par les fibroblastes gingivaux primaires humains. En plus, la stimulation de ces derniers avec l'alpha-tocophérol n'induit pas l'augmentation de la sécrétion des peptides antimicrobiens.

Cependant, le LPS de *P. gingivalis* seul ou en combinaison avec l'alpha-tocophérol conduit à une augmentation des HBD-1 et HBD-2 sécrétées par ces fibroblastes. Il a été démontré que les HBD-1 ont comme cible une variété de bactéries, y compris *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* et *Fusobacterium nucleatum* (Gorr et Abdolhosseini, 2011), tandis que les HBD-2 sont actif contre les bactéries à Gram négatifs et *Candida albicans* mais avec une activité restreinte contre les bactéries à Gram positifs (Dale et Fredericks, 2005, Cáceres *et al.*, 2014). Cela peut expliquer les niveaux élevés des HBD-1 et HBD-2 sécrétées en réponse à la stimulation avec le LPS de *P. gingivalis* et leurs taux qui son positivement régulés suite à l'ajout d'alpha-tocophérol aux cultures des fibroblastes. Cette présente étude suggère que l'alpha-tocophérol induit l'activation des mécanismes de défense des cellules fibroblastiques contre le LPS en produisant HBD-1 et HBD-2. Les données globales, suggèrent ainsi que l'alpha-tocophérol peut moduler les réactions inflammatoires et la

destruction tissulaire en réduisant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et en augmentant les taux des peptides antimicrobiens HBD-1 et HBD-2. D'autres études seront nécessaires pour élucider les mécanismes de signalisation impliqués avec l'alpha-tocophérol. Une fois l'inflammation contrôlée, la guérison des blessures au niveau des tissus parodontaux peut être atteinte.

3.5.4. Cicatrisation des fibroblastes gingivaux primaires en contact avec le LPS de *P. gingivalis* sous l'effet de l'alpha-tocophérol

L'alpha-tocophérol a modulé la migration des cellules fibroblastiques (Figure 40 et 41). Ce constat est révélé par la réduction de la surface de la plaie au niveau des monocouches primaire traitées avec l'alpha-tocophérol en comparaison à celles non-traitées.

L'effet de l'alpha-tocophérol s'est avéré remarquable avec un début perceptible de la migration cellulaire après 12 heures de l'induction de la plaie (Figure 40). L'effet était significatif à des concentrations de 100 et 200 μM d'alpha-tocophérol (Figure 41a).

Aucune inhibition ou excitation de la migration cellulaire n'a été observé lors de la stimulation des cultures avec le LPS seul. Cependant, des taux de migration cellulaire et de cicatrisation supérieure ont été remarqués au niveau des cultures stimulées avec le LPS et traitées avec l'alpha-tocophérol. (Figure 41a).

Des résultats comparables ont été obtenus après 24 h de l'induction de la plaie. A partir d'une concentration de 50 μM d'alpha-tocophérol la migration des cellules et la réparation de la plaie est significativement favorisée (Figure 41b).

Une migration plus importante a été notée lors de la stimulation des cellules avec le LPS seul par rapport à ce qui a été observé en absence de LPS. Cette augmentation est positivement régulée par l'alpha-tocophérol. Ainsi, plus la concentration en alpha-tocophérol est élevée, plus la réparation de la plaie est importante (Figure 41b).

Après 48 heures, la migration cellulaire est positivement modulée à partir de 50 μM d'alpha-tocophérol. Les taux de cicatrisation sont plus marqués et la quasi-totalité de la zone de la plaie est réparée (Figure 41c).

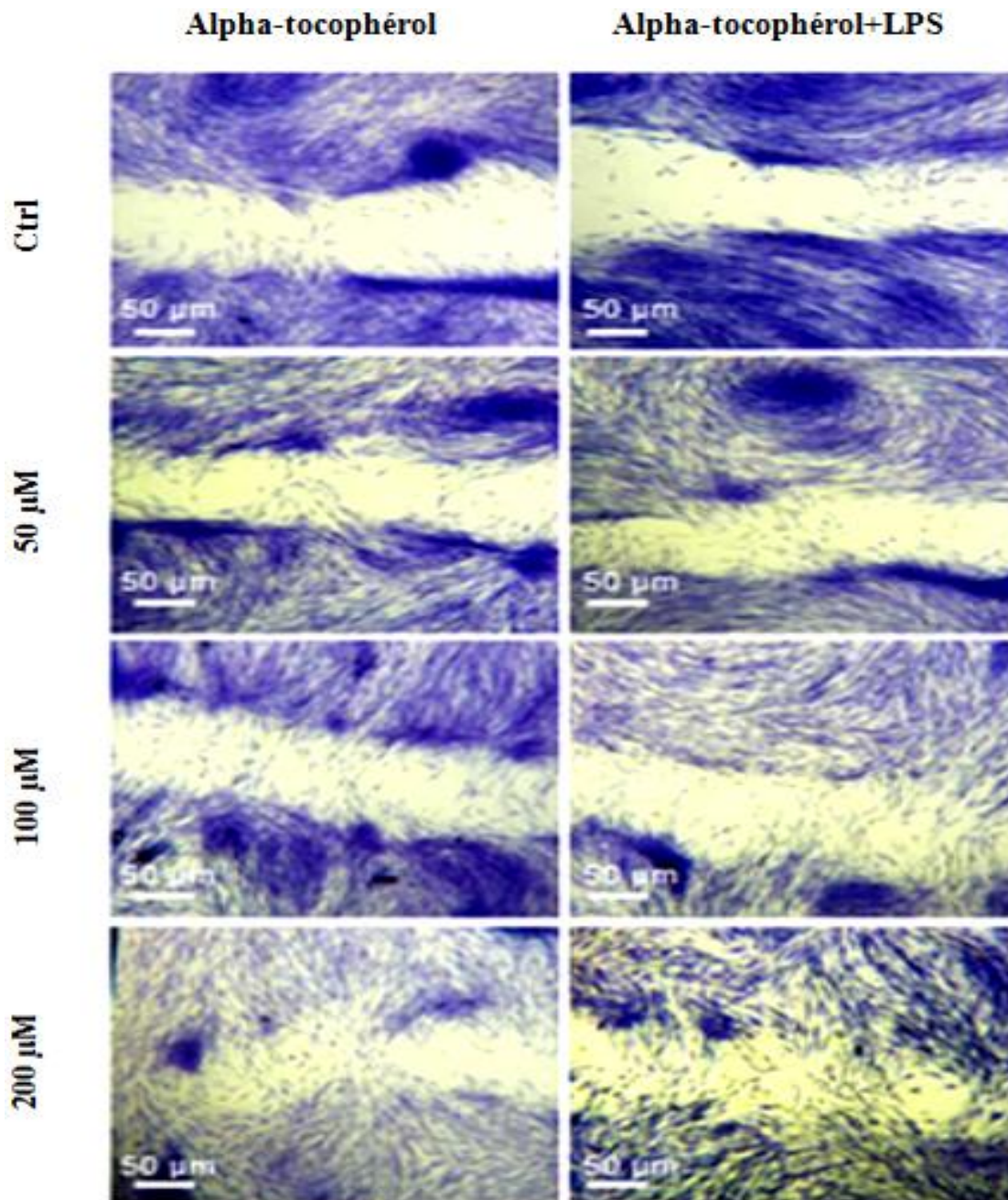


Figure 40. Cicatrisation des fibroblastes sous l'effet de l'alpha-tocophérol après 12 heures de l'induction de la plaie. Les barres d'échelle, 50 μm.

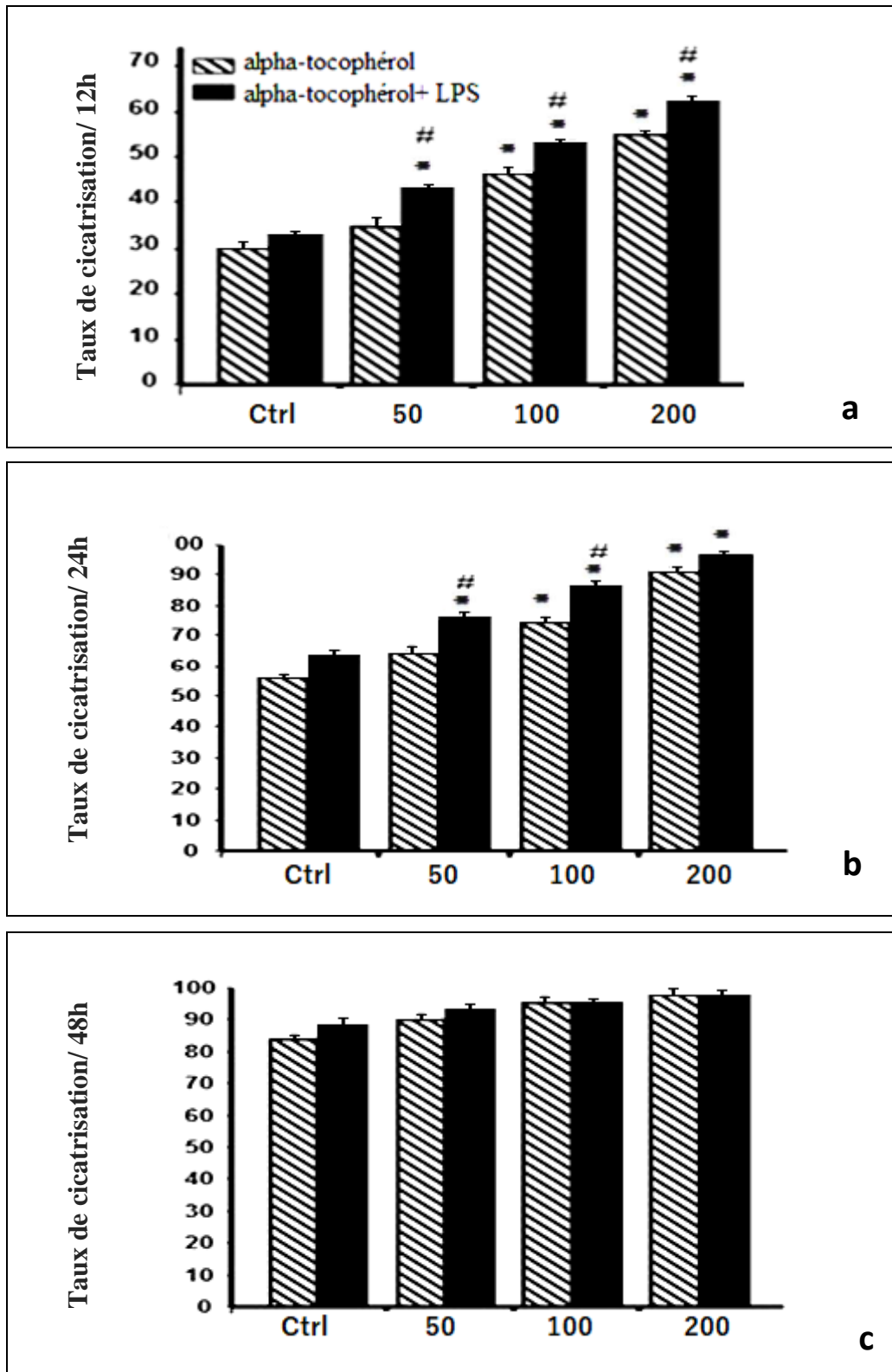


Figure 41. Taux de la cicatrisation des fibroblastes sous l'effet d'alpha-tocophérol.
 *: $p < 0,05$ versus contrôle (0 μ M de l'alpha-tocophérol). #: $p < 0,05$ versus sans LPS.

L'une des principales cellules impliquées dans la guérison de la plaie parodontale est le fibroblaste gingival (Bainbridge, 2013; Cáceres *et al.*, 2014). Les fibroblastes ont un phénotype prolifératif et une grande capacité de synthétiser et déposer les composants de la matrice extracellulaire nécessaires à la guérison adéquate de la plaie (Bainbridge, 2013; Cáceres *et al.*, 2014). Des modèles de cicatrisation des plaies sont souvent utilisés *in vitro* afin d'évaluer l'effet de divers agents sur les cellules cibles (Semlali *et al.*, 2011). Ces modèles consistent en des rayures réalisées sur des monocouches de cellules afin de créer une zone de cellules libres, permettant ainsi, de comprendre la façon avec laquelle les cellules migrent et couvrent cette zone. Le scratch test effectué sur une monocouche cellulaire a été utilisé dans cette étude pour évaluer la capacité de l'alpha-tocophérol à favoriser la migration cellulaire et par conséquent, la cicatrisation des plaies. Les cellules traitées avec l'alpha-tocophérol ont occupé d'une manière significative la plus grande partie de la zone de la plaie, à partir de 12 h jusqu'à 48 h, avec ou sans LPS. Les résultats indiquent que la vitamine a pu favoriser la guérison de la parodontite à un stade précoce en stimulant à la fois la croissance des fibroblastes gingivaux et leur migration, avec un effet marqué lorsque l'alpha-tocophérol est combinée avec le LPS. Ce qui permet de surmonter l'impact négatif du LPS de *P. gingivalis*, qui non seulement favorise l'inflammation mais aussi l'apparition de la maladie parodontale. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes indiquant l'amélioration de la cicatrisation des plaies gingivales suite à l'utilisation *in vitro* (Nizam *et al.*, 2014) et *in vivo* de la vitamine E (Kim et Shklar, 1983). Laheij *et al.*, (2013) ont récemment montré que le contact direct avec *P. gingivalis* ou son surnageant brut de culture inhibe la migration des cellules épithéliales. Il est à noter que lors du contact direct avec la cellule hôte, différents facteurs de virulence peuvent être sécrétés. Cependant dans cette étude, nous n'avons ciblé que le LPS de *P. gingivalis*. De ce fait la détermination de l'effet de *P. gingivalis* et ces facteurs des virulences combinés à la cicatrisation des blessures gingivales doit faire l'objet de travaux supplémentaires.

Conclusion

Conclusion

Cette présente étude a été réalisée sur des souches, exclusivement cliniques, de *P. gingivalis* préalablement isolées et identifiées. Le choix du support bactérien retenu, peut être justifié par le fait que cette espèce bactérienne se trouve être l'agent étiologique majeur des pathologies parodontales, impliquant plusieurs facteurs de virulence qui lui permettent de survivre et d'exercer ainsi son pouvoir pathogène.

En vue de la compréhension du comportement des souches isolées, une étude de la croissance bactérienne a été réalisée, dans un premier temps, sous l'influence de divers paramètres physico-chimiques et nutritionnels. Les résultats obtenus, ont révélé que la variation du pH influence nettement le développement de *P. gingivalis* où la croissance a atteint son maximum à des pH alcalins, contrairement à la menadione, dont l'effet sur la croissance de la bactérie, semble être négligeable.

L'influence de l'alpha-tocophérol sur la croissance de *P. gingivalis* a également été étudiée. Les résultats obtenus, montrent que la vitamine peut être dotée de propriétés antibactériennes compte tenu de son aptitude à réduire significativement la croissance des souches bactériennes.

Par ailleurs et compte tenu des interactions physico-chimiques régissant l'adhésion des microorganismes aux surfaces, il a été, donc, intéressant d'identifier les paramètres susceptibles d'influencer les propriétés physico-chimiques de la surface de *P. gingivalis*. L'évolution de l'hydrophobicité ainsi que le caractère acide-base de Lewis sous l'influence de certains facteurs a été estimée. Les résultats obtenus ont révélé une nette influence des paramètres testés (pH et menadione). L'utilisation de la technique MATS a permis de déterminer l'évolution du caractère hydrophobe de la paroi bactérienne, dont le maximum a été atteint à des pH alcalins et en présence de 1 µg/ml de menadione. Quant au caractère acide-base de Lewis, des variations importantes ont, également, été observées avec une prédominance du caractère donneur d'électrons à des pH alcalins et en présence de menadione.

Cependant, en présence de l'alpha-tocophérol, une nette diminution du caractère hydrophobe de la paroi bactérienne a été constatée provoquant ainsi une atténuation de l'adhésion cellulaire. Une analyse par la spectroscopie infrarouge serait donc intéressante afin de pouvoir

révéler une quelconque modification survenue chez un ou des constituants membranaires directement impliqué dans l'attachement cellulaire.

En outre, les résultats obtenus sur la formation du biofilm bactérien sur supports inertes laissent apparaître un fort pouvoir d'adhésion survenu à de pH avoisinant la neutralité (pH 6.5 à pH 8.5). Ce phénomène semble être inquiétant étant donné que le pH, propre à la poche parodontale, se trouve être lui même alcalin suite aux mesures réalisées *in vivo*. Paradoxalement, la quantité de biomasse fixée (biofilm), estimée à pH 8, ne semble pas refléter l'ampleur de l'adhésion préalablement enregistrée. Ce phénomène, laisse penser probablement à un décrochage d'une partie de la masse cellulaire se retrouvant ainsi larguée dans le milieu de culture et ne pouvant, par conséquent, pas être quantifiée par la technique de coloration au CV.

Enfin, une stimulation des cultures de fibroblastes gingivaux, des acteurs clé de la réponse de l'hôte, avec l'endotoxine de *P. gingivalis* a été effectuée. Le traitement de ces cultures avec l'alpha-tocopherol démontre que cette vitamine est capable de moduler la réponse inflammatoire en diminuant la sécrétion d'IL-1B et d'IL-6 et de promouvoir la défense innée en augmentant la production des peptides antibactériens HBD-1 et -2. En outre la vitamine est capable d'accélérer *in vitro* la cicatrisation de la plaie au niveau des monocouches des fibroblastes gingivaux.

Ces résultats obtenus, suite à cette étude, révèlent les modes d'action possible de l'alpha-tocophérol ; une alternative intéressante aux médicaments classiques par le fait qu'elle puisse agir d'une part sur la bactérie et la réponse immuno-inflammatoire de l'hôte et d'autre part, elle peut être considérée comme une sérieuse alternative à l'utilisation accrue et anarchique d'antibiotiques souvent responsables du phénomène d'antibio-résistance. Une application de cette vitamine à des fins thérapeutiques dans le cadre de la santé parodontale peut s'avérer donc utile voir nécessaire dans certains cas.

Résumés

Résumé

Au cours de cette présente recherche, l'étude des propriétés physico-chimiques de la surface de *P. gingivalis* impliqué dans le phénomène d'adhésion a été réalisée sous l'influence de différents paramètres. En outre, l'étude du comportement des cultures de fibroblastes gingivaux a été réalisée en réponse à la stimulation par le LPS de *P. gingivalis*. Enfin, la recherche d'un éventuel effet de l'alpha-tocophérol sur l'adhésion ainsi que sur le pouvoir pathogène de *P. gingivalis* a également été abordée.

Les résultats obtenus révèlent, d'une part, une nette influence du pH ainsi que de la menadione sur le caractère hydrophobe de la bactérie. En effet, le maximum d'affinité aux solvants apolaires a été atteint à des pH alcalins et en présence de 1 µg/ml de menadione. D'autre part, une prédominance du caractère donneur d'électrons a été révélée sous les mêmes conditions de culture (pH alcalin et présence de menadione).

Par ailleurs, en présence de l'alpha tocophérol, le caractère hydrophobe de la bactérie, révélé à l'aide de la technique MATS, semble avoir été atténué, laissant supposer que la paroi bactérienne a tendance à devenir sensiblement hydrophile. Ce phénomène peut engendrer ainsi une diminution de l'adhésion de *P. gingivalis*.

Les résultats relatifs à la formation du biofilm par *P. gingivalis*, en absence cette fois-ci de l'alpha tocophérol, ont révélé un fort pouvoir d'adhésion survenu à des pH avoisinant la neutralité (6.5 à 8.5). Cependant, la formation de la masse adhérente semble avoir été atténuée, paradoxalement, à des pH sensiblement alcalins (au voisinage de pH 8), ce qui, laisse supposer qu'un éventuel décrochage cellulaire, est survenu dans le milieu de culture.

Enfin, la présence de l'alpha tocophérol au cours de la stimulation des cultures de fibroblastes gingivaux à l'aide de l'endotoxine de *P. gingivalis* a révélé l'aptitude de cette vitamine à moduler la réponse inflammatoire en diminuant la sécrétion d'IL-1B et d'IL-6 tout en augmentant la production des peptides antibactériens HBD-1 et -2.

Au vu des résultats obtenus en présence de l'alpha tocophérol, celle-ci semble être une alternative intéressante voir indispensable, dans certains cas, à l'utilisation accrues d'antibactériens synthétiques souvent à l'origine de l'apparition et de l'aggravation du phénomène de résistance bactérienne rencontré principalement dans le domaine médical.

Mots-clés : *Porphyromonas gingivalis*, propriétés physico-chimiques, alpha-tocophérol, biofilms, adhésion, fibroblastes, LPS.

Abstract

In this research, the study of the physico-chemical properties of the surface of *P. gingivalis* involved in the adhesion phenomenon was carried out under the influence of different parameters. In addition, the study of the behavior of gingival fibroblast cultures was performed in response to LPS stimulation of *P. gingivalis*. Finally, the search for a possible effect of alpha-tocopherol on the adhesion as well as on the pathogenicity of *P. gingivalis* was also examined.

The results obtained show, on the one hand, a clear influence of the pH and menadione on the hydrophobicity of the bacterium. Indeed, the maximum affinity to the apolar solvents was reached at alkaline pH and in the presence of 1 µg/ml of menadione. On the other hand, a predominance of the electron donor character was revealed under the same culture conditions (alkaline pH and presence of menadione).

Furthermore, in the presence of alpha tocopherol, the hydrophobicity of the bacterium, revealed by the MATS technique, seems to be attenuated, which may indicate that the bacterial wall tends to become substantially hydrophilic. This phenomenon may cause a decrease in the adhesion of *P. gingivalis*.

The results relating to the formation of the biofilm by *P. gingivalis*, this time in the absence of alpha tocopherol, revealed a high adhesion power at pH close to neutrality (6.5 to 8.5). However, the formation of the adherent mass seems to be attenuated, paradoxically, at substantially alkaline pH (pH 8), which suggests that a possible cell stall has occurred in the culture medium.

Finally, the presence of alpha tocopherol during stimulation of gingival fibroblast cultures using the endotoxin of *P. gingivalis* revealed the ability of this vitamin to modulate the inflammatory response by decreasing the secretion of IL-1B and IL-6 and increasing the production of antibacterial peptides HBD-1 and -2.

Results obtained in the presence of alpha tocopherol suggest that this vitamin seems to be an interesting alternative, in some cases, to the increased use of synthetic antibacterials often at the origin of the appearance and worsening of the phenomenon of bacterial resistance faced mainly in the medical field.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, physicochemical properties, alpha-tocopherol, biofilms, adhesion, Fibroblasts, LPS.

ملخص

خلال هذا البحث تم التطرق إلى دراسة الخصائص الفيزيائية و الكيميائية لجدار البكتيريا *P. gingivalis* المساهمة في ظاهرة الالتصاق تحت تأثير عوامل مختلفة. بالإضافة إلى ذلك, تم اجراء دراسة سلوك الخلايا الليفية اللثوية استجابة للتحفيز عن طريق الليبيد متعدد السكريد للبكتيريا *P. gingivalis*. و اخيرا تم التطرق إلى البحث عن التأثيرات المحتملة للفيتامين ه على ظاهرة الالتصاق و القدرة الإراضية للبكتيريا *P. gingivalis*.

النتائج المتحصل عليها قد اظهرت من جهة, التأثير الواضح لدرجة الحموضة و الفيتامين ك على السلوك الكاره للماء للبكتيريا *P. gingivalis*, حيث أن الانجذاب إلى المذيب غير القطبي بلغ حده الأقصى في حدود الوسط القاعدي و في وجود الفيتامين ك بتركيز 1 ميكروغرام/مليلتر ومن جهة اخرى وفي نفس ظروف الزرع (وسط قاعدي فيتامين ك بتركيز 1 ميكروغرام/مليلتر) لوحظ غلبة السلوك المانح للإلكترونات لجدار البكتيريا.

في وجود الفيتامين ه لوحظ تراجع طبيعة الجدار البكتيري الكارهة للماء مما يشير إلى أن جدار الخلية البكتيرية يميل إلى أن يكون ذو طبيعة محبة الى الماء. مما يمكن أن يؤدي إلى الحد من قدرة الالتصاق عند البكتيريا.

فيما يخص النتائج المتعلقة بتكوين الشريط البيولوجي للبكتيريا *P. gingivalis* في غياب الفيتامين ه لوحظ ان البكتيريا تملك قدرة التصاق كبيرة في وسط ذو حموضة معتدلة و بصفة غير منتظرة سجل تناقص الكتلة الخلوية الملتصقة في الوسط القاعدي مما يوحي إلى احتمال حدوث انفصال جزء من الخلايا البكتيرية من الشريط البيولوجي و تواجدها في الوسط الغذائي.

واخيرا فإن وجود الفيتامين ه خلال عملية تحفيز الخلايا الليفية اللثوية بواسطة الليبيد متعدد السكريد للبكتيريا *P. gingivalis* تبين أن الفيتامين تملك القدرة على تعديل الاستجابة المناعية عن طريق خفض افراز الانتركولين-1 بيتا و الانتركولين-2 و زيادة انتاج البيبتيدات المضادة للبكتيريا.

و بالنظر إلى النتائج المتحصل عليها في وجود الفيتامين ه, فإن هذه الاخيرة تبدو كبديل ملفت للاهتمام للاستعمال المفرط للمضادات الحيوية الاصطناعية التي تتسبب غالبا في تفاقم ظاهرة مقاومة الجراثيم المواجهة خاصة في الميدان الطبي.

الكلمات المفتاحية : *Porphyromonas gingivalis*, الخصائص الفيزيائية و الكيميائية, فيتامين ه , الشريط البيولوجي, الالتصاق, الخلايا الليفية, الليبيد متعدد السكريد.



Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aas JA., Paster BL., Stokes LN., Olsen L. et Dewhirst FE. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*. **43**:5721-5732.
- Abd Al Kader Al-Salih D., Aziz FM., Abdul Razzaq Mshimesh et B., Jihad MT. (2013). Antibacterial Effects of Vitamin E: in Vitro Study. *Journal of Biotechnology Research Center*. **7**:17-23.
- Absolom DR. (1988). The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian Journal of Microbiology*. **34**:287-98.
- Abusleme L., Dupuy AK., Dutzan N., Silva N., Burleson JA., Strausbaugh LD., Gamonal J. et Diaz PI. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME Journal*. **7**:1016-1025.
- Aframian DJ., Davidowitz T. et Benoliel R. (2006). The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Disease*. **12**:420-423.
- Amano A. (2010) Host-parasite interactions in periodontitis: microbial pathogenicity and innate immunity. *Periodontology 2000*. **54**: 9-14.
- An YH. et Friedman RJ. (1998). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research (Applied Biomaterials)*. **43**:338-348.
- Andrian E., Grenier D. et Rouabhia M. (2006) *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *Journal of dental research*. **85**:392-403.
- Andrukhov O., Ertlschweiger S., Moritz A., Bantleon HP. et Rausch-Fan X. (2014). Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin- 6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontologica Scandinavica*. **72**:337-345.
- Arab H., Maroofian A., Golestani S., Shafae H., Sohrabi K. et Forouzanfar A. (2011). Review of the therapeutic effects of *Camellia sinensis* (green tea) on oral and periodontal health, *Journal of medicinal plants research*. **5**:5465-5469.
- Arampatzi SI., Giannoglou G. et Diza E. (2011). Biofilm formation: A complicated microbiological process. *Aristotle University Medical Journal*. **38**:21-29.
- Ardila CM., Olarte-Sossa M. et Ariza-Garcés AA. (2015). Association between the presence of *Treponema denticola* and reduced levels of antiatherogenic high density lipoprotein in periodontitis. *Quintessence International*. **46**:207-215.

- Armitage GC. (1999). Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*. **4**:1-6.
- Armitage GC. (2004). Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology 2000*. **34**: 9-21.
- Aubrey S. et Gopalakrishnan SN. (2002). Periodontal diagnoses and classification of periodontal disease. *Periodontology 2000*. **29**: 104-121.

B

- Baek KJ., Ji S., Kim YC. et Choi Y. (2015). Association of the invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. *Virulence*. **6**:274-281.
- Baillif S., Hartmann D., Freney J. et Kodjikian L. (2010). Implant intraoculaire et adhésion bactérienne : influence des conditions environnementales, des propriétés bactériennes et des caractéristiques du biomatériau. *Journal Français d'Ophtalmologie*. **33**:210-221.
- Bainbridge P. (2013). Wound healing and the role of fibroblasts. *Journal of Wound Care*. **22**:407-408, 410-412.
- Bamias G., Corridoni D., Pizarro TT. et Cominelli F. (2012). New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine*. **59**:451-459.
- Barksby HE., Lea SR., Preshaw PM. Et Taylor JJ. (2007). The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clinical and Experimental Immunology*. **149**:217-225.
- Bellon-Fontaine MN., Rault J. et van Oss CJ. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. **7**:47-53.
- Bendinger B., Rijnaarts HHM., Altendorf K. et Zehnder AJB. (1993). Physicochemical Cell Surface and Adhesive Properties of Coryneform Bacteria Related to the Presence and Chain Length of Mycolic Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**: 3973-3977.
- Bercy P. et Tenenbaum H. (1996). Parodontologie du diagnostic à la pratique. De Boeck Paris. 16p.
- Bereksi N., Gavini F., BeÂneÂzech T. et Faille C. (2002). Growth, morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environments. *Journal of Applied Microbiology*. **92**:556-565

- Berg BM., Godbout JP., Chen J., Kelley KW. et Johnson RW. (2005). alpha-Tocopherol and selenium facilitate recovery from lipopolysaccharide-induced sickness in aged mice. *Journal of Nutrition*. **135**:1157-1163.
- Bergeron N., Corriveau J., Letellier A., Daigle F., Lessard L. et Quessy S. (2009). Interaction between Host Cells and Septicemic *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**:3413-3419.
- Bibette M. (2013). Etude de la flore parodontopathogène chez des personnes obèses ayant ou non subi une chirurgie bariatrique. Thèse de doctorat. Université Victor Segalen Bordeaux 2-France. 20p.
- Bodet C., Chandad F. et Grenier D. (2006). Inflammatory responses of a macrophage/epithelial cell co-culture model to mono and mixed infections with *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*. *Microbes and Infection*. **8**:27-35.
- Bodet C., Chandad F. et Grenier D. (2007). Pathogenic potential of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*, the red bacterial complex associated with periodontitis. *Pathologie Biologie*. **55**:154-162.
- Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D'orio V., Vergara A., Conter M. et Lanieri A. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*. **104**:1552-1561.
- Bonnaure-Mallet M., Chardin H. et Barsotti O. (2006). Microbiologie en odontostomatologie. Maloine .Paris.
- Boschini F., Boutigny H. et Delcourt-Debruyne E. (2004). Maladies gingivales induites par la plaque. Encyclopédie médico-chirurgicale.Odontologie. Elsevier SAS. [23-440-A-10].
- Boscoboinik D., Szewczyk A., Hensey C. et Azzi A. (1991). Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*. **266**:6188-6194.
- Bostanci N. et Belibasakis G. (2012). *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *FEMS Microbiology Letters*. **333**:1-9.
- Bouchard P. (2015). Parodontologie & dentisterie implantaire. Volume 1. médecine parodontale. Lavoisier Paris. 80p.
- Boutaleb N. (2007). Etude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de doctorat. Université de Bretagne-Sud. France. 14;16;147p.

- Boutaleb N., Latrache H. et Sire O. (2008). Interactions bactéries-matériaux dans les canalisations d'eau potable. Rôle des propriétés physico-chimique de surface sur le pouvoir d'adhésion. *Techniques - Sciences – Methodes*. DOI: 10.1051/tsm/200811073.
- Bowen WH. et Koo H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research*. **45**:69-86.
- Boyanova L., Setchanova L., Gergova G., Kostyanev T., Yordanov D., Popova Chr., Kotsilkov K. et Mitov I. (2009). Microbiological Diagnosis Of The Severe Chronic Periodontitis. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)*. 89-94p.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**:248-254.
- Branger A., Richer MM. et Roustel S. (2012). Microbiochimie et alimentation. Edition Éducagri. 136-137p.
- Briandet R., Meylheuc T., Catherine Maher C. et Bellon-Fontaine MN. (1999). *Listeria monocytogenes* Scott A: Cell Surface Charge, Hydrophobicity, and Electron Donor and Acceptor Characteristics under Different Environmental Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**: 5328–5333.
- Brochu V., Grenier D., Nakayama K. et Mayrand D. (2001). Acquisition of iron from human transferrin by *Porphyromonas gingivalis*: a role for Arg- and Lys-gingipain activities. *Oral microbiology and immunology*. **16**:79-87.
- Busscher HJ., Bos R. et Van der Mei HC. (1995). Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters*. **128**:229-234.

C

- Cáceres M., Oyarzun A. et Smith PC. (2014). Defective wound-healing in aging gingival tissue. *Journal of Dental Research*. **93**:691–697.
- Charon J. et Mouton C. (2003). Parodontic médicale. Edition CdP. 41p.
- Chen H., Xu Z., Peng L., Fang X., Yin X., Xu N., et al. (2006). Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides*. **27**:931-940.
- Clutterbuck AL., Woods EJ., Knottenbelt DC., Clegg PD., Cochrane CA. et Percival SL. (2007). Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. **121**:1-17.

- Collins JW., Keeney KM., Crepin VF., Rathinam VAK., Fitzgerald KA., Brett Finlay B. et Frankel G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. **12**:612-623.
- Cowan MM., Van Der Mei HC., Rouxhet PG. et Busscher HJ. (1992). Physicochemical and Structural Investigation of the Surfaces of Some Anaerobic Subgingival Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **58**:1326-1334.
- Cugini C., Klepac-Ceraj V., Rackaityte E., Riggs JE. et Davey ME. (2013). *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *Journal of Oral Microbiology*. **5**:19804.
- Curtis MA., Aduse-Opoku J. et Rangarajan M. (2001). Cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **12**:192-216.

D

- Dague E. (2006). Physico - chimie des interfaces bactérie - solution aqueuse. Thèse de doctorat. Université Henri Poincaré- Nancy 1-France. 13p.
- Dale BA., Kimball JR., Krisanaprakornkit S., Roberts F., Robinovitch M., O'Neal R., Valore EV., Ganz T., Anderson GM. et Weinberg A. (2001). Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *Journal of Periodontal Research*. **36**: 285-294.
- Dale BA. et Fredericks LP. (2005) Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Current Issues in Molecular Biology*. **7**:119-133.
- Darveau RP. et Hancock RE. (1983). Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *Journal of Bacteriology*. **155**:831-838.
- Darveau RP. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nature Reviews Microbiology*. **8**:481-490.
- Dashper SG., Ang CS., Veith PD., Mitchell HL., Lo AWH., Seers CA., Walsh KA., Slakeski N., Chen D., Lissel JP., Butler CA., O'Brien-Simpson NM., Barr IG. et Reynolds EC. (2009). Response of *Porphyromonas gingivalis* to Heme Limitation in Continuous Culture. *Journal of Bacteriology*. **191**:1044-1055.
- Davey ME. et Ducan MJ. (2006). Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of bacteriology*. **188**:5510-5523.
- Delost MD. (2014). Introduction to Diagnostic Microbiology for the Laboratory Sciences. Jones & Bartlett learning. 308p.

- Devaraj S., Li D. et Jialal I. (1996). The Effects of Alpha Tocopherol Supplementation on Monocyte Function Decreased Lipid Oxidation, Interleukin 1 β Secretion, and Monocyte Adhesion to Endothelium. *Journal of Clinical Investigation*. **98**:756-763.
- Djeribi R., Boucherit Z., Bouchloukh W., Zouaoui W., Latrache H., Hamadi F. et Mena B. (2013). A study of pH effects on the bacterial surface physicochemical properties of *Acinetobacter baumannii*. *Colloids and Surfaces B: Biointerface*. **102**:540-545.
- Donlan RM. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**:881-890.
- Donlan RM. et Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**:167-193.
- Doucet P. et Lowenstein M. (2006). Osteoclasts activation by bacterial endotoxins during periodontal diseases. *Medecine Sciences*. **22**:614-620.
- Du L., Pellen-Mussi P., Chandad F., Mouton C. et Bonnaure-Mallet M. (1997). Fimbriae and the hemagglutinating adhesin HA-Ag2 mediate adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial cells. *Infection and immunity*. **65**:3875-3881.
- Duarte S., Gregoire S., Singh AP., Vorsa N., Schaich K., Bowen WH. et Koo H. (2006). Inhibitory effects of cranberry polyphenols on formation and acidogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*. **257**:50-56.
- Duffau F. (2014). Stratégies bactériennes au niveau du sillon gingivo-dentaire. *Journal de Parodontologie et d'Implantologie Orale*. **34**:7-2
- Duyninh T., Jarne O., Bousquet P., Gibert P. et Orti V. (2005). Classification des maladies parodontales. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Odontologie*. Elsevier SAS. [23-441-A-10].

E

- Ekstrand-Hammarström B., Österlund C., Lilliehöök B. et Bucht A. (2006). Vitamin E down-modulates mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kB and inflammatory responses in lung epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology*. **147**:359-369
- El Ghmari A., Latrache H., Hamadi F., El Louali M., El Bouadili A., Hakkou A. et Bourlioux. P. (2002). Influence of surface cell structures on physicochemical properties of *Escherichia coli*. *New Microbiologica*. **25**:173-178.
- Ema M., Hayakawa M. et Abiko Y. (2003). Characterization of the gene encoding 200-kDa *Porphyromonas gingivalis* protein that reacts to sera from periodontitis patients. *Journal of Oral Science*. **45**:145-152.

- Enersen M., Nakano K. et Amano A. (2013). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *Journal of oral microbiology*. **5**:20265.
- Ezzo PL. et Cutler CW. (2003). Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontology 2000*. **32**:24-35.

F

- Flemming HC. et Wingender J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*. **8**:623-633.
- Fregaed F. (1991). *Rôle des interactions hydrophobes et électrostatiques dans l'adhésion de bactéries méthanogènes aux matériaux de faible énergie de surface*. Thèse de doctorat. Université des sciences et de techniques Lille I-France. 26-29p.

G

- Gibbons S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*. **21**:263-77.
- Gibson FC. et Genco CA. (2006) The Genus *Porphyromonas*. *The Prokaryotes*. Volume 7. Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. Springer-Verlag New York. 431p.
- Godbout JP., Berg BM., Kelley KW. et Johnson RW. (2004). alpha-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *Journal of Neuroimmunology*. **149**:101-109.
- Goldberg M. et Ardouin JL. (1999). *Maladies parodontales thérapeutiques et préventions*. INSERM. Paris. 297p.
- Gomez RS., Dutra WO. et Moreira PR. (2009). Epigenetics and periodontal disease: future perspectives. *Inflammation research*. **58**:625-629.
- González-Navajas JM., Corr MP. et Raz E. (2014). The immediate protective response to microbial challenge. *European Journal of Immunology*. **44**:2536-2549.
- Gorr SU. et Abdolhosseini M. (2011). Antimicrobial peptides and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*. **38**:126-141.
- Gouet JS. (2011). Bacterial biofilms and implications in endodontics. *Revue d'Odonto-Stomatologie*. **40**:18-31.
- Graves D. (2008). Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *Journal of Periodontology*. **79**:1585-1591.

- Greenwood D., Slack RCB., Barer MR. et Irving WL. (2012). *Medical Microbiology: A Guide to Microbial Infections: Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control*. Churchill Livingstone Elsevier. 362p.
- Grilo EC., Costa PN., Gurgel CS., Beserra AF., Almeida FN., Dimenstein R. (2014). Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology*. **34**:379-385.

H

- Haïkel Y. (2001). Thérapeutique étiopathogénique de la carie dentaire. *Encyclopédie médico-chirurgicale. Odontologie*. Elsevier SAS. [23-010-F-10].
- Hajishengallis G., Wang M., Harokopakis E., Triantafilou M. et Triantafilou K. (2006). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae proactively modulate beta2 integrin adhesive activity and promote binding to and internalization by macrophages. *Infection and immunity*. **74**:5658-66.
- Hall–Stoodley L., Costerton JW. et Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. **2**:95-108.
- Hamada N., Watanabe K., Sasakawa C., Yoshikawa M., Yoshimura F. et Umemoto T. (1994). Construction and Characterization of a fimA Mutant of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*. **62**:1696-1704.
- Hamadi F., Latrache H., El ghmari A., El louali M., Mabrouki M. et Kouider N. (2004). Effect of pH and ionic strength on hydrophobicity and electron donor and acceptor characteristics of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Annals of Microbiology*. **54**:213-225.
- Hamadi F., Latrache H., Elghmari A., Zahir H., Mabrouki M. et El Bouadili A. (2005). Determination of *Escherichia coli* negative charge concentration and its variation with pH. *Journal of Surface. Analysis*. **12**:293-302.
- Hamadi F., Latrache H., Zahir H., Elghmari A., Timinouni M. et Ellouali M. (2008). The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology*. **39**:10-15.
- Hamadi F., Latrache H., Mliji E., Mallouki B., Mabrouki M., Ellouali M. (2009). Adhésion de *staphylococcus aureus* au verre et au téflon. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.* **3**:1-16.
- Hannig M. et Joiner A. (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monographs in oral science*. **19**:29-64.

- Hassell TM. (1993). Tissues and cells of the periodontium. *Periodontology 2000*. **3**:9-38.
- Hattar K., Savai R., Subtil FS., Wilhelm J., Schmall A., Lang DS., Goldmann T., Eul B., Dahlem G., Fink L., Schermuly RT., Banat GA., Sibelius U., Grimminger F., Vollmer E., Seeger W. et Grandel U. (2013). Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **62**:309-320.
- Herath TD., Wang Y., Seneviratne CJ., Lu Q., Darveau RP., Wang CY. et Jin L. (2011). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *Journal of Clinical Periodontology*. **38**:694-701.
- Hirose K., Isogai E., Mizugai H. et Ueda I. (1996). Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. *Oral Microbiology and Immunology*. **11**:402-406.
- Hirschfeld M., Weis JJ., Toshchakov V., Salkowski CA., Cody MJ., Ward DC., Qureshi N., Michalek SM. et Vogel SN. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infection and immunity*. **69**:1477-1482.
- Ho MH., Chen CH., Goodwin JS., Wang BY. et Xie H. (2015). Functional Advantages of *Porphyromonas gingivalis* Vesicles. *PLoS ONE* **10**:e0123448.
- Hojo K., Nagaoka S., Murata S., Taketomo N., Ohshima T. et Maeda N. (2007). Reduction of vitamin K concentration by salivary Bifidobacterium strains and their possible nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Applied Microbiology*. **103**:1969-1974.
- Holt SC. et Bramanti TE. (1991). Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **2**:177-281.
- Holt SC., Kesavalu L., Walker S. et Genco CA. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*. **20**:168-238.
- Holt SC. et Ebersole JL. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontology 2000*. **38**:72-122.
- Hostackà A., Ciznàr I. et Stefkovicová M. (2010). Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol.* **55**:75-78.

- Houle MA. et Grenier D. (2003). Maladies parodontales : connaissances actuelles, *Médecine et maladies infectieuses*. **33**:331-340.
- How KY., Song KP. et Chan KG. (2016). *Porphyromonas gingivalis*: an overview of periodontopathic pathogen below the gum line. *Frontiers in Microbiology*. **7**:53.
- Huang GT., Kim D., Lee JK., Kuramitsu HK. et Haake SK. (2001). Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infection and Immunity*. **69**:1364-1372.

I

- Izumi M., Mari F., Yuko N., Takashi K., Yasushi F., Sulistyani H. et Futoshi N. (2015). The Distribution and Frequency of Oral *Veillonella spp.* Associated with Chronic Periodontitis *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. **4**:150-160.

J

- Jacobs A. (2007). Transport bactérien en milieux poreux: Expérimentations et Modélisation. Migration de bactéries issues de boues de STEP. Thèse de doctorat. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse-France. 41p.
- Jakubovics NS., Kerrigan SW., Nobbs AH., Strömberg N., van Dolleweerd CJ., Cox DM., Kelly CG. et Jenkinson HF. (2005). Functions of cell surface-anchored antigen I/II family and Hsa polypeptides in interactions of *Streptococcus gordonii* with host receptors. *Infection and Immunity*. **73**:6629-6638.
- Janeway CA., Travers P., Walport MM. et Shlomchik MJ. (2003). Immunobiologie: Le système immunitaire fondamental et pathologique. De Boeck Bruxelles. 782p.
- Jenkinson HF. et Lamont RJ. (1997). Streptococcal adhesion and colonization. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **8**:175-200.
- Joachim F. et Charon D. (2011). Quelle est la place de la microbiologie en parodontie clinique ?. *Le fil dentaire*. **58**:16-21.
- Jonard LA., Banh L., Pressac M., Just J., Bahuau M. (2006). Defensins in human health and disease. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. **21**:342-347.
- Jones EM., Cochrane CA. et Percival SL. (2014). The Effect of pH on the Extracellular Matrix and Biofilms. *Advances in Wound Care*. **4**:431-439.
- Jotwani R. et Cutler CW. (2004). Fimbriated *Porphyromonas gingivalis* is more efficient than fimbria-deficient *P. gingivalis* in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response. *Infection and immunity*. **72**:1725-1732.

K

- Kadowaki T., Nakayama K., Okamoto K., Abe N., Baba A., Shi Y., Ratnayake DB. et Yamamoto K. (2000). *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence determinants in progression of periodontal diseases. *Journal of biochemistry*. **128**:153-159.
- Kamaguchi A., Ohyama T., Sakai E., Nakamura R., Watanabe T., Baba H. et Nakayama K. (2003). Adhesions encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. *Microbiology*. **149**:1257-1264.
- Kamma JJ., Nakou M., Gmur R. et Baehni PC. (2004). Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiology and Immunology*. **19**:314-321.
- Kaplan JB. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*. **89**:205-218.
- Kato T., Tsuda T., Omori H., Kato T., Yoshimori T. et Amano A. (2007). Maturation of fimbria precursor protein by exogenous gingipains in *Porphyromonas gingivalis* gingipain-null mutant. *FEMS Microbiology Letters*. **273**:96-102.
- Katsikogianni M. et Missirlis YF. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-materials interactions. *European Cells and Materials*. **8**:37-57.
- Kim JE. et Shklar G. (1983). The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. *Journal of Periodontology*. **54**:305-330.
- Kim KJ., Kim EC., Kim KG., Lee HO., Jang SI. et Chung CP. (1997). Virulence of Cultured Supernatant in *Porphyromonas gingivalis* W50 under Hemin- and Menadione-Limited Culture Condition. *Journal of Korean Academy of Periodontology*. **27**:515-524.
- Kinane DF. (2000). Regulators of tissue destruction and homeostasis as diagnostic aids in periodontology. *Periodontology 2000*. **24**:215-225.
- Kinane DF. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*. **25**:8-20.
- Kolenbrander PE., Andersen RN., Blehert DS., Eglund PG., Foster JS. et Palmer RJ Jr. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **66**:486-505.
- Kolenbrander PE., Palmer RJ Jr., Rickard AH., Jakubovics NS., Chalmers NI. et Diaz PI. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*. **42**:47-79.

- Kolenbrander PE. (2011.) Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. *International Journal of Oral Science*. **3**:49-54.
- Konermann A., Stabenow D., Knolle PA., Held SA., Deschner J. et Jager A. (2012). Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immunity*. **18**:745-752.
- Kontani M., Ono H., Shibata H., Okamura Y., Tanaka T., Fujiwara T., Kimura S. et Hamada S. (1996). Cysteine protease of *Porphyromonas gingivalis* 381 enhances binding of fimbriae to cultured human fibroblasts and matrix proteins. *Infection and Immunity*. **64**:756-762.
- Koo H., Duarte S., Murata RM., Scott-Anne K., Gregoire S., Watson GE., Singh AP. et Vorsa N. (2010). Influence of Cranberry Proanthocyanidins on Formation of Biofilms by *Streptococcus mutans* on Saliva-Coated Apatitic Surface and on Dental Caries Development in vivo. *Caries Research*. **44**:116-126.
- Kornman KS., Page RC. et Tonetti MS. (1997). The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*. **14**:33-53.
- Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J. et Matošić S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. **94**:981-987.
- Kozarov E., Miyashita N., Burks J., Cervený K., Brown TA., McArthur WP. et Progulské-Fox A. (2000). Expression and Immunogenicity of Hemagglutinin A from *Porphyromonas gingivalis* in an Avirulent *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* Vaccine Strain. *Infection and Immunity*. **68**:732-739.
- Kristoffersen AK., Solli SJ., Nguyen TD. et Enersen M. (2015). Association of the rgpB gingipain genotype to the major fimbriae (fimA) genotype in clinical isolates of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Oral Microbiology*. **7**:29124.
- Krzyściak W., Jurczak A., Kościelniak D., Bystrowska B. et Skalniak A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. **33**:499-515.
- Kurtiş B., Tüter G., Serdar M., Akdemir P., Uygur C., Firatlı E. et Bal B. (2005). Gingival crevicular fluid levels of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor-alpha in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Journal of Periodontology*. **76**:1849-1855.
- Kuzuya M., Naito M., Funaki C., Hayashi T., Yamada K., Asai K. et Kuzuya F. (1991). Antioxidants stimulate endothelial cell proliferation in culture. *Artery Research*. **18**:115-124.

L

- Labrecque J., Bodet C., Chandad F. et Grenier D. (2006). Effects of a high-molecular-weight cranberry fraction on growth, biofilm formation and adherence of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **58**:439-443.
- Laheij AM., De Soet JJ., Veerman EC., Bolscher JG. et Van Loveren C. (2013). The influence of oral bacteria on epithelial cell migration in vitro. *Mediators of Inflammation*. **2013**:154532.
- Lamont RJ. et Jenkinson HF. (1998). Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology and molecular biology reviews*. **62**:1244-1263.
- Latrache H., Bourlioux P., Karroua M., Zahir H. et Hakkou A. (2000). Effects of subinhibitory concentrations of nitroxoline on the surface properties of *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*. **45**:485-490.
- Lee KK. et Yii KC. (1996). A comparison of three methods for assaying hydrophobicity of pathogenic vibrios. *Letters in Applied Microbiology*. **23**:343-346.
- Leger CL. (2000). Vitamin E: current state of knowledge, role in the prevention of cardiovascular disease, bioavailability. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. **7**:258-265.
- Lépine G. et Progulske-Fox A. (1996). Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*. **11**:65-78.
- Li L., Michel R., Cohen J., DeCarlo A. et Kozarov E. (2008). Intracellular survival and vascular cell-to-cell transmission of *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiology*. **8**:26.
- Lim SW., Loh HS., Ting KN., Bradshaw TD. et Zeenathul NA. (2014). Cytotoxicity and apoptotic activities of alpha-, gamma- and delta-tocotrienol isomers on human cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **14**:469.
- Lin X., Wu J. et Xie H. (2006). *Porphyromonas gingivalis* Minor Fimbriae Are Required for Cell-Cell Interactions. *Infection and Immunity*. **74**:6011-6015.
- Listgarten MA. (1986). Pathogenesis of periodontitis. *Clinical Periodontology*. **13**:418-430.
- Lo A., Seers C., Dashper S., Butler C., Walker G., Walsh K., Catmull D., Hoffmann B., Cleal S., Lissel P., Boyce J. et Reynolds E. (2010). FimR and FimS: Biofilm Formation and Gene Expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*. **192**:1332-1343.
- Loesche WJ. (1999). The antimicrobial treatment of periodontal disease: change the treatment paradigm. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **10**:245-275.

- Ludwig W., Euzeby J. et Whitmanet W. (2011). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Springer New York. Dordrecht Heidelberg London. 63-64p.
- Lý MH., Cavin JF., Cachon R., Lê TM., Belin JM., Waché Y. (2007). Relationship between the presence of the citrate permease plasmid and high electron-donor surface properties of *Lactococcus lactis* ssp.lactis biovar. Diacetylactis. *FEMS Microbiology Letters*. **268**:166-170.
- Lynch DJ., Michalek SM., Zhu M., Drake D., Qian F. et Banas JA. (2013). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein deletion mutants. *Oral Health and Dental Management*. **12**:191-199.

M

- Mahtout H. (2012). *Interactions des bactéries parodontopathogènes avec les protéines régulatrices du complément*. Thèse de doctorat. Université Laval, Québec-Canada. 12p.
- Malek R., Fisher JG., Caleca A., Stinson M., Van Oss CJ., Lee JY., Cho MI., Genco RJ., Evans RT. et Dyeri DW. (1994). Inactivation of the *Porphyromonas gingivalis* fimA Gene Blocks Periodontal Damage in Gnotobiotic Rats. *Journal of Bacteriology*. **176**:1052-1059.
- Mamo W. (1989). Physical and biochemical surface properties of Gram-positive bacteria in relation to adhesion to bovine mammary cells and tissues. *A review of the littérature. Revue scientifique et technique de l'OIE*. **8**:163-176.
- Mantri CK., Chen CH., Dong X., Goodwin JS., Pratap S., Paromov V. et Xie H. (2015). Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology Open*. **4**:53-65.
- Marcotte H. et Lavoie MC. (1998). Oral Microbial Ecology and the Role of Salivary Immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology*. **62**:71-109.
- Marsh PD. et Martin MV. (2009). *Oral microbiology*. 5th edition. Churchill Livingstone, Edinburgh (UK). 78-84p.
- Masadeh MM., Mhaidat NM., Alzoubi KH., Al-Azzam SI. et Shaweesh AI. (2012). Ciprofloxacin-Induced Antibacterial Activity is Reversed by Vitamin E and Vitamin C. *Current Microbiology*. **64**:457-462.
- Massif L. et Frappier L. (2007). *Orthodontie et parodontie*. Odontologie/Orthopédie dentofaciale. Elsevier Masson SAS. [23-490-A-07]

- Mayrand D. et Holt SC. (1988). Biology of Asaccharolytic Black-Pigmented Bacteroides Species. *Microbiological Reviews*. **52**:134-152.
- Mayrand D. et Grenier D. (1989). Biological activities of outer membranes vesicles. *Canadian Journal of Microbiology*. **35**:607-613.
- McBride BC., Singh U. et Joe A. (2012). Genetics and Molecular Biology of Anaerobic Bacteria. *Porphyromonas gingivalis*: Gene Cloning of Determinants of Pathogenicity. Springer-Verlag New York. 553p.
- McDermid AS., McKee AS. et Marsh PD. (1988). Effect of Environmental pH on Enzyme Activity and Growth of *Bacteroides gingivalis* W50. *Infection and Immunity*. **56**:1096-1100.
- McDougald D., Rice SA., Barraud N., Steinberg PD. et Kjelleberg S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*. **10**:39-50.
- Mirbagheri SA., Nezami BG. et Assa S. (2008). Rectal administration of d-alpha tocopherol for active ulcerative colitis: a preliminary report. *World Journal of Gastroenterology*. **14**:5990-5995.
- Mori S., Iirose K., Oido M., Muro M., Isogai E., Nakashima K., Ueda I. et Kowashi Y. (1998). Effect of Environmental pH on Bacterial Adhesion to Human Gingival Epithelium and Fimbrial Protein Synthesis of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of the Japanese Society of Periodontology*. **40**:58-65.
- Mouton C. et Robert JC. (1994). Bactériologie bucco-dentaire. Masson, Paris. 184p.
- Murakami Y., Imai M., Mukai Y., Ichihara S., Nakamura H. et Yoshimura F. (2004). Effects of various culture environments on expression of major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Letters*. **230**:159-165.
- Mysak J., Podzimek S., Sommerova P., Lyuya-Mi Y., Bartova J., Janatova T., Prochazkova J. et Duskova J. (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major Periodontopathic Pathogen Overview. *Journal of Immunology Research*. **2014**:2-8.

N

- Nagano K., Hasegawa Y., Abiko Y., Yoshida Y., Murakami Y. et Yoshimura F. (2012). *Porphyromonas gingivalis* FimA Fimbriae: Fimbrial Assembly by *fimA* Alone in the *fim* Gene Cluster and Differential Antigenicity among *fimA* Genotypes. *PLOS ONE*. **7**:43722.
- Nakayama K. (2015). *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *Journal of Periodontal Research*. **50**:1-8.

- Nelson KE., Fleischmann RD., DeBoy RT., Paulsen IT., Fouts DE., Eisen JA., Daugherty SC., Dodson RJ., Durkin AS., Gwinn M., Haft DH., Kolonay JF., Nelson WC., Mason T., Tallon L., Gray J., Granger D., Tettelin H., Dong H., Galvin JL., Duncan MJ., Dewhirst FE. et Fraser CM. (2003). Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. *Journal of Bacteriology*. **185**:5591-5601.
- Nibali L., Griffiths GS., Donos N., Parkar M., D'Aiuto F., Tonetti MS. et Brett PM. (2008). Association between interleukin-6 promoter haplotypes and aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. **35**:193-198.
- Nilsson M. et Kopp S. (2008). Gingivitis and periodontitis are related to repeated high levels of circulating tumor necrosis factor-alpha in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Periodontology*. **79**:1689-1696.
- Nizam N., Discioglu F., Saygun I., Bal V., Avcu F., Ozkan CK. et Serdar MA. (2014). The effect of alpha-Tocopherol and selenium on human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology*. **85**:636-644.

O

- O'Brien-Simpson NM., Veith PD., Dashper SG. et Reynolds EC. (2004). Antigens of bacteria associated with periodontitis. *Periodontology 2000*. **35**:101-134.
- Ogawa T. (1994). Immunobiological properties of chemically defined lipid A from lipopolysaccharide of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *European Journal of Immunology*. **219**:737-742.
- Okada H. et Murakami S. (1998). Cytokine expression in periodontal health and disease. *Critical reviews in oral biology and medicine*. **9**:248-266.
- Okamoto AC., Gaetti-Jardim Jr E., Arana-Chavez VE. et Avila-Campos MJ. (2002). Influence of subinhibitory concentration of antimicrobials on hydrophobicity, adherence and ultra-structure of *Fusobacterium nucleatum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. **33**:178-184.
- Olanié F. (2008). Les tests biologiques en parodontologie. Thèse de doctorat. Université de Nantes-France. 98p
- Olczak T., Simpson W., Liu X. et Genco CA. (2005). Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**:119-144.
- Oufrid S., Mliji EM., Latrache H., Mabrouki M., Hamadi F., Talmi M. et Timinouni M. (2014). Plasmid Mediated Resistance to Cephalosporin and Adhesion Properties in *E. Coli*. *Journal of Engineering Research and Applications*. **4**:55-62.

- Oyston PC. et Handley PS. (1990). Surface structures, haemagglutination and cell surface hydrophobicity of *Bacteroides fragilis* strains. *Journal of General Microbiology*. **136**:941-948.
- Ozer NK., Palozza P., Boscoboinik D. et Azzi A. (1993). d-alpha-Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Letters*. **322**:307-310.
- Ozler M., Korkmaz A., Uysal B., Simsek K., Ozkan C., Topal T. et Oter S. (2011). Effects of topical melatonin and vitamin E in a rat ischemic wound model. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. **1**:123-129.

P

- Page CR. et Eke PI. (2007). Case definitions for use in population-based surveillance of periodontitis. *Journal of Periodontology*. **78**:1387-1399.
- Pantaléon V. (2015). Le biofilm de *Clostridium difficile* : rôle des protéines de Surface. Thèse de doctorat. Université Paris Sud-France. 56p.
- Park Y., Simionato MR., Sekiya K., Murakami Y., James D., Chen W. et Lamont RJ. (2005). Short Fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and Their Role in Coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infection and Immunity*. **73**:3983-3989.
- Patel PV., Kumar GS. et Patel A. (2011). Periodontal Abscess: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. **5**:404-409.
- Pellat B., Miller C. et Guez D. (2002). Plaques bactériennes dentaires: approche biochimique. Potentiels cariogène et parodontopathogène. *Encyclopédie médico-chirurgicale*, Odontologie. Elsevier SAS. [23-010-A-15].
- Pierpaoli E., Cirioni O., Barucca A., Orlando F., Silvestri C., Giacometti A. et Provinciali M. (2011). Vitamin E supplementation in old mice induces antimicrobial activity and improves the efficacy of daptomycin in an animal model of wounds infected with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dkr254.
- Pizzo G., Guiglia R., Lo Russo L. et Campisi G. (2010). Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *European journal of internal medicine*. **21**:496-502.
- Pizzorno JE. et Murray MT. (2013). Textbook of Natural Medicine. 4th edition. Churchill Livingstone Elsevier. 1108p.
- Planëak D., Jorgië-Srdjak K. et Curilovië Z. (2001). New Classification of Periodontal Diseases. *Acta stomatologica Croatica*. **35**:89-93.

- Polak-Berecka M., Waśko A., Paduch R., Skrzypek T. et Sroka-Bartnicka A. (2014). The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Antonie van Leeuwenhoek* . **106**:751-762.
- Pöllänen MT., Paino A. et Ihalin R. (2013). Environmental Stimuli Shape Biofilm Formation and the Virulence of Periodontal Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**:17221-17237.

Q

- Qureshi AA., Reis JC., Papasian CJ., Morrison DC. et Qureshi N. (2010). Tocotrienols inhibit lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokines in macrophages of female mice. *Lipids in Health and Disease*. **9**:143.

R

- Ranney RR., Debski BF. et Tew JG. (1981). Pathogenesis of gingivitis and periodontal disease in children and young adults. *Pediatric Dentistry*. **3**:89-100.
- Reis C., DA Costa AV., Guimaraes JT., Tuna D., Braga AC., Pacheco JJ., Arosa FA., Salazar F. et Cardoso EM. (2014). Clinical improvement following therapy for periodontitis: association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Experimental and therapeutic medicine*. **8**:323-327.
- Rimbach G., Moehring J., Huebbe P. et JK. Lodge. (2010). Gene-Regulatory Activity of α -Tocopherol. *Molecules*. **15**:1746-1761.
- Riss TL., Moravec RA., Niles AL., Duellman S., Benink HA., Worzella TJ. et Minor L. (2013). Assay Guidance Manual [Internet]. Cell Viability Assays. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
- Rizvi S., Raza ST., Ahmed F., Ahmad A., Abbas S. et Mahdi F. (2014). The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. *Sultan Qaboos University Medical Journal*. **14**:157-165.
- Robin S., Soulimane T. et Lavelle S. (2011). Interaction of Biofilm-forming Bacteria with Abiotic Surface Biological Interactions with Surface Charge in Biomaterials. RSC Publishing. 127-128p.
- Roman A., Louise F., Weiss-Pelletier L. et Brunel-Trotebas S. (2006). Antibiotherapy strategy in periodontitis treatment. *Revue d'Odonto Stomatologie*. **35**:163-182.
- Rosenberg M., Gutnick D. et Rosenberg E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*. **9**:29-33.

- Rosenberg M., Buivids IA. et Ellen RP. (1991). Adhesion of *Actinomyces viscosus* to *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*-Coated Hexadecane Droplets. *Journal Of Bacteriology*. **173**:2581-2589.
- Roshna T. et Nandakumar K. (2012). Generalized Aggressive Periodontitis and Its Treatment Options: Case Reports and Review of the Literature. *Case Reports in Medicine*. **535321**:17.
- Rouabhia M., Semlali A., Audoy J. et Chmielewski W. (2012). Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN γ on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. *Cellular Immunology*. **280**:61-67.
- Rouch ET. (2015). Amélioration de l'hygiène buccodentaire par le conseil en officine. Thèse de doctorat. Université de *Toulouse III Paul Sabatier-France*. 46p.
- Rouxhet PG. et Mozes N. (1990). Physical chemistry of the interface between attached cell and their support. *Water Science and Technology*. **22**:1-16.
- Rubio C. (2002). Conception des mécanismes d'adhésion des biofilms en milieu marin en vue de la conception de nouveaux moyens de prévention. Thèse de doctorat. Université Paris VI-France. 134p.
- Rutger-Persson G. (2011). Diabetes and Periodontal Disease: An Update for Health Care Providers. *Diabetes Spectrum*. **24**:195-198.

S

- Samaranayake L. (2011). *Essential Microbiology for Dentistry*. Churchill Livingstone Elsevier. 156p.
- Samot J. (2012). Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. Thèse de doctorat. Université Bordeaux Segalen-france. 71p.
- Schanaider A., Castro LS. et Madi K. (2003). Effects of alpha-tocopherol on bacterial translocation and lipid peroxidation in rats with intestinal obstruction. *Acta Cirurgica Brasileira*. **18**:283-288.
- Schenkein HA. (2006). Host responses in maintaining periodontal health and determining periodontal disease. *Periodontology 2000*. **40**:77-93.
- Schwartz J. et Shklar G. (1992). The selective cytotoxic effect of carotenoids and alpha-tocopherol on human cancer cell lines in vitro. *Oral and Maxillofacial Surgery*. **50**:367-73.
- Sela MN. (2001). Role of *Treponema denticola* in periodontal diseases. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. **12**:399-413.

- Semlali A., Chakir J., Goulet JP., Chmielewski W. et Rouabhia M. (2011). Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *Journal of Periodontal Research*. **46**:533-541.
- Sethi R. et Govila V. (2011). Inhibitory effect of cranberry juice on the colonization of *Streptococci* species: An *in vitro* study. *Journal of Indian Society of Periodontology*. **15**:46-50.
- Shaddox LM., Gonçalves PF., Vovk A., Allin N., Huang H., Hou W., Aukhil I. et Wallet SM. (2013). LPS-induced inflammatory response after therapy of aggressive periodontitis. *Journal of Dental Research*. **92**:702-708.
- Shamama B., Syed Saud H., Shaikh NA. et Touba B. (2011). Role of *alpha tocopherol* as an adjuvant therapy in pregnancy induced hypertension. *Pakistan Journal of Pharmacology*. **28**:59-64.
- Shibata H., Katsuki H., Okawara M., Kume T. et Akaike A. (2006). c-Jun N-terminal kinase inhibition and a-tocopherol protect midbrain dopaminergic neurons from interferon c/lipopolysaccharide-induced injury without affecting nitric oxide production. *Journal of Neuroscience Research*. **83**:102-109.
- Sikkema J., Bont JAM. et Poolman B. (1994). Interaction of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Biological Chemistry*. **269**:8022-8026.
- Simain F., Rompen E. et Heinen E. (2010). Biofilms bactériens et médecine dentaire. *Revue Médicale de Liège*. **65**:569-573.
- Simon S., Machtou P. et Pertot W. (2012). Endodontie . Editions CdP wolters Kluwer France. 118p.
- Smalley JW., Birss AJ., Szmigielski B. et Potempa J. (2006). The HA2 haemagglutinin domain of the lysine-specific gingipain (Kgp) of *Porphyromonas gingivalis* promotes m-oxo bishaem formation from monomeric iron (III) protoporphyrin IX. *Microbiology*. **152**:1839-1845.
- Socransky SS., Haffajee AD., Cugini MA., Smith C. et Kent RL Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*. **25**:134-144.
- Socransky SS. et Haffajee AD. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology 2000*. **38**:135-187.
- Song H., Bélanger M., Whitlock J., Kozarov E. et Progulske-Fox A. (2005). Hemagglutinin B Is Involved in the Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Infection and Immunity*. **73**:7267-7273.

- Soskolne WA. et Klinger A. (2001). The relationship between periodontal diseases and diabète: an overview. *Annals of Periodontology*. **6**:91-98.
- Sroka A., Sztukowska M., Potempa J., Travis J. et Genco CA. (2001). Degradation of host heme proteins by lysine-and arginine-specific cysteine proteinases (Gingipains) of *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Bacteriology*. **183**:5609-5616.
- Stempel N., Strehmel J. et Overhage J. (2014). Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Current Pharmaceutical Design*. **21**:67-84.
- Suntres ZE. et Shek PN. (1996). Treatment of LPS-induced tissue injury: role of liposomal antioxidants. *Shock*. **6**:S57-S64.
- Suzuki D., Yoshimatsu D., Kamasaka H., Kuriki T. et Miyazak H. (2012). Determination of the Ca²⁺ Levels and pH Conditions that Inhibit the Growth of *Porphyromonas gingivalis* and Suppress the Demineralization of Tooth Enamel. *Dental Health Journal*. **62**(4):397-402.

T

- Taba Jr M., Souza SLS de. et Mariguela VC. (2012). Periodontal disease: a genetic perspective. *Brazilian Oral Research*. **26**:32-38.
- Tahan G., Aytac E., Aytekin H., Gunduz F., Dogusoy G., Aydin S., Tahan V. et Uzun H. (2011). Vitamin E has a dual effect of anti-inflammatory and antioxidant activities in acetic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Canadian Journal of Surgery*. **54**:333-338.
- Takahashi N. et Schachtele CF. (1990). Effect of pH on the growth and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides intermedius*. *Journal of Dental Research*. **69**:1266-1269.
- Takahashi N., Saito K., Schachtele CF. et Yamada T. (1997). Acid tolerance and acid neutralizing activity of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Molecular Oral Microbiology*. **12**:323-328.
- Takahashi N. (2003). Acid-neutralizing activity during amino acid fermentation by *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiology and Immunology*. **18**:109-113.
- Takashi M., Yukitaka M., Toshihide N. et Fuminobu Y. (2006). Effects of Various Growth Conditions in a Chemostat on Expression of Virulence Factors in *Porphyromonas gingivalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**:3458-3467.

- Tang J., Jiang Y., Tang Y., Chen B., Sun X., Su L. et Liu Z. (2013) Effects of propofol on damage of rat intestinal epithelial cells induced by heat stress and lipopolysaccharides. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **46**:507-512.
- Teixeira P., Lopes Z., Azeredo J., Oliveir R. et Vieira MJ. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*. **22**:247-251.
- Teng YT., Taylor GW., Scannapieco F., Kinane DF., Curtis M., Beck JD. et Kogon S. (2002). Periodontal health and systemic disorders. *Journal of the Canadian Dental Association*. **68**:188-192.
- Tenorio EL., Klein BA., Cheung WS. et Hu LT. (2011). Identification of interspecies interactions affecting *Porphyromonas gingivalis* virulence phenotypes. *Journal of Oral Microbiology*. **3**:8396
- Tintino SR., Morais-Tintino CD., Campina FF., Pereira RL., Costa MS., Braga MF., Limaverde PW., Andrade JC., Siqueira-Junior JP., Coutinho HDM., Balbino VQ., Leal-Balbino TC., Ribeiro-Filho J. et Quintans-Júnior LJ. (2016). Action of cholecalciferol and alpha-tocopherol on *Staphylococcus aureus* efflux pumps. *Excli Journal*. **15**:315-322.
- Tonetti MS. et Mombelli A. (1999). Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology*. **4**:39-53.
- Tremblay YDN., Hathroubi S. et Jacques M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. **78**:110-116.

U

- Uberos J., Augustin C., Liébana J., Molina A. et Muñoz-Hoyos A. (2001). Comparative study of the influence of melatonin and vitamin E on the surface characteristics of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*. **32**:303-306.

V

- Vardillo-rodriguez V., Busscher HJ. et Van der Mei HC. (2003). Biofilms in Medicine. Industry and Environmental Biotechnology. macroscopic and microscopic adhesive properties of microbial cell surface. IWA Publishing. 6p.
- Van der Mei HC., Van de Belt-Gritter B., Reid G., Bialkowska-Hobrzanska H. et Busscher HJ. (1997). Adhesion of coagulase-negative staphylococci grouped according to physico-chemical surface properties. *Microbiology*. **143**:3861-3870.

- Vergnault H. (2004). Etude et amélioration de la chromatographie en lit expansé. Thèse de doctorat. Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse-France. 83-86p.
- Vigouroux F. (2011). Guide pratique de chirurgie parodontale. Notions de base de parodontologie. Elsevier Masson. 2-4p.

W

- Wakabayashi H., Yamauchi K., Kobayashi T., Yaeshima T., Iwatsuki K. et Yoshie H. (2009). Inhibitory Effects of Lactoferrin on Growth and Biofilm Formation of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**:3308-3316.
- Wan Ismail WNH., Abdul Raza F. et Haji Abdul Rahim Z. (2013). Oral microbes and its environment: A Review Article. *ESTEEM Academic Journal*. **9**:67-75.
- Watanabe K., Yamaji Y. et Umemoto T. (1992). Correlation between cell-adherent activity and surface structure in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiology and Immunology*. **7**:357-363.
- Weinberg A., Belton CM., Park Y. et Lamot R. (1997). Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infection and Immunity*. **65**:313-316.
- Weiss E., Rosenberg M., Judes H. et Rosenberg E. (1982). Cell-surface hydrophobicity of adherent oral bacteria. *Current Microbiology*. **7**:125-128.
- Weiss EL., Lev-Dor R., Sharon N. et Ofek I. (2002). Inhibitory effect of a high-molecular-weight constituent of cranberry on adhesion of oral bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **42**:285-292.
- Wiebe CB. et Putnins EE. (2000). The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology-an update. *Canadian Dental Association journal*. **66**:594-597.
- Wijman JG., de Leeuw PP., Moezelaar R., Zwietering MH. et Abee T. (2007). Air liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*. **73**:1481-8.
- Wolf HF., Rateitschak EM. et Rateitschak KH. (2004). Parodontologie. Elsevier Masson. 25p.
- Wolf HF., Rateitschak EM. et Rateitschak KH. (2005). Parodontologie. Elsevier Masson. 8-14p.

- Wyss C. (1992). Growth of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *T. pectinovorum*, *T. socranskii*, and *T. vincentii* in a Chemically Defined Medium. *Journal of Clinical Microbiology*. **30**:2225-2229.

X

- Xie H. (2015). Biogenesis and function of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. *Future Microbiology*. **10**:1517-1527.
- Ximenez-Fyvie LA., Almaguer-Flores A., Jacobo-Soto V., Lara-Cordoba M., Sanchez-Vargas LO. et Alcantara-Maruri E. (2006). Description of the subgingival microbiota of periodontally untreated Mexican subjects: chronic periodontitis and periodontal health. *Journal of Periodontology*. **77**:460-471.

Y

- Yamaji Y., Kubota T., Sasaguri K., Sato S., Suzuki Y., Kumada H. et Umemoto T. (1995). Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infection and Immunity*. **63**:3576-3581.
- Yamanaka A., Kimizuka R., Kato T. et Okuda K. (2004). Inhibitory effects of cranberry juice on attachment of oral streptococci and biofilm formation. *Oral Microbiology and Immunology*. **19**:150154.
- Yamanaka-Okada A., Sato E., Kouchi T., Kimizuka R., Kato T. et Okuda K. (2008). Inhibitory Effect of Cranberry Polyphenol on Cariogenic Bacteria. *Bulletin of Tokyo Dental College*. **49**:107-112.
- Yamawaki I., Taguchi Y., Kato H., Okuda M., Katayama N., Hashimoto N., Shida M., Nishikawa I., Tamura I., Maeda H., Miyake T. et Umeda M. (2015). Effect of Glucose Concentration on the pH and Growth of *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*. *The Japanese journal of conservative dentistry*. **58**:510-517.
- Yang D., Chertov O., Bykovskaia N., Chen Q., Buffo MJ., Shogan J., Anderson M., Schroder JM., Wang JM., Howard OMZ. et Oppenheim JJ. (1999). beta-defensins: Linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. **286**:525-528.

Z

- Zeraik AE. et Nitschke M. (2012). Influence of Growth Media and Temperature on Bacterial Adhesion to Polystyrene Surfaces. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. **55**:569-576.

- Zilm PS., Mira A., Bagley CJ. et Rogers AH. (2010). Effect of alkaline growth pH on the expression of cell envelope proteins in *Fusobacterium nucleatum*. *Microbiology*. **156**:1783-1794.
- Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H., Mahdouani K. et Bakhrouf A. (2010). A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiologica*. **33**:137-145.

Annexes

ANNEXES

Annexe 1: Les milieux utilisés

1.1. Gelose columbia

Composition	(Grammes/litre)
Mélange spécial de peptones	23,0
Amidon	1,0
Chlorure de sodium	5,0
Agar	15,0
pH 7,3 ± 0,2	

1.2. Bouillon cœur-cervele (BHIB)

Composition	(Grammes/litre)
infusion de cervelle de veau	200,0
infusion de cœur de bœuf	250,0
protéose-peptone	10,0
dextrose	2,0
chlorure de sodium	5
hydrogénophosphate de sodium	2,5
pH 7,4 ± 0,2	

1.3. Milieu Amies

Composition	(Grammes/litre)
Chlorure de sodium	3,0
Chlorure de potassium	0,2
Chlorure de calcium	0,1
Chlorure de magnésium	0,1
Hydrogéno-orthophosphate disodique	1,15
Dihydrogène-orthophosphate de potassium	0,2
Thioglycollate de sodium	1,0
Agar	7,5

1.4. Tampon PBS (phosphate Buffered saline) à 0,1N

Composition	(Grammes/litre)
NaCl	4,93
K ₂ HPO ₄	1,19
KH ₂ PO ₄	0,29
pH 7,2 ± 0,2	

1.5. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)

Composition	(Grammes/litre)
Calcium Chloride Dihydrate	0.26500
Magnesium Sulfate Anhydrous	0.09767
Ferric Nitrate Nonahydrate	0.00010
Potassium Chloride	0.40000
Sodium Chloride	6.40000
Sodium Phosphate Monobasic Anhydrous	0.10900
D-Glucose Anhydrous	1.00000
Glycine	0.03000
L-Arginine Monohydrochloride	0.08400
L-Cystine Dihydrochloride	0.06260
L-Histidine Monohydrochloride Monohydrate	0.04200
L-Isoleucine	0.10500
L-Leucine	0.10500
L-Lysine Monohydrochloride	0.14600
L-Methionine	0.03000
L-Phenylalanine	0.06600
L-Serine	0.04200
L-Threonine	0.09500
L-Tryptophan	0.01600
L-Tyrosine Disodium Salt Dihydrate	0.10379
L-Valine	0.09400
Choline Chloride	0.00400
D-Ca Pantothenate	0.00400
Folic Acid	0.00400
Myo-Inositol	0.00720
Nicotinamide (Nicotinic acid amide)	0.00400
Pyridoxal Hydrochloride	0.00400
Riboflavin	0.00040
Thiamine Hydrochloride	0.00400
Phenol Red Sodium Salt	0.01590
Sodium Pyruvate	0.11000
Sodium Bicarbonate	3.70000
Eau distillée	986.84934

Annexe 2: Tableau de lecture API 20A

Tests	Composants actifs	QTE mg/cup.	Réactions/ Enzymes	Résultats	
				Négatif	Positif
<u>IND</u>	L-tryptophane	0.98	Formation d'indole	<u>XYL-mélanger/2-3 min+EHR/5 min</u>	
				jaune	rouge
URE	urée	0.648	Urease	Jaune-orangé	rouge
GLU	D-glucose	1.96	Acidification (glucose)	BCP Pourpre Jaune/vert-jaune	
MAN	D-mannitol	1.96	Acidification (mannitol)		
LAC	D-lactose	1.96	Acidification (lactose)		
SAC	D-saccharose	1.86	Acidification (saccharose)		
MAL	D-maltose	1.96	Acidification (maltose)		
SAL	salicine	1.64	Acidification (salicine)		
XYL	D-xylose	1.64	Acidification (xylose)		
ARA	L-arabinose	1.64	Acidification (arabinose)		
<u>GEL</u>	Gélatine (origine bovine)	0.6	Hydrolyse (protéase) (gélatine)	Pas de diffusion du pigment (1)	Diffusion du pigment noir (1)
ESC	Esculine Citrate de fer	0.36 0.11	Hydrolyse (β -glucosidase) (esculine)	Jaune (2)	Brun-noire (2)
				Sous UV 356 nm	
				Fluorescence	Pas de fluorescence
GLY	glycérol	1.82	Acidification (glycérol)	BCP Pourpre Jaune/vert-jaune	
CEL	D-cellobiose	1.86	Acidification (cellobiose)		
MNE	D-mannose	1.96	Acidification (mannose)		
MLZ	D-mélézitose	1.96	Acidification (mélézitose)		
RAF	D-raffinose	2.18	Acidification (raffinose)		
SOR	D-sorbitol	2.18	Acidification (sorbitol)		
RHA	L-rhamnose	1.96	Acidification (rhamnose)		
TRE	D-tréhalose	1.96	Acidification (tréhalose)		

Annexe 3

Table des valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les anaérobies stricts (suite). Comité de l'antibiogramme de la SFM (2012).

Antibiotique	Charge du disque	Concentrations critiques (mg/L)		Diamètres critiques (mm)		Remarques
		S	R	S	R	
Chloramphénicol	30 µg	≤ 8	> 8	≥ 23	< 23	
Clindamycine	2 UI	≤ 4	> 4	≥ 15	< 15	Lecture obligatoire à 48h : risque de faux sensibles après 24h d'incubation.
Spiramycine	100 µg	≤ 1	> 4	≥ 24	< 19	Concerne les anaérobies isolés d'infections dentaires.
Pristinamycine	15 µg	≤ 1	> 2	≥ 22	< 19	Ne pas tester pour les <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> .
Tigécycline	15 µg	≤ 4	> 8	≥ 21	-	Lorsque le diamètre est ≤ 20 mm, il y a lieu de déterminer la CMI
Vancomycine	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 17	-	Interprétation valable pour les anaérobies à Gram positif.
Teicoplanine	30 µg	≤ 4	> 8	≥ 17	-	Interprétation valable pour les anaérobies à Gram positif.
Ofloxacine	5 µg	≤ 1	> 4	≥ 22	< 16	Seulement pour <i>Peptostreptococcus</i> et les <i>Propionibacterium</i> spp. en cas d'infection osseuse ou cérébrale.
Moxifloxacine	5 µg	≤ 1	> 2	≥ 21	< 18	
Rifampicine	30 µg	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14	
Métronidazole	Comprimé 16 µg	≤ 4	> 4	≥ 21	< 21	Interprétation valable pour l'ornidazole. Cf règle (6).
Vancomycine	5 µg	-	-	-	< 10	Aide à l'identification des bacilles à Gram négatif. Cf règle (7).
Kanamycine	1000 µg	-	-	-	< 10	Aide à l'identification des bacilles à Gram négatif. Cf règle (7).
Colistine	10 µg	-	-	-	< 10	Aide à l'identification des bacilles à Gram négatif. Cf règle (7).

Règles de lecture interprétative (suite)

(6). Les comprimés Néosensitabs® (Rosco) permettent l'étude de la sensibilité au métronidazole par diffusion en milieu gélosé. Par cette technique, les diamètres obtenus avec des souches sensibles sont > 35 mm. Chez *Clostridium* et les anaérobies à Gram négatif, la résistance aux 5 nitro-imidazoles est très rare. Elle doit être confirmée par détermination de la CMI. Certaines souches apparaissent faussement résistantes si l'anaérobiose n'est pas correcte. La résistance à haut niveau est exceptionnelle. En France, 2 à 3 % des souches de *Bacteroides* du groupe *fragilis* ont une sensibilité diminuée aux 5-nitro-imidazoles (CMI de 8 à 16 mg/L).

(7). Ces trois disques, de charge particulière, constituent une aide précieuse à l'identification des principaux bacilles à Gram négatif : les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont résistants à kanamycine, colistine et vancomycine ; *Prevotella* est résistante à kanamycine et vancomycine, la sensibilité à la colistine variant selon les espèces ; *Porphyromonas* est sensible à la vancomycine et résistant à kanamycine et colistine ; *Fusobacterium* est sensible à kanamycine et colistine, résistant à la vancomycine.

Annexe 4

1. Technique d'ELISA sandwich: Dosage des interleukines IL-1β
2. Technique d'ELISA sandwich: Dosage des interleukines IL-6
3. Technique d'ELISA sandwich: Dosage des beta-défensines HBD-2

Quantikine[®] ELISA

Human IL-1 β /IL-1F2 Immunoassay

Catalog Number DLB50

SLB50

PDLB50

For the quantitative determination of human interleukin 1 beta (IL-1 β) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

Note: The standard reconstitution method has changed. Please read this package insert in its entirety before using this product.

This package insert must be read in its entirety before using this product.
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED	4
PRECAUTIONS	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	4
REAGENT PREPARATION	5
ASSAY PROCEDURE	6
CALCULATION OF RESULTS	7
TYPICAL DATA	7
PRECISION	8
RECOVERY	8
SENSITIVITY	8
LINEARITY	9
CALIBRATION	9
SAMPLE VALUES	9
SPECIFICITY	10
REFERENCES	11
PLATE LAYOUT	12

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

INTRODUCTION

The Interleukin 1 (IL-1) family of proteins consists of the classic members IL-1 α , IL-1 β , and IL-1ra, plus IL-18, IL-33 and IL-1F5-F10. IL-1 α and IL-1 β bind to the same cell surface receptors and share biological functions (1). IL-1 is not produced by unstimulated cells of healthy individuals with the exception of skin keratinocytes, some epithelial cells, and certain cells of the central nervous system. However, in response to inflammatory agents, infections, or microbial endotoxins, a dramatic increase in the production of IL-1 by macrophages and various other cell types is observed. IL-1 β plays a central role in immune and inflammatory responses, bone remodeling, fever, carbohydrate metabolism, and GH/IGF-I physiology. Inappropriate or prolonged production of IL-1 has been implicated in a variety of pathological conditions including sepsis, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease, acute and chronic myelogenous leukemia, insulin-dependent diabetes mellitus, atherosclerosis, neuronal injury, and aging-related diseases (2-5).

IL-1 α and IL-1 β are structurally related polypeptides that show approximately 25% homology at the amino acid level. Both are synthesized as 31 kDa precursors that are subsequently cleaved into mature proteins of approximately 17.5 kDa (6, 7). Cleavage of the IL-1 β precursor by Caspase-1/ICE is a key step in the inflammatory response (2, 8). Neither IL-1 α nor IL-1 β contains a typical hydrophobic signal peptide (9-11), but evidence suggests that these factors can be secreted by non-classical pathways (12, 13). A portion of unprocessed IL-1 α can be presented on the cell membrane and may retain biological activity (14). The precursor form of IL-1 β , unlike the IL-1 α precursor, shows little or no biological activity in comparison to the processed form (13, 15). Both unprocessed and mature forms of IL-1 β are exported from the cell.

IL-1 α and IL-1 β exert their effects through immunoglobulin superfamily receptors that additionally bind IL-1ra. The 80 kDa transmembrane type I receptor (IL-1 RI) is expressed on T cells, fibroblasts, keratinocytes, endothelial cells, synovial lining cells, chondrocytes, and hepatocytes (16, 17). The 68 kDa transmembrane type II receptor (IL-1 RII) is expressed on B cells, neutrophils, and bone marrow cells (18). The two IL-1 receptor types show approximately 28% homology in their extracellular domains but differ significantly in that the type II receptor has a cytoplasmic domain of only 29 amino acids (aa), whereas the type I receptor has a 213 aa cytoplasmic domain. IL-1 RII does not appear to signal in response to IL-1 and may function as a decoy receptor that attenuates IL-1 function (19). The IL-1 receptor accessory protein (IL-1 RAcP) associates with IL-1 RI and is required for IL-1 RI signal transduction (20). IL-1ra is a secreted molecule that functions as a competitive inhibitor of IL-1 (21, 22). Soluble forms of both IL-1 RI and IL-1 RII have been detected in human plasma, synovial fluids, and the conditioned media of several human cell lines (23, 24). In addition, IL-1 binding proteins that resemble soluble IL-1 RII are encoded by vaccinia and cowpox viruses (25).

The Quantikine Human IL-1 β Immunoassay is a 3.5-4.5 hour solid phase ELISA designed to measure IL-1 β in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains *E. coli*-expressed recombinant human IL-1 β and antibodies raised against the recombinant factor. It has been shown to quantitate recombinant human IL-1 β accurately. Results obtained using natural IL-1 β showed linear curves that were parallel to the standard curves obtained using the Quantikine kit standards. These results indicate that this kit can be used to determine relative mass values for natural IL-1 β . Reports indicate that this and other ELISA kits calibrated using mature IL-1 β as a standard will detect, but considerably underestimate, the unprocessed IL-1 β precursor present in samples (26, 27). In biological samples other than cell lysates, the precursor form of IL-1 β is usually not the predominant form of IL-1 β present and, additionally, is not biologically active. Therefore, results obtained using this kit should provide a useful measure of the levels of active IL-1 β present in biological fluids.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for human IL-1 β has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any IL-1 β present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for human IL-1 β is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of IL-1 β bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- It is important that the Calibrator Diluent selected for the standard curve be consistent with the samples being assayed.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the appropriate Calibrator Diluent and repeat the assay.
- Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of Wash Buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	CATALOG # DLB50	CATALOG # SLB50	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human IL-1 β Microplate [†]	890039	1 plate	6 plates	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for human IL-1 β .	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of the zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human IL-1 β Standard	890041	1 vial	6 vials	Recombinant human IL-1 β in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for reconstitution volume.</i>	Aliquot and store for up to 1 month at ≤ -20 °C in a manual defrost freezer.* Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Human IL-1 β Conjugate [†]	890040	1 vial	6 vials	21 mL/vial of polyclonal antibody specific for human IL-1 β conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Assay Diluent RD1-83	895875	1 vial	3 vials	11 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>May contain a precipitate. Mix well before and during use. For serum/plasma samples.</i>	
Calibrator Diluent RD5-5	895485	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>For cell culture supernate samples.</i>	
Calibrator Diluent RD6C	895015	1 vial	6 vials	21 mL/vial of animal serum with preservatives. <i>For serum/plasma samples.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895032	1 vial	6 vials	6 mL/vial of 2 N sulfuric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 strips	24 strips	Adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

DLB50 contains sufficient materials to run an ELISA on one 96 well plate.

SLB50 (SixPak) contains sufficient materials to run ELISAs on six 96 well plates.

This kit is also available in a PharmPak (R&D Systems, Catalog # PDLB50). PharmPaks contain sufficient materials to run ELISAs on 50 microplates. Specific vial counts of each component may vary. Please refer to the literature accompanying your order for specific vial counts.

[†] This product is covered by the following U.S. patent.: 5,681,933.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- 500 mL graduated cylinder.
- Human IL-1 β Controls (optional; R&D Systems, Catalog # QC01-1).

PRECAUTIONS

IL-1 β is detectable in saliva and sweat. Take precautionary measures to prevent contamination of the kit reagents while running the assay.

Calibrator Diluent RD6C contains sodium azide which may react with lead and copper plumbing to form explosive metallic azides. Flush with large volumes of water during disposal.

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use.

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA, heparin, or citrate as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

REAGENT PREPARATION

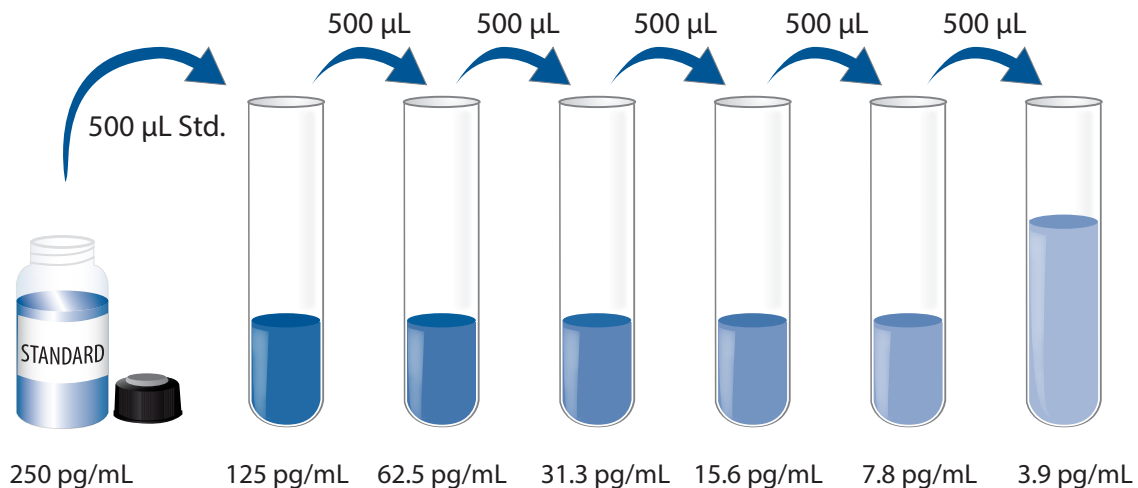
Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 200 μ L of the resultant mixture is required per well.

Human IL-1 β Standard - Refer to the vial label for reconstitution volume. - Reconstitute the Human IL-1 β Standard with Calibrator Diluent RD5-5 (*for cell culture supernate samples*) or Calibrator Diluent RD6C (*for serum/plasma samples*). This reconstitution produces a stock solution of 250 pg/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 500 μ L of the appropriate Calibrator Diluent into each tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted Human IL-1 β Standard (250 pg/mL) serves as the high standard. The appropriate Calibrator Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all standards, samples, and controls be assayed in duplicate.

Note: *IL-1 β is detectable in saliva and sweat. Take precautionary measures to prevent contamination of the kit reagents while running the assay.*

1. Prepare all reagents and working standards as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. **For Cell Culture Supernate Samples:** Proceed to step 4.
For Serum/Plasma Samples: Add 50 μ L of Assay Diluent RD1-83 to each well.
Assay Diluent RD1-83 may contain a precipitate. Mix well before and during use.
4. Add 200 μ L of Standard, sample, or control per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature. A plate layout is provided for a record of standards and samples assayed.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process twice for a total of three washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μ L) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μ L of Human IL-1 β Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip.
For Cell Culture Supernate Samples: Incubate for 1 hour at room temperature.
For Serum/Plasma Samples: Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μ L of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. Protect from light.
9. Add 50 μ L of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. If the color in the wells is green or if the color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

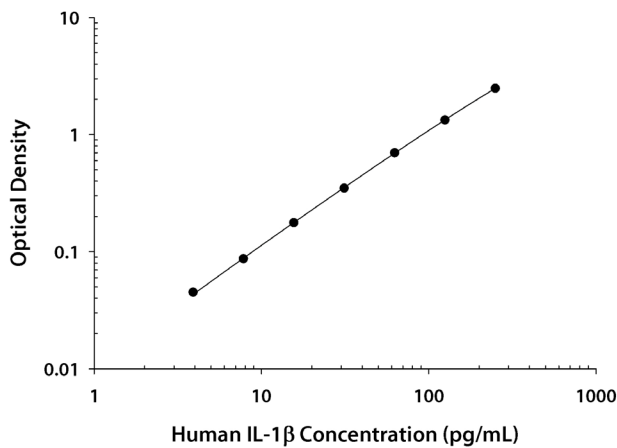
Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human IL-1 β concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

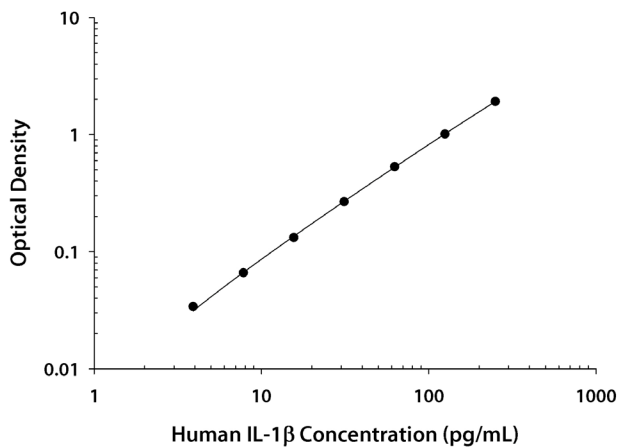
These standard curves are provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

CELL CULTURE SUPERNATE ASSAY



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.023 0.027	0.025	—
3.9	0.070 0.071	0.070	0.045
7.8	0.109 0.115	0.112	0.087
15.6	0.197 0.206	0.202	0.177
31.3	0.373 0.374	0.374	0.349
62.5	0.715 0.733	0.724	0.699
125	1.349 1.366	1.358	1.333
250	2.495 2.517	2.506	2.481

SERUM/PLASMA ASSAY



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.022 0.026	0.024	—
3.9	0.057 0.058	0.058	0.034
7.8	0.088 0.091	0.090	0.066
15.6	0.156 0.157	0.156	0.132
31.3	0.290 0.292	0.291	0.267
62.5	0.549 0.563	0.556	0.532
125	1.034 1.036	1.035	1.011
250	1.933 1.942	1.938	1.914

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay)

Four samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in twenty separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

CELL CULTURE SUPERNATE ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision				Inter-Assay Precision		
	1	2	3	4	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	12.6	30.4	69.2	192	30.8	120	194
Standard deviation	0.3	1.0	1.6	6.5	2.2	4.1	7.9
CV (%)	2.4	3.3	2.3	3.4	7.1	3.4	4.1

SERUM/PLASMA ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision				Inter-Assay Precision		
	1	2	3	4	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	18.9	30.2	122	181	29.8	118	193
Standard deviation	1.6	1.0	5.4	5.0	2.5	5.0	8.0
CV (%)	8.5	3.3	4.4	2.8	8.4	4.2	4.1

RECOVERY

The recovery of human IL-1 β spiked to different levels in samples throughout the range of the assay in various matrices was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media	97	80-111%
Serum	95	87-110%
EDTA plasma	86	81-100%
Heparin plasma	82	76-100%
Citrate plasma	93	83-110%

SENSITIVITY

The minimum detectable dose (MDD) of human IL-1 β is typically less than 1 pg/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

LINEARITY

To assess linearity of the assay, samples containing and/or spiked with high concentrations of human IL-1 β were diluted with the appropriate Calibrator Diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

		Cell culture media (n=3)	Serum (n=4)	EDTA plasma (n=4)	Heparin plasma (n=4)	Citrate plasma (n=4)
1:2	Average % of Expected	101	99	99	99	101
	Range (%)	—	98-99	95-101	95-102	96-109
1:4	Average % of Expected	103	97	99	100	99
	Range (%)	103-104	94-100	93-102	96-102	87-104
1:8	Average % of Expected	106	95	100	94	91
	Range (%)	—	93-98	95-106	88-99	87-99
1:16	Average % of Expected	108	89	91	91	87
	Range (%)	107-109	87-91	86-96	84-96	81-93

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against highly purified recombinant human IL-1 β . The non-WHO reference material for IL-1 β 86/552 was evaluated in this kit. The dose response curve of the reference material parallels the Quantikine standard curve. To convert sample values obtained with the Quantikine kit to approximate NIBSC (86/552) units, use the equation below.

NIBSC (86/552) approximate value (U/mL) = 0.098 x Quantikine Human IL-1 β value (pg/mL).

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Forty serum and plasma samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of IL-1 β in this assay. No medical histories were available for the donors used in this study. All samples measured less than the lowest IL-1 β standard, 3.9 pg/mL.

Cell Culture Supernates - Human peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 50 μ M β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin sulfate. Cells were stimulated with the agents listed in the table below. Aliquots of the cell culture supernate were removed on days 1, 3, and 5 and assayed for levels of human IL-1 β .

Stimulant	Day 1 (pg/mL)	Day 3 (pg/mL)	Day 5 (pg/mL)
10 μ g/mL PHA	2185	2004	2383
10 μ g/mL PHA+10 ng/mL rhIL-2	1938	1973	2839
50 ng/mL PMA	1767	1027	1159
50 ng/mL LPS	4158	2145	1308

SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant human IL-1 β . This assay also recognizes recombinant rhesus macaque IL-1 β .

The factors listed below were prepared at 50 ng/mL in Calibrator Diluent and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 100 ng/mL in a mid-range rhIL-1 β control were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed with the following.

Recombinant human:

IL-1 α
IL-1F7
IL-1ra
IL-1 RAcP
IL-1 RAPL1
IL-1 RAPL2
IL-1 Rrp2
IL-18
IL-18 R α
IL-18 R β
IL-33
IL-36 α
IL-36 β
IL-36 γ
IL-36ra
IL-38
SIGIRR
ST2

Recombinant mouse:

IL-1 α
IL-1 β
IL-33
SIGIRR
ST2

Recombinant rat:

IL-1 α
IL-1ra

Recombinant porcine:

IL-1 α
IL-1 β
IL-1ra

Recombinant equine:

IL-1 β
IL-1ra

Other recombinants:

cotton rat IL-1 α
canine IL-1 β
guinea pig IL-1 β

Recombinant human Pro-IL-1 β cross-reacts approximately 6.1% in this assay.

Recombinant rat IL-1 β cross-reacts approximately 0.2% in this assay.

Recombinant cotton rat IL-1 β cross-reacts approximately 0.4% in this assay.

Recombinant human IL-1 RI and IL-1 RII do not cross-react but do interfere at concentrations > 10,000 pg/mL.

REFERENCES

1. Sims, J.E and D.E. Smith (2010) *Nat. Rev. Immunol.* **10**:89.
2. Martinon, F. and J. Tschopp (2007) *Cell Death Differ.* **14**:10.
3. Isoda, K. and F. Ohsuzu (2006) *J. Atheroscler. Thromb.* **13**:21.
4. Allan, S.M. *et al.* (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**:629.
5. Kornman, K.S. (2006) *Am. J. Clin. Nutr.* **83**:475S.
6. Giri, J.G. *et al.* (1985) *J. Immunol.* **134**:343.
7. Hazuda, D.J. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **265**:6318.
8. Cerretti, D.P. *et al.* (1992) *Science* **256**:97.
9. Lomedico, P.T. *et al.* (1984) *Nature* **312**:458.
10. Auron, P.E. *et al.* (1987) *J. Immunol.* **138**:1447.
11. March, C.J. *et al.* (1985) *Nature* **315**:641.
12. Rubartelli, A. *et al.* (1990) *EMBO J.* **9**:1503.
13. Rubartelli, A. *et al.* (1993) *Cytokine* **5**:117.
14. Kurt-Jones, E.A. *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:1204.
15. Hazuda, D. *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:1689.
16. Urdal, D.L. *et al.* (1988) *J. Biol. Chem.* **263**:2870.
17. Sims, J.E. *et al.* (1988) *Science* **241**:585.
18. McMahan, C.J. *et al.* (1991) *EMBO J.* **10**:2821.
19. Slack, J. *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* **268**:2513.
20. Greenfeder, S.J. *et al.* (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:13757.
21. Eisenberg, S.P. *et al.* (1990) *Nature* **343**:341.
22. Carter, D.B. *et al.* (1990) *Nature* **344**:633.
23. Dayer, J-M. and D. Burger (1994) *Eur. Cytokine Netw.* **5**:563.
24. Svenson, M. *et al.* (1993) *Cytokine* **5**:427.
25. Sims, J.E. and S.K. Dower (1994) *Eur. Cytokine Netw.* **5**:539.
26. Herzyk, D.J. *et al.* (1992) *J. Immunol. Methods* **148**:243.
27. Dinarello, C.A. (1992) *J. Immunol. Methods* **148**:255.

PLATE LAYOUT

Use this plate layout to record standards and samples assayed.

The diagram shows a 12x8 microplate layout. The rows are numbered 1 through 12 on the left side, and the columns are labeled A through H at the bottom. Each well is represented by a circle. The layout is as follows:

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								

NOTES

NOTES

Quantikine[®] ELISA

Human IL-6 Immunoassay

Catalog Number D6050

S6050

PD6050

For the quantitative determination of human Interleukin 6 (IL-6) concentrations in cell culture supernates, serum, and plasma.

Note: The standard reconstitution method has changed. Please read this package insert in its entirety before using this product.

This package insert must be read in its entirety before using this product.
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

TABLE OF CONTENTS

SECTION	PAGE
INTRODUCTION	1
PRINCIPLE OF THE ASSAY	2
LIMITATIONS OF THE PROCEDURE	2
TECHNICAL HINTS	2
MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS	3
OTHER SUPPLIES REQUIRED	4
PRECAUTIONS	4
SAMPLE COLLECTION & STORAGE	4
REAGENT PREPARATION	5
ASSAY PROCEDURE	6
CALCULATION OF RESULTS	7
TYPICAL DATA	7
PRECISION	8
RECOVERY	8
SENSITIVITY	8
LINEARITY	9
CALIBRATION	9
SAMPLE VALUES	9
SPECIFICITY	10
REFERENCES	11
PLATE LAYOUT	12

MANUFACTURED AND DISTRIBUTED BY:

USA & Canada | R&D Systems, Inc.

614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, USA
TEL: (800) 343-7475 (612) 379-2956 FAX: (612) 656-4400
E-MAIL: info@RnDSystems.com

DISTRIBUTED BY:

UK & Europe | R&D Systems Europe, Ltd.

19 Barton Lane, Abingdon Science Park, Abingdon OX14 3NB, UK
TEL: +44 (0)1235 529449 FAX: +44 (0)1235 533420
E-MAIL: info@RnDSystems.co.uk

China | R&D Systems China Co., Ltd.

24A1 Hua Min Empire Plaza, 726 West Yan An Road, Shanghai PRC 200050
TEL: +86 (21) 52380373 FAX: +86 (21) 52371001
E-MAIL: info@RnDSystemsChina.com.cn

INTRODUCTION

Interleukin 6 (IL-6) is a pleiotropic, α -helical, 22-28 kDa phosphorylated and variably glycosylated cytokine that plays important roles in the acute phase reaction, inflammation, hematopoiesis, bone metabolism, and cancer progression (1-5). Mature human IL-6 is 183 amino acids (aa) in length and shares 39% aa sequence identity with mouse and rat IL-6 (6). Alternative splicing generates several isoforms with internal deletions, some of which exhibit antagonistic properties (7-10). Cells known to express IL-6 include CD8⁺ T cells, fibroblasts, synoviocytes, adipocytes, osteoblasts, megakaryocytes, endothelial cells (under the influence of endothelins), sympathetic neurons, cerebral cortex neurons, adrenal medulla chromaffin cells, retinal pigment cells, mast cells, keratinocytes, Langerhans cells, fetal and adult astrocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils, colonic epithelial cells, B1 B cells and pancreatic islet beta cells (2, 11-33). IL-6 production is generally correlated with cell activation and is normally kept in control by glucocorticoids, catecholamines, and secondary sex steroids (2). Normal human circulating IL-6 is in the 1 pg/mL range, with slight elevations during the menstrual cycle, modest elevations in certain cancers, and large elevations after surgery (34-38).

IL-6 induces signaling through a cell surface heterodimeric receptor complex composed of a ligand binding subunit (IL-6 R alpha) and a signal transducing subunit (gp130). IL-6 binds to IL-6 R α , triggering IL-6 R α association with gp130 and gp130 dimerization (39). gp130 is also a component of the receptors for CLC, CNTF, CT-1, IL-11, IL-27, LIF, and OSM (40). Soluble forms of IL-6 R α are generated by both alternative splicing and proteolytic cleavage (5). In a mechanism known as trans-signaling, complexes of soluble IL-6 and IL-6 R α elicit responses from gp130-expressing cells that lack cell surface IL-6 R α (5). Trans-signaling enables a wider range of cell types to respond to IL-6, as the expression of gp130 is ubiquitous, while that of IL-6 R α is predominantly restricted to hepatocytes, monocytes, and resting lymphocytes (2, 5). Soluble splice forms of gp130 block trans-signaling from IL-6/IL-6 R α but not from other cytokines that use gp130 as a co-receptor (5, 41).

IL-6, along with TNF- α and IL-1, drives the acute inflammatory response. IL-6 is almost solely responsible for fever and the acute phase response in the liver, and it is important in the transition from acute inflammation to either acquired immunity or chronic inflammatory disease (1-5). When dysregulated, it contributes to chronic inflammation in conditions such as obesity, insulin resistance, inflammatory bowel disease, arthritis, and sepsis (2, 5). IL-6 modulates bone resorption and is a major effector of inflammatory joint destruction in rheumatoid arthritis through its promotion of Th17 cell development and activity (1). It contributes to atherosclerotic plaque development and destabilization as well as the development of inflammation-associated carcinogenesis (1, 2). IL-6 can also function as an anti-inflammatory molecule, as in skeletal muscle where it is secreted in response to exercise (2). In addition, it enhances hematopoietic stem cell proliferation and the differentiation of memory B cells and plasma cells (42).

The Quantikine Human IL-6 Immunoassay is a 4.5 hour solid phase immunoassay designed to measure IL-6 in cell culture supernates, serum, and plasma. It contains *E. coli*-expressed recombinant human IL-6, and antibodies raised against the recombinant protein. Natural human IL-6 showed dose-response curves that were parallel to the standard curves obtained using the recombinant Quantikine kit standards, indicating that this kit can be used to determine relative levels of natural human IL-6.

It has been observed in our laboratories that the measurement of IL-6 is insensitive to the addition of the recombinant form of the IL-6 soluble receptor. Therefore it is probable that experimental sample measurements reflect the total amount of IL-6 present, i.e., the total amount of free IL-6 plus the amount of IL-6 initially bound to soluble receptors, if any are present in the samples. High levels of high-affinity autoantibodies to IL-6 in the serum of some blood donors have been reported (36, 37). Such autoantibodies have the potential to interfere with the measurement of IL-6 by ELISA immunoassays.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

This assay employs the quantitative sandwich enzyme immunoassay technique. A monoclonal antibody specific for human IL-6 has been pre-coated onto a microplate. Standards and samples are pipetted into the wells and any IL-6 present is bound by the immobilized antibody. After washing away any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody specific for human IL-6 is added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution is added to the wells and color develops in proportion to the amount of IL-6 bound in the initial step. The color development is stopped and the intensity of the color is measured.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR USE IN DIAGNOSTIC PROCEDURES.
- The kit should not be used beyond the expiration date on the kit label.
- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- It is important that the Calibrator Diluent selected for the standard curve be consistent with the samples being assayed.
- If samples generate values higher than the highest standard, dilute the samples with the appropriate Calibrator Diluent and repeat the assay. If cell culture supernate samples require larger dilutions, perform an intermediate dilution with culture media and the final dilution with the appropriate Calibrator Diluent.
- Any variation in standard diluent, operator, pipetting technique, washing technique, incubation time or temperature, and kit age can cause variation in binding.
- Variations in sample collection, processing, and storage may cause sample value differences.
- This assay is designed to eliminate interference by other factors present in biological samples. Until all factors have been tested in the Quantikine Immunoassay, the possibility of interference cannot be excluded.

TECHNICAL HINTS

- When mixing or reconstituting protein solutions, always avoid foaming.
- To avoid cross-contamination, change pipette tips between additions of each standard level, between sample additions, and between reagent additions. Also, use separate reservoirs for each reagent.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- When using an automated plate washer, adding a 30 second soak period following the addition of Wash Buffer, and/or rotating the plate 180 degrees between wash steps may improve assay precision.
- Substrate Solution should remain colorless until added to the plate. Keep Substrate Solution protected from light. Substrate Solution should change from colorless to gradations of blue.
- Stop Solution should be added to the plate in the same order as the Substrate Solution. The color developed in the wells will turn from blue to yellow upon addition of the Stop Solution. Wells that are green in color indicate that the Stop Solution has not mixed thoroughly with the Substrate Solution.

MATERIALS PROVIDED & STORAGE CONDITIONS

Store the unopened kit at 2-8 °C. Do not use past kit expiration date.

PART	PART #	CATALOG # D6050	CATALOG # S6050	DESCRIPTION	STORAGE OF OPENED/ RECONSTITUTED MATERIAL
Human IL-6 Microplate	890045	1 plate	6 plates	96 well polystyrene microplate (12 strips of 8 wells) coated with a monoclonal antibody specific for human IL-6.	Return unused wells to the foil pouch containing the desiccant pack. Reseal along entire edge of zip-seal. May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Human IL-6 Standard	890047	1 vial	6 vials	Recombinant human IL-6 in a buffered protein base with preservatives; lyophilized. <i>Refer to the vial label for reconstitution volume.</i>	Aliquot and store for up to 1 month at ≤ -20 °C in a manual defrost freezer.* Avoid repeated freeze-thaw cycles.
Human IL-6 Conjugate	890046	1 vial	6 vials	21 mL/vial of polyclonal antibody specific for human IL-6 conjugated to horseradish peroxidase with preservatives.	May be stored for up to 1 month at 2-8 °C.*
Assay Diluent RD1W	895117	1 vial	6 vials	11 mL/vial of a buffered protein base with preservatives.	
Calibrator Diluent RD5T	895175	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a buffered protein base with preservatives. <i>For cell culture supernate samples.</i>	
Calibrator Diluent RD6F	895018	1 vial	6 vials	21 mL/vial of animal serum with preservatives. <i>For serum/plasma samples.</i>	
Wash Buffer Concentrate	895003	1 vial	6 vials	21 mL/vial of a 25-fold concentrated solution of buffered surfactant with preservative. <i>May turn yellow over time.</i>	
Color Reagent A	895000	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized hydrogen peroxide.	
Color Reagent B	895001	1 vial	6 vials	12 mL/vial of stabilized chromogen (tetramethylbenzidine).	
Stop Solution	895032	1 vial	6 vials	6 mL/vial of 2 N sulfuric acid.	
Plate Sealers	N/A	4 strips	24 strips	Adhesive strips.	

* Provided this is within the expiration date of the kit.

D6050 contains sufficient materials to run an ELISA on one 96 well plate.

S6050 (SixPak) contains sufficient materials to run ELISAs on six 96 well plates.

This kit is also available in a PharmPak (R&D Systems, Catalog # PD6050). PharmPaks contain sufficient materials to run ELISAs on 50 microplates. Specific vial counts of each component may vary. Please refer to the literature accompanying your order for specific vial counts.

OTHER SUPPLIES REQUIRED

- Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm, with the correction wavelength set at 540 nm or 570 nm.
- Pipettes and pipette tips.
- Deionized or distilled water.
- 500 mL graduated cylinder.
- Squirt bottle, manifold dispenser, or automated microplate washer.
- Test tubes for dilution of standards.
- Human IL-6 Controls (optional; R&D Systems, Catalog # QC01-1).

PRECAUTIONS

Calibrator Diluent RD6F contains sodium azide which may react with lead and copper plumbing to form explosive metallic azides. Flush with large volumes of water during disposal.

The Stop Solution provided with this kit is an acid solution.

Some components in this kit contain a preservative which may cause an allergic skin reaction. Avoid breathing mist.

Color Reagent B may cause skin, eye, and respiratory irritation. Avoid breathing fumes.

Wear protective gloves, clothing, eye, and face protection. Wash hands thoroughly after handling. Please refer to the MSDS on our website prior to use

SAMPLE COLLECTION & STORAGE

The sample collection and storage conditions listed below are intended as general guidelines. Sample stability has not been evaluated.

Cell Culture Supernates - Remove particulates by centrifugation and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Serum - Use a serum separator tube (SST) and allow samples to clot for 30 minutes at room temperature before centrifugation for 15 minutes at 1000 x g. Remove serum and assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

Plasma - Collect plasma using EDTA, heparin, or citrate as an anticoagulant. Centrifuge for 15 minutes at 1000 x g within 30 minutes of collection. Assay immediately or aliquot and store samples at ≤ -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

REAGENT PREPARATION

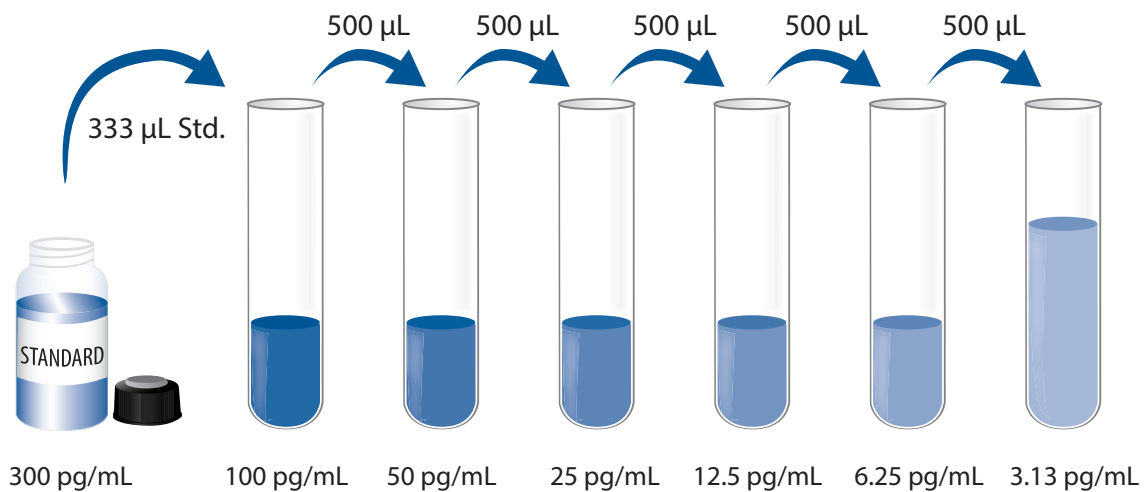
Bring all reagents to room temperature before use.

Wash Buffer - If crystals have formed in the concentrate, warm to room temperature and mix gently until the crystals have completely dissolved. Add 20 mL of Wash Buffer Concentrate to deionized or distilled water to prepare 500 mL of Wash Buffer.

Substrate Solution - Color Reagents A and B should be mixed together in equal volumes within 15 minutes of use. Protect from light. 200 μ L of the resultant mixture is required per well.

Human IL-6 Standard - **Refer to the vial label for reconstitution volume.** Reconstitute the Human IL-6 Standard with Calibrator Diluent RD5T (*for cell culture supernate samples*) or Calibrator Diluent RD6F (*for serum/plasma samples*). This reconstitution produces a stock solution of 300 pg/mL. Allow the standard to sit for a minimum of 15 minutes with gentle agitation prior to making dilutions.

Pipette 667 μ L of the appropriate Calibrator Diluent into the 100 pg/mL tube and 500 μ L of diluent into each remaining tube. Use the stock solution to produce a dilution series (below). Mix each tube thoroughly before the next transfer. The undiluted standard serves as the high standard (300 pg/mL). The appropriate Calibrator Diluent serves as the zero standard (0 pg/mL).



ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents and samples to room temperature before use. It is recommended that all standards, samples, and controls be assayed in duplicate.

1. Prepare all reagents and working standards as directed in the previous sections.
2. Remove excess microplate strips from the plate frame, return them to the foil pouch containing the desiccant pack, and reseal.
3. Add 100 μL of Assay Diluent RD1W to each well.
4. Add 100 μL of Standard, sample, or control per well. Cover with the adhesive strip provided. Incubate for 2 hours at room temperature. A plate layout is provided to record standards and samples assayed.
5. Aspirate each well and wash, repeating the process three times for a total of four washes. Wash by filling each well with Wash Buffer (400 μL) using a squirt bottle, manifold dispenser, or autowasher. Complete removal of liquid at each step is essential to good performance. After the last wash, remove any remaining Wash Buffer by aspirating or decanting. Invert the plate and blot it against clean paper towels.
6. Add 200 μL of Human IL-6 Conjugate to each well. Cover with a new adhesive strip. Incubate for 2 hours at room temperature.
7. Repeat the aspiration/wash as in step 5.
8. Add 200 μL of Substrate Solution to each well. Incubate for 20 minutes at room temperature. **Protect from light.**
9. Add 50 μL of Stop Solution to each well. The color in the wells should change from blue to yellow. If the color in the wells is green or the color change does not appear uniform, gently tap the plate to ensure thorough mixing.
10. Determine the optical density of each well within 30 minutes, using a microplate reader set to 450 nm. If wavelength correction is available, set to 540 nm or 570 nm. If wavelength correction is not available, subtract readings at 540 nm or 570 nm from the readings at 450 nm. This subtraction will correct for optical imperfections in the plate. Readings made directly at 450 nm without correction may be higher and less accurate.

CALCULATION OF RESULTS

Average the duplicate readings for each standard, control, and sample and subtract the average zero standard optical density (O.D.).

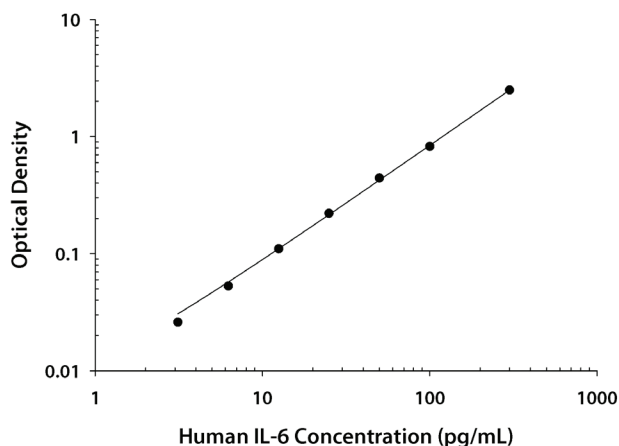
Create a standard curve by reducing the data using computer software capable of generating a four parameter logistic (4-PL) curve fit. As an alternative, construct a standard curve by plotting the mean absorbance for each standard on the y-axis against the concentration on the x-axis and draw a best fit curve through the points on the graph. The data may be linearized by plotting the log of the human IL-6 concentrations versus the log of the O.D. and the best fit line can be determined by regression analysis. This procedure will produce an adequate but less precise fit of the data.

If samples have been diluted, the concentration read from the standard curve must be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL DATA

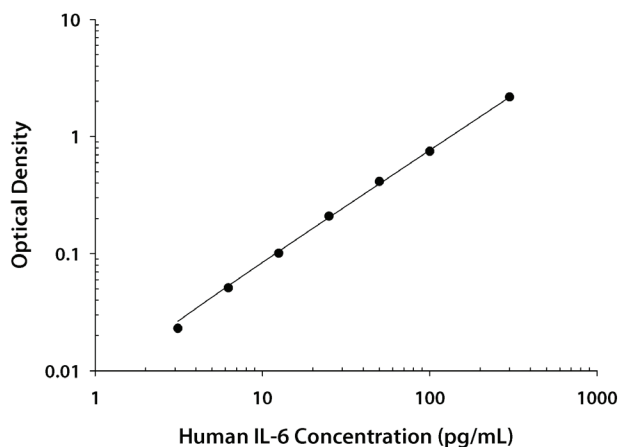
These standard curves are provided for demonstration only. A standard curve should be generated for each set of samples assayed.

CELL CULTURE SUPERNATE ASSAY



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.022 0.028	0.025	—
3.13	0.050 0.052	0.051	0.026
6.25	0.078 0.078	0.078	0.053
12.5	0.134 0.136	0.135	0.110
25	0.247 0.245	0.246	0.221
50	0.472 0.465	0.468	0.443
100	0.865 0.836	0.850	0.825
300	2.524 2.515	2.520	2.495

SERUM/PLASMA ASSAY



(pg/mL)	O.D.	Average	Corrected
0	0.025 0.029	0.027	—
3.13	0.049 0.051	0.050	0.023
6.25	0.078 0.077	0.078	0.051
12.5	0.127 0.129	0.128	0.101
25	0.236 0.236	0.236	0.209
50	0.438 0.442	0.440	0.413
100	0.780 0.773	0.776	0.749
300	2.176 2.221	2.198	2.171

PRECISION

Intra-assay Precision (Precision within an assay)

Three samples of known concentration were tested twenty times on one plate to assess intra-assay precision.

Inter-assay Precision (Precision between assays)

Three samples of known concentration were tested in twenty separate assays to assess inter-assay precision. Assays were performed by at least three technicians using two lots of components.

CELL CULTURE SUPERNATE ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	15.8	95.6	179	16.4	98.8	188
Standard deviation	0.7	3.0	3.1	0.6	2.5	3.7
CV (%)	4.4	3.1	1.7	3.7	2.5	2.0

SERUM/PLASMA ASSAY

Sample	Intra-Assay Precision			Inter-Assay Precision		
	1	2	3	1	2	3
n	20	20	20	20	20	20
Mean (pg/mL)	16.8	97.7	186	17.2	101	191
Standard deviation	0.7	1.6	3.8	1.1	3.3	7.2
CV (%)	4.2	1.6	2.0	6.4	3.3	3.8

RECOVERY

The recovery of human IL-6 spiked to three different levels in samples throughout the range of the assay in various matrices was evaluated.

Sample Type	Average % Recovery	Range
Cell culture media (n=5)	98	94-103%
Serum (n=5)	93	86- 99%
EDTA plasma (n=5)	95	84-101%
Heparin plasma (n=5)	90	88-98%
Citrate plasma (n=5)	91	82-95%

SENSITIVITY

The minimum detectable dose (MDD) of human IL-6 is typically less than 0.70 pg/mL.

The MDD was determined by adding two standard deviations to the mean optical density value of twenty zero standard replicates and calculating the corresponding concentration.

LINEARITY

To assess the linearity of the assay, samples were spiked with high concentrations of human IL-6 in various matrices and diluted with the appropriate Calibrator Diluent to produce samples with values within the dynamic range of the assay.

		Cell culture media (n=4)	Serum (n=4)	EDTA plasma (n=4)	Heparin plasma (n=4)	Citrate plasma (n=4)
1:2	Average % of Expected	99	97	101	103	101
	Range (%)	96-101	92-100	98-105	96-109	96-106
1:4	Average % of Expected	100	101	104	106	105
	Range (%)	93-110	93-107	97-110	97-113	101-109
1:8	Average % of Expected	96	102	100	104	106
	Range (%)	92-100	96-108	86-112	93-111	101-111
1:16	Average % of Expected	94	103	99	105	101
	Range (%)	83-108	93-111	90-110	99-107	90-114

CALIBRATION

This immunoassay is calibrated against highly purified *E. coli*-expressed recombinant human IL-6 produced at R&D Systems. The NIBSC/WHO 1st International Standard for IL-6 (89/548), which was intended as a potency standard, was evaluated in this kit. The NIBSC/WHO standard is a CHO cell-derived recombinant human IL-6.

The dose response curve of the International Standard (89/548) parallels the Quantikine standard curve. To convert sample values obtained with the Quantikine Human IL-6 kit to approximate NIBSC 89/548 units, use the equation below.

NIBSC (89/548) approximate value (IU/mL)=0.131 x Quantikine Human IL-6 value (pg/mL)

SAMPLE VALUES

Serum/Plasma - Forty serum and plasma samples from apparently healthy volunteers were evaluated for the presence of human IL-6 in this assay. Thirty-three samples measured less than the lowest standard, 3.13 pg/mL. Seven samples measured between 3.13 and 12.5 pg/mL. No medical histories were available for the donors used in this study.

Cell Culture Supernates - Human peripheral blood mononuclear cells (1×10^6 cells/mL) were cultured in RPMI supplemented with 10% fetal calf serum, 50 μ M β -mercaptoethanol, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin sulfate and stimulated for 1, 3, and 5 days with 10 μ g/mL PHA. Aliquots of the culture supernates were removed on days 1, 3, and 5 and assayed for levels of natural human IL-6. Results are listed in the following table.

Condition	Day 1 (pg/mL)	Day 3 (pg/mL)	Day 5 (pg/mL)
Unstimulated	575	311	660
Stimulated	17,130	17,520	16,340

SPECIFICITY

This assay recognizes natural and recombinant human IL-6.

The factors listed below were prepared at 50 ng/mL in Calibrator Diluent RD5T and at 100 ng/mL in Calibrator Diluent RD6F and assayed for cross-reactivity. Preparations of the following factors at 50 ng/mL in a mid-range rhIL-6 control prepared in Calibrator Diluent RD5T and 100 ng/mL in a mid-range IL-6 control prepared in Calibrator Diluent RD6F were assayed for interference. No significant cross-reactivity or interference was observed.

Recombinant human:

CNTF	IL-7
G-CSF	IL-8
GM-CSF	IL-11
sgp130	IL-12
IL-1 α	LIF
IL-1 β	LIF R
IL-2	OSM
IL-3	TNF- α
IL-4	TNF- β
IL-6 Ra	
IL-6 Ra/sgp130	

Recombinant mouse:

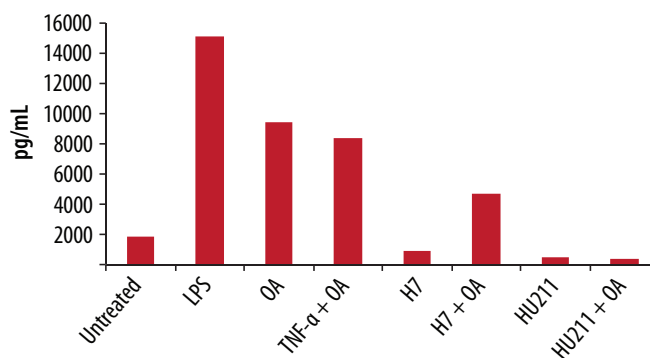
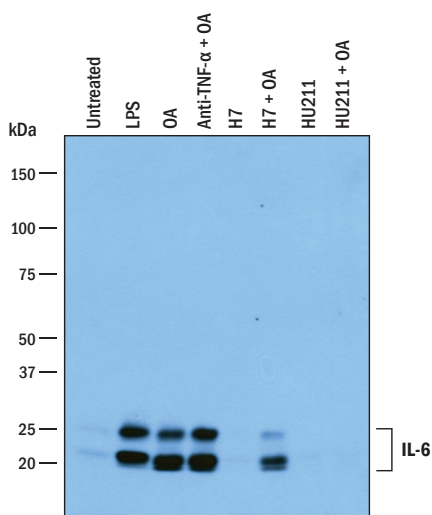
GM-CSF
IL-2
IL-3
IL-4
IL-5
IL-6
IL-7
IL-11
IL-12

Recombinant rat:

CNTF

Natural proteins:

bovine FGF acidic
bovine FGF basic
human PDGF
porcine PDGF
human TGF- β 1
porcine TGF- β 1.2
porcine TGF- β 2



Monocytes were prepared from human PBMCs by adherence to plastic. Adherent monocytes were washed, replated, and allowed to rest for 24 hours. Pretreatments were for 30 minutes: neutralizing anti-human TNF- α (R&D Systems, Catalog # MAB610) at 5 μ g/mL, H7 serine kinase inhibitor (Tocris, Catalog # 0542) at 10 μ M, or HU211 NF κ B inhibitor (Tocris, Catalog # 2861) at 10 μ M. Following the pretreatment, 500 ng/mL LPS or 30 ng/mL okadaic acid (OA, Tocris, Catalog # 1136) was added for 20 hours as indicated. Conditioned media was tested in the Quantikine ELISA, resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, and immunoblotted with the detection antibody used in this kit. The immunoprecipitation/Western blot shows direct correlation with the ELISA value for these samples.

REFERENCES

1. Mansell, A. and B.J. Jenkins (2013) Cytokine Growth Factor Rev. **24**:249.
2. Schuett, H. *et al.* (2009) Thromb. Haemost. **102**:215.
3. Erta, M. *et al.* (2012) Int. J. Biol. Sci. **8**:1254.
4. Garbers, C. *et al.* (2012) Cytokine Growth Factor Rev. **23**:85.
5. Mihara, M. *et al.* (2012) Clin. Sci. (Lond.) **122**:143.
6. Hirano, T. *et al.* (1986) Nature **324**:73.
7. Kestler, D.P. *et al.* (1995) Blood **86**:4559.
8. Kestler, D.P. *et al.* (1999) Am. J. Hematol. **61**:169.
9. Bihl, M.P. *et al.* (2002) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **27**:48.
10. Alberti, L. *et al.* (2005) Cancer Res. **65**:2.
11. May, L.T. *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**:8957.
12. Sad, S. *et al.* (1995) Immunity **2**:271.
13. Cichy, J. *et al.* (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. **227**:318.
14. Miyazawa, K. *et al.* (1998) Am. J. Pathol. **152**:793.
15. Fried, S.K. *et al.* (1998) Endocrinology **83**:847.
16. Ishimi, Y. *et al.* (1990) J. Immunol. **145**:3297.
17. Jiang, S. *et al.* (1994) Blood **84**:4151.
18. Xin, X. *et al.* (1995) Endocrinology **136**:132.
19. Marz, P. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:3251.
20. Ringheim, G.E. *et al.* (1995) J. Neuroimmunol. **63**:113.
21. Gadiant, R.A. *et al.* (1995) Neurosci. Lett. **194**:17.
22. Kuppner, M.C. *et al.* (1995) Immunology **84**:265.
23. Gagari, E. *et al.* (1997) Blood **89**:2654.
24. Cumberbatch, M. *et al.* (1996) Immunology **87**:513.
25. Fujisawa, H. *et al.* (1997) J. Interferon Cytokine Res. **17**:347.
26. Lee, S.C. *et al.* (1993) J. Immunol. **150**:2659.
27. Lafortune, L. *et al.* (1996) J. Neuropathol. Exp. Neurol. **55**:515.
28. Ericson, S.G. *et al.* (1998) Blood **91**:2099.
29. Melani, C. *et al.* (1993) Blood **81**:2744.
30. Lacy, P. *et al.* (1998) Blood **91**:2508.
31. Jung, H.C. *et al.* (1995) J. Clin. Invest. **95**:55.
32. Spencer, N.F.L. and R.A. Daynes (1997) Int. Immunol. **9**:745.
33. Campbell, I.L. *et al.* (1989) J. Immunol. **143**:1188.
34. D'Auria, L. *et al.* (1997) Eur. Cytokine Netw. **8**:383.
35. Yamamura, M. *et al.* (1998) Br. J. Haematol. **100**:129.
36. Angstwurm, M.W.A. *et al.* (1997) Cytokine **9**:370.
37. Mouawad, R. *et al.* (1996) Clin. Cancer Res. **2**:1405.
38. Sakamoto, K. *et al.* (1994) Cytokine **6**:181.
39. Murakami, M. *et al.* (1993) Science **260**:1808.
40. Muller-Newen, G. (2003) Sci. STKE **2003**:PE40.
41. Mitsuyama, K. *et al.* (2006) Clin. Exp. Immunol. **143**:125.
42. Cerutti, A. *et al.* (1998) J. Immunol. **160**:2145.

PLATE LAYOUT

Use this plate layout to record standards and samples assayed.

A 12x8 plate layout grid for recording assay results. The grid consists of 12 rows and 8 columns. The rows are numbered 1 through 12 on the left side, and the columns are labeled A through H at the bottom. The grid is designed for recording standards and samples assayed.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								

NOTES

NOTES

Human BD-2
ELISA Development Kit
900-K172 Lot# 0512172
Expiration one year from date of receipt

Description: Human BD-2 ELISA development kit contains the key components required for the quantitative measurement of natural and/or recombinant hBD-2 in a sandwich ELISA format within the range of 16–2000pg/ml. Using the ELISA protocol described below, the recommended microplates, reagents and solutions, the components supplied in this kit are sufficient to assay hBD-2 in approximately 1000 ELISA plate wells.

RECONSTITUTION & STORAGE

Capture Antibody: 50µg of antigen-affinity purified goat anti-hBD-2 + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 0.5ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Detection Antibody: 50µg of biotinylated antigen-affinity purified goat anti-hBD-2 + 2.5mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 0.5ml sterile water for a concentration of 100µg/ml.

Human BD-2 Standard: 1µg of recombinant hBD-2 + 2.2mg BSA + 11.0mg D-mannitol. Centrifuge vial prior to opening. Reconstitute in 1ml sterile water for a concentration of 1µg/ml.

Note: The reconstituted components are stable for 2 weeks when stored at 2–8°C. Components that have been reconstituted and aliquoted can be stored at –20°C for up to 6 months.

Avidin-HRP Conjugate: 60µl vial. Upon receipt, avidin-HRP conjugate should be aliquoted into ten 6µl vials and stored at ≤–20°C. Aliquots stored frozen at ≤–20°C are stable for up to 2 years from date of receipt. Avoid more than one freeze-thaw cycle. **Avidin should be used in conjunction with ABTS only.**

RECOMMENDED MATERIALS (or purchase PeptoTech's ELISA Buffer Kit: Cat. # 900-K00)

ELISA microplates (Nunc MaxiSorp Prod. # 439454, or Corning Prod # 3590);
Tween-20 (Sigma Cat. # P-7949);
BSA (Sigma Cat # A-7030);
ABTS Liquid Substrate Solution (Sigma Cat. # A3219);
Dulbecco's PBS [10x] (Gibco BRL Cat. # 14200-075).

RECOMMENDED SOLUTIONS

All solutions should be at ambient temperature prior to use.

PBS: dilute 10xPBS to 1xPBS, pH 7.20 in sterile water.

Wash Buffer: 0.05% Tween-20 in PBS

Block Buffer: 1% BSA in PBS *

Diluent: 0.05% Tween-20, 0.1% BSA in PBS *

*** Sterile filter and store at 4°C for up to 1 week.**

PLATE PREPARATION

1. Dilute capture antibody with PBS to a concentration of 0.5µg/ml. Immediately, add 100µl to each ELISA plate well. Seal the plate and incubate overnight at room temperature.
2. Aspirate the wells to remove liquid and wash the plate 4 times using 300µl of wash buffer per well.

- After the last wash invert plate to remove residual buffer and blot on paper towel.
3. Add 300µl block buffer to each well. Incubate for at least 1 hour at room temperature.
 4. Aspirate and wash plate 4 times.

ELISA PROTOCOL

Standard/Sample: Dilute standard from 2ng/ml to zero in diluent. Immediately add 100µl of standard or sample to each well in triplicate. Incubate at room temperature for at least 2 hours.

Detection: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute detection antibody in diluent to a concentration of 0.5µg/ml. Add 100µl per well. Incubate at room temperature for 2 hours.

Avidin Peroxidase: Aspirate and wash plate 4 times. Dilute one 5.5µl aliquot of Avidin Peroxidase 1:2000 in diluent for total volume of 11ml. Add 100µl per well. Incubate 30 minutes at room temperature.

ABTS Liquid Substrate:

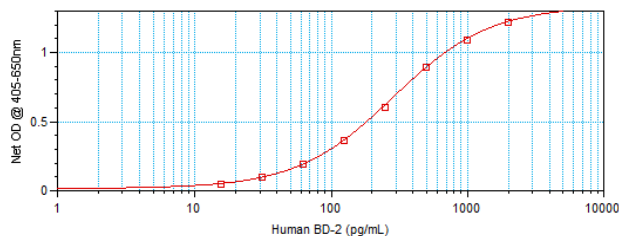
(ABTS Substrate should be at ambient temperature prior to use)
Aspirate and wash plate 4 times. Add 100µl of substrate solution to each well. Incubate at room temperature for color development. Monitor color development with an ELISA plate reader at 405 nm with wavelength correction set at 650 nm.

NOTE: Reliable standard curves are obtained when either O.D. readings do not exceed 0.2 units for the zero standard concentrations, or 1.2 units for the highest standard concentration. The plate should be monitored at 5-minute intervals for approximately 20 minutes.

CROSS REACTIVITY

When tested at 50ng/ml the following antigens did not exhibit significant cross reactivity:

Human BD-1 (36a.a.), BD-1 (47a.a.), BD-3, BD-4, NP-1



Publication

α -tocopherol decreases interleukin-1 β and -6 and increases human β -defensin-1 and -2 secretion in human gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide

A. Derradjia^{1,2}, H. Alanazi¹,
H. J. Park¹, R. Djeribi²,
A. Semlali³, M. Rouabhia¹

¹Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Québec, QC, Canada, ²Groupe de Recherche sur les Biofilms et la Biocontamination des Matériaux, Faculté des Sciences, Université d'Annaba, Annaba, Algeria and ³Department of Biochemistry, College of Science, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia

Derradjia A, Alanazi H, Park HJ, Djeribi R, Semlali A, Rouabhia M. α -tocopherol decreases interleukin-1 β and -6 and increases human β -defensin-1 and -2 secretion in human gingival fibroblasts stimulated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. J Periodont Res 2015; doi: 10.1111/jre.12308. © 2015 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Background and Objective: Periodontitis, a disease associated with chronic inflammation, results in significant destruction of periodontal tissues. Uncontrolled, periodontal disease negatively affects general patient health. We sought to evaluate the effect of α -tocopherol on gingival fibroblast behavior following exposure to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (LPS).

Material and Methods: Primary human gingival fibroblasts were cultured for 24 and 48 h with α -tocopherol at various concentrations (0, 50, 100 and 200 μ M) in the presence or absence of 1 μ g/mL of LPS. At the end of each time point, cell adhesion and growth were evaluated by means of optical microscope observations and MTT assay. The secretion levels of cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-6 and human β -defensins 1 and 2 were measured by specific enzyme-linked immunosorbent assay. Finally, an *in vitro* scratch wound assay was performed to investigate the effect of α -tocopherol on fibroblast migration.

Results: α -tocopherol alone had no adverse effect on cell adhesion and morphology. Fibroblast proliferation increased in the presence of α -tocopherol with and without LPS. α -tocopherol alone had no effect on inflammatory cytokine (IL-1 β and IL-6) secretion. Interestingly, following cell exposure to *P. gingivalis* LPS, α -tocopherol significantly ($p < 0.01$) decreased the secretion of these two cytokines and increased human β -defensin-1 and -2 secretion. Finally, α -tocopherol increased the healing rate of the gingival fibroblasts from 12 h up to 48 h.

Conclusion: These results suggest that α -tocopherol may play an active role in countering the damaging effect of LPS by reducing inflammatory cytokines, increasing β -defensins and promoting fibroblast growth, migration and wound healing.

Professor Mahmoud Rouabhia, PhD, Groupe de Recherche en Écologie Buccale, Faculté de Médecine Dentaire, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada
Tel: +418 656 2131 ext. 16321
Fax: +418 656 2861
e-mail: mahmoud.rouabhia@fmd.ulaval.ca

Key words: cytokines; gingival fibroblasts; lipopolysaccharide; wound healing; α -tocopherol; β -defensins

Accepted for publication June 9, 2015

Periodontitis, a chronic infectious disease that leads to tissue destruction and possible tooth loss, is in fact a host-mediated inflammatory response to pathogenic microflora residing in periodontal pockets (1,2). Bacterial species associated with periodontitis include *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (2–5). Pathogenicity of *P. gingivalis* involves different virulence factors, including fimbriae, capsule polysaccharide, cysteine proteases and lipopolysaccharide (LPS) (6). Various cells in the periodontium, such as periodontal ligament fibroblasts, gingival fibroblasts and gingival epithelial cells, are involved in the host immune response in periodontitis (7–9). These cells are involved in homeostasis of periodontal ligament and alveolar bone remodeling (10). In periodontitis, gingival fibroblasts may be involved in regulating the inflammatory response against such oral pathogens as *P. gingivalis* and their virulence factors, such as LPS (11,12). These virulence factors are involved in tissue colonization and can alter host defenses (13). Both *P. gingivalis* and its LPS are potent stimulators of the host's inflammatory immune response (2,14). This activation of the innate defense system involves cellular receptors that bind conserved structures of microbial origin (15). One important class of gingival cell receptors that recognize pathogen-associated molecular patterns is the family of Toll-like receptors (16). Following bacteria or LPS recognition, cells produce proinflammatory cytokines, such as interleukin (IL)-6 and IL-8 (17), which are involved in periodontal inflammatory response. High levels of interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and IL-8 following *P. gingivalis* LPS stimulation were incriminated in alveolar bone resorption and periodontal tissue destruction (1,2,18).

Controlling infection and reducing the inflammatory process both contribute to reducing periodontal disease (19). Antibiotics such as amoxicillin or metronidazole are available to cure infections (20,21), while antioxidants are shown to prevent them (22,23).

Vitamin E, a potent antioxidant, acts mainly on the lipid phase of cells to counter the oxidation of polyunsaturated fatty acids (24) and is thus important to the host's antioxidant defense and immune functions (22). It is well known that vitamin E deficiency is associated with increased oxidative stress (24) as well as impaired immune function, including both humoral and cell-mediated immunity (22). Using an animal model, it was demonstrated that vitamin E could play a key role in enhancing host protection against *Heligmosomoides polygyrus* (25). Vitamin E was also shown to decrease bacterial adhesion and biofilm accumulation on the surface of vitamin E-blended polymers (26). These data highlight the potential of vitamin E against periodontal bacteria and such virulence factors as LPS. The aim of the present study was thus to investigate the effect of vitamin E on gingival fibroblast growth, cytokine (IL-1 β and IL-6) and antimicrobial peptide (human β -defensin [HBD]-1 and HBD-2) secretions, and cell migration/healing properties following exposure to *P. gingivalis* LPS.

Experimental design

Human gingival fibroblast extraction and culture

Small samples of human gingival mucosa were collected from patients attending the dental clinic at Université Laval's Faculty of Dentistry for treatment. The patients provided free informed consent and the institution's Ethics Committee approved the procedure. Immediately following the biopsies, the epithelium was separated from the lamina propria by thermolysin treatment (500 μ g/mL). Gingival fibroblasts were extracted from the lamina propria using 0.125 U/mL of collagenase-P (Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada). These fibroblasts were then cultivated in 5% fetal calf serum supplemented with Dulbecco's modified Eagle medium. When the cultures reached 90% confluence, the cells were detached and used for the study.

Preparation of lipopolysaccharide from *P. gingivalis*

LPS was isolated from *P. gingivalis* (ATCC 33277) using the Darveau-Hancock method (1983) (27), which centers on the protein digestion of a whole cell extract by proteinase K with successive solubilization and precipitation steps. The LPS preparation was then freeze-dried and stored at -20°C until use. The absence of contaminating protein in the preparation was confirmed by a protein assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) with bovine serum albumin used as the control. The LPS was subsequently used at a concentration of 1 μ g/mL throughout the study.

Tocopherol preparation

α -tocopherol purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada) was dissolved in ethanol as 50 mM stock solutions and used thereafter at various concentrations (50, 100 or 200 μ M) for the purpose of this study. The culture medium of the control groups and α -tocopherol groups was supplemented with the same volume of ethanol.

Effect of α -tocopherol with or without lipopolysaccharide on gingival cell morphology

Primary human gingival fibroblasts were first seeded into six-well tissue culture plates (Falcon; Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ, USA) at 2×10^4 cells/well and subsequently incubated in a 5% CO_2 atmosphere at 37°C for 24 h. They were then stimulated or not with α -tocopherol (50, 100 or 200 μ M) in the presence or absence of 1 μ g/mL of *P. gingivalis* LPS. LPS is a component of gram-negative bacteria known as a potent inducer of the immune response by various cell types (28). LPS from *P. gingivalis* is strongly associated with chronic and severe adult periodontitis (2,6). The fibroblasts in the presence or absence of α -tocopherol with or without LPS were then cultured for 24 and 48 h. At the end of each incubation period, the stimulated

and non-stimulated fibroblast monolayers were washed three times with phosphate-buffered saline and subjected thereafter to crystal violet staining. One milliliter of 1% w/v crystal violet solution in demineralized water was added and the cultures were further incubated at room temperature for 15 min, after which time the non-bound dye was removed from the wells by thorough washing with demineralized water, followed by drying at 37°C. The stained cells were then observed under an inverted microscope and photographed.

Effect of α -tocopherol with or without lipopolysaccharide on gingival fibroblast growth

Fibroblasts were cultured in the presence or absence α -tocopherol at 50, 100 or 200 μ M with or without 1 μ g/mL of *P. gingivalis* LPS for 24 and 48 h. Cell proliferation was assessed following each culture period using the assay 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA), which measures cell growth as a function of mitochondrial activity (29). MTT assay is based on hydrolysis of the tetrazolium ring by mitochondrial dehydrogenase, resulting in an insoluble blue reaction product (formazan). Briefly, a stock solution (5 mg/mL) of MTT was prepared in phosphate-buffered saline and added to each culture well at a final concentration of 1% (v/v). Gingival fibroblast cultures were incubated for 4 h at 37°C with the MTT, after which time the supernatant was removed, and the adherent cells were washed twice with warm culture medium. Following the final wash, 2 mL of 0.04 N HCl in isopropanol were added to each culture well, with the incubation extended for another 15 min. At this step, 200 μ L (in triplicate) of the reaction mixture was transferred to a 96-well flat-bottom plate and the absorbance (optical density) was measured at 550 nm by means of a microplate reader (Model 680; Bio-Rad Laboratories). Results are reported as the means \pm SD of six separate experiments.

Cytokine and β -defensin quantification following fibroblast stimulation with α -tocopherol with or without lipopolysaccharide

Human gingival fibroblasts were cultured for 48 h in the presence or absence of α -tocopherol at 50, 100 or 200 μ M, with or without 1 μ g/mL of *P. gingivalis* LPS. The supernatant from each condition was then collected to determine IL-1 β , IL-6, HBD-1 and HBD-2 levels. The cytokine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) while the β -defensin ELISA kits were obtained from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA). The supernatants were first collected in tubes containing 1 μ L of a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Canada Ltd.), immediately filtered through 0.22 μ m filters, and used thereafter to measure the mediator levels by ELISA assay. The mediator levels were read at 450 nm by means of a microplate reader (Model 680; Bio-Rad Laboratories). The minimum detectable concentrations were less

than 1 pg/mL for IL-1 β , 0.7 pg/mL for IL-6, 4 pg/mL for HBD-1 and 16 pg/mL for HBD-2, as reported by the manufacturer. Each experiment was repeated four times and the means \pm SD were calculated and presented as the levels of cytokines or β -defensins per mg of total protein extracted from the same cell cultures. Indeed, following supernatant collection, the adherent cells were first detached from the culture plate using trypsin then centrifuged for 10 min at 270 g, after which time the pellet was resuspended in 300 μ L of cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA), incubated 5 min at 4°C, and subsequently spun out for 10 min in a cold microfuge. The collected supernatant was used to quantify the total protein concentration using the Bradford assay (30).

Effect of α -tocopherol with or without lipopolysaccharide on fibroblast monolayer wound repair

In vitro wound repair assays were performed as previously described (31).

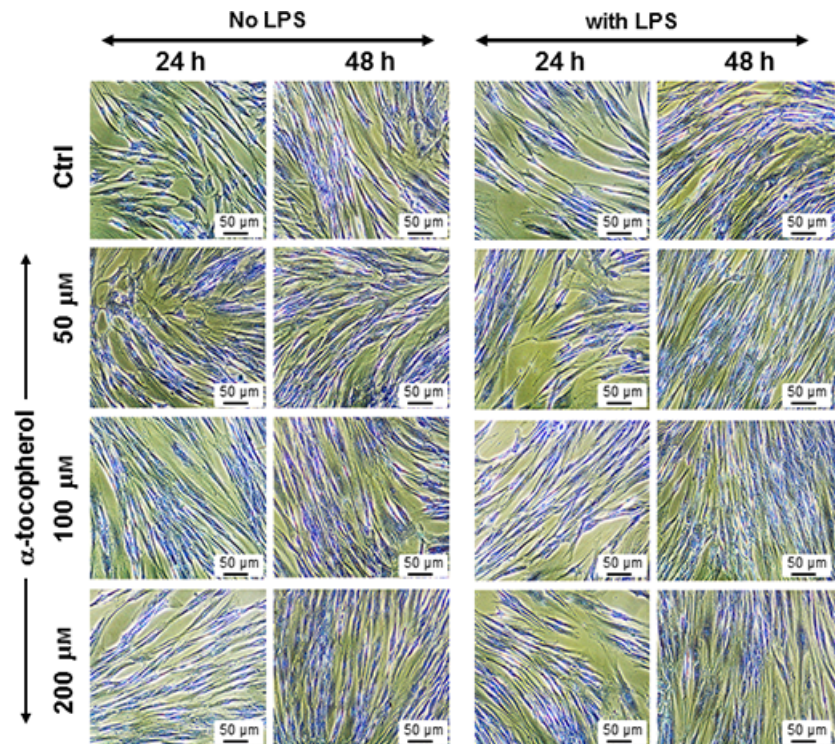


Fig. 1. Effect of α -tocopherol on gingival fibroblast morphology. Following stimulation or not with α -tocopherol with or without LPS, the cells were stained with crystal violet. Photos were taken under an inverted microscope. Scale bars, 50 μ m. LPS, lipopolysaccharide.

Briefly, gingival fibroblasts were cultured in the presence or absence of α -tocopherol at various concentrations (0, 50, 100 or 200 μM) with or without LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) until confluence. A scratch (wound) was created on each confluent monolayer using a 200 μL sterile pipette tip (PipetTipFinder, Knoxville, TN, USA) perpendicular to the bottom of the dish. The generated wound was approximately between 0.44 and 0.50 mm in width. The cultures were refreshed with new medium and maintained under incubation. Digital photographs of each wound were taken (Coolpix 950; Nikon Canada, Montréal, QC, Canada) at various time points following the creation of the wound, and the obtained images were used to measure the denuded area by means of the NIH ImageJ public domain image processing program. The experiment was repeated six times independently for statistical analyses. Data are presented as the percentage of the healed wound area at 12, 24 and 48 h divided by the area at time zero (initial wound).

Statistical analysis

Data are presented as the means \pm SD of at least four separate experiments. A statistical comparison of the groups was performed using a one-way ANOVA and the statistical difference between two groups was determined by means of the Student's *t*-test. The difference was considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Fibroblast adhesion and morphology following stimulation with α -tocopherol with or without lipopolysaccharide

Various α -tocopherol concentrations were used to treat fibroblast cultures for 24 and 48 h to determine the effect of this molecule on gingival fibroblast attachment and morphology. As shown in Fig. 1, α -tocopherol had no effect on cell adhesion and morphology up to a concentration of 200 μM ; the fibroblasts were elon-

gated, with a dense nucleus and a small amount of cytoplasm. In the presence of *P. gingivalis* LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), α -tocopherol also had no adverse effect on cell adhesion and morphology (Fig. 1).

Fibroblast growth following stimulation with α -tocopherol with or without lipopolysaccharide

Quantitative analyses by MTT assay reveal that after stimulation for 24 h, α -tocopherol had no effect on cell adhesion/growth (Fig. 2A), while at 48 h, α -tocopherol significantly ($p < 0.01$) promoted cell growth (Fig. 2A). The addition of LPS alone to the gingival fibroblast culture led to cell growth at 24 and 48 h (Fig. 2B). *P. gingivalis* LPS combined

with α -tocopherol promoted greater cell growth than did *P. gingivalis* LPS alone. No difference was observed with higher concentrations of α -tocopherol (Fig. 2B).

α -tocopherol modulated the secretion of proinflammatory cytokines (interleukin-1 β and -6) by primary gingival fibroblasts

As shown in Fig. 3, following gingival fibroblast stimulation with α -tocopherol for 48 h, IL-1 β secretion remained unchanged, compared to that observed in the control (Fig. 3A). However, the addition of *P. gingivalis* LPS to the culture led to a significant ($p < 0.02$) increase in IL-1 β secretion. Interestingly, α -tocopherol was able to downregulate the effect of LPS on

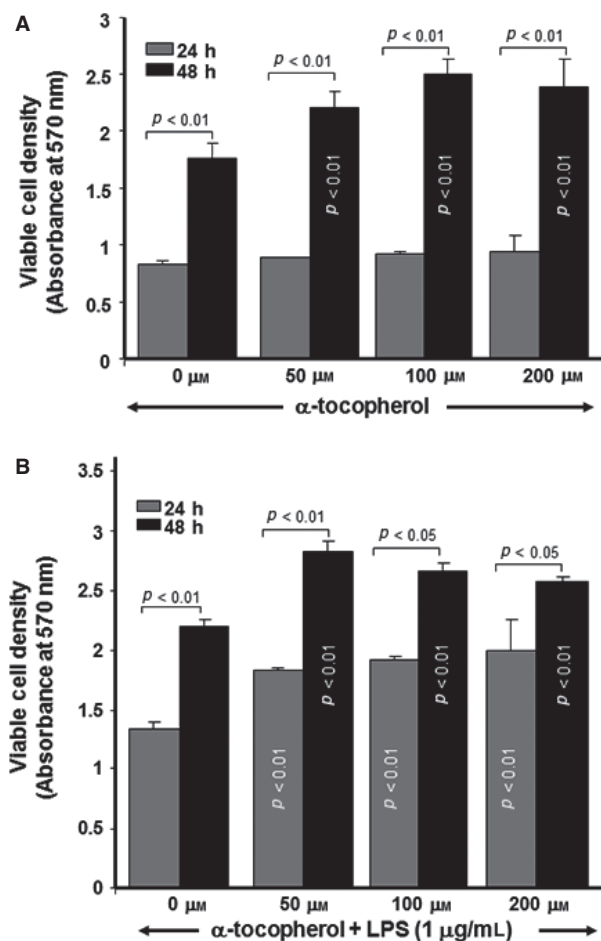


Fig. 2. α -tocopherol with or without LPS modulated gingival fibroblast growth. Cell growth stimulated or not with α -tocopherol (A) or with α -tocopherol and LPS (B) was investigated using MTT. Statistical significance was obtained by comparing the data collected in the presence or absence of α -tocopherol with or without LPS ($n = 4$). LPS, lipopolysaccharide.

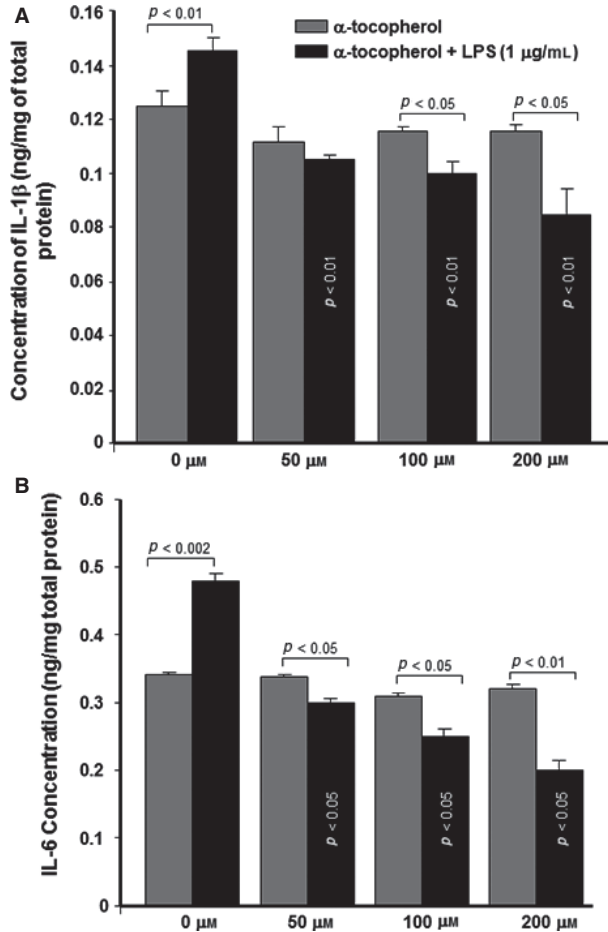


Fig. 3. IL-1 β and IL-6 secretion by gingival fibroblasts following stimulation with α -tocopherol alone or with LPS. Cytokine levels in the culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Significance was obtained by comparing the absence (control) and the presence of α -tocopherol in the culture with or without LPS ($n = 5$). IL, interleukin; LPS, lipopolysaccharide.

IL-1 β secretion. Figure 3A shows low levels of IL-1 β secreted by the cells cultured in the presence of α -tocopherol and LPS, compared to those stimulated with LPS alone. Similar observations were made with IL-6. Figure 3B shows no visible effect of α -tocopherol on IL-6 secretion by the gingival fibroblasts, whereas the cells stimulated with LPS showed increased levels of IL-6. This was significantly ($p < 0.05$) downregulated by α -tocopherol.

α -tocopherol increased human β -defensin-1 and -2 secretion by primary gingival fibroblasts

As shown in Fig. 4A, when primary gingival fibroblasts were cultured for

48 h in the presence of α -tocopherol, the HBD-1 secretion level did not change. In contrast, the addition of LPS to the cell cultures led to a significant increase in HBD-1 secretion. Of interest is that higher levels of secreted HBD-1 were observed when the cells were stimulated with both LPS and α -tocopherol, compared to LPS alone. HBD-2 secretion was also modulated by α -tocopherol. The addition of α -tocopherol to primary human gingival cultures led to a significant ($p < 0.01$) increase in HBD-2 secretion, compared to that observed in the non-stimulated cultures

(Fig. 4B). The effect of α -tocopherol on HBD-2 secretion was greater at 100 and 200 μ M than at 50 μ M. Cells stimulated with LPS alone were shown to secrete higher levels of HBD-2, in contrast to the control. The effect of LPS on HBD-2 secretion was thus upregulated by α -tocopherol. Figure 4B shows higher HBD-2 levels secreted by cells stimulated with LPS and α -tocopherol than by those stimulated with either α -tocopherol alone or LPS alone.

α -tocopherol enhanced cell migration/wound healing

Figure 5 shows α -tocopherol-modulated fibroblast migration as ascertained by the reduced wound area in the α -tocopherol-treated cultures compared to the non-treated scratched monolayer cultures. The effect of α -tocopherol on cell migration was noticeable beginning at 12 h post-wound and treatment (Fig. 5A). The effects were indeed significant with 100 and 200 μ M of α -tocopherol (Fig. 5B). LPS alone did not inhibit or promote cell migration. However, the presence of α -tocopherol in the LPS-stimulated cultures resulted in superior cell migration and wound repair (Fig. 5B). Comparable results were obtained at 24 h post-wound. α -tocopherol alone promoted cell migration to repair the wound (Fig. 5C and 5D), beginning with 50 μ M. The presence of LPS alone resulted in significant cell migration at 24 h compared to what was observed in the controls (absence of LPS). This effect was thus upregulated by α -tocopherol. Interestingly, the higher the concentration of α -tocopherol, the greater the wound repair (Fig. 5C). At 48 h, almost the entire wounded area was repaired (Fig. 5D).

Discussion

In this study, we demonstrated that α -tocopherol had no significant effect on gingival fibroblast adhesion and growth during the short culture period and increased cell growth during the longer culture period. This concurs with previous reports stating that

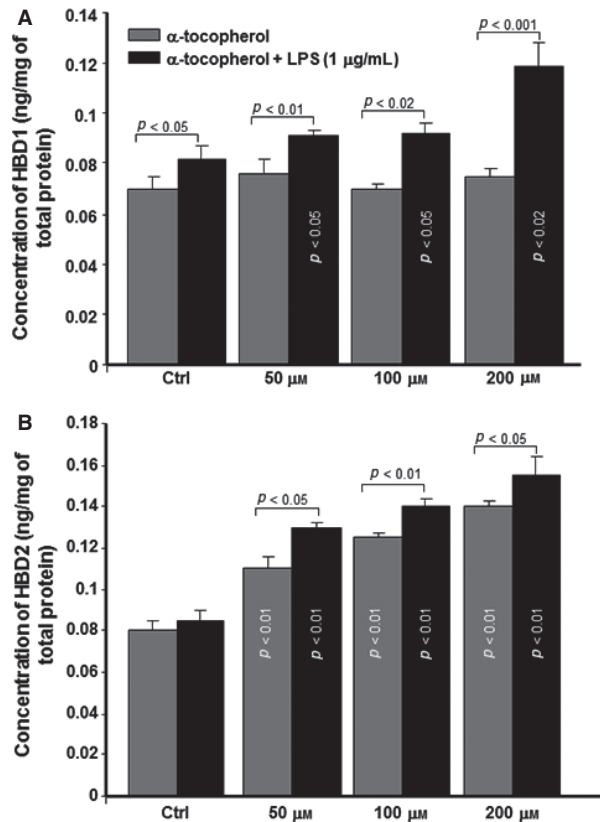


Fig. 4. HBD-1 and HBD-2 secretion by gingival fibroblasts following stimulation with α -tocopherol alone or with LPS. β -defensin levels in the culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Significance was obtained by comparing the absence (control) and the presence of α -tocopherol in the culture with or without LPS ($n = 6$). HBD, human β -defensin; LPS, lipopolysaccharide.

α -tocopherol enhanced the proliferation of cultured endothelial cells (32). However, with other cell types such as human aorta smooth muscle, mouse fibroblasts or cancer cells, α -tocopherol was shown to inhibit cell growth (33,34). The exact reason for this heterogeneity remains rather unclear; the different effects of α -tocopherol on cell proliferation may plausibly be due to cell type. Further standardized studies with various cell types will be required to confirm this hypothesis.

Oral cells are exposed to multiple bacteria and bacterial virulence products, such as LPS, which lead to altered cell properties and functions. *P. gingivalis* LPS was reported to increase human periodontal ligament fibroblast growth (35). This supports our study showing higher gingival fibroblast growth following stimulation with *P. gingivalis* LPS. This over-

growth may be a common cell behavior in response to endotoxin stimulation (36) or possibly a cell-specific behavior against the harmful effect of *P. gingivalis* or its virulence factors, thereby preventing periodontal disease (37). Interestingly, cell growth was promoted by α -tocopherol, which suggests that this molecule may play a preventive role against periodontal disease.

Infections are promoters of proinflammatory mediator secretion by infected cells (38). In the oral cavity, gingival fibroblasts are the main constituent of the periodontium and are key players against infection by producing various proinflammatory cytokines in response to direct contact with periodontal bacteria or their virulence factors, such as LPS (39). We demonstrated increased IL-1 β and IL-6 secretion by gingival fibroblasts following stimulation with *P. gingivalis*

LPS, as previously reported with *Escherichia coli* LPS and *P. gingivalis* LPS (39,40). Proinflammatory cytokine release can be viewed as a protection process by gingival fibroblasts to fight infection (41). However, multiple studies have reported that increased proinflammatory cytokine secretion may contribute to the progression of periodontal disease (2,42). Downregulating the secretion of proinflammatory mediator may thus be beneficial to the host. This process can occur with the contribution of α -tocopherol. We clearly demonstrated that the presence of α -tocopherol simultaneously with *P. gingivalis* LPS significantly decreased IL-1 β and IL-6 secretion by primary gingival fibroblasts. The role of α -tocopherol against the deleterious effects of LPS has been the subject of *in vitro* and *in vivo* studies showing that this vitamin suppresses the inflammatory response and oxidative damage induced by LPS in both cell culture systems and animal experiments (43,44). α -tocopherol was also shown to prevent interferon- γ /LPS-induced dopaminergic neuron degeneration effectively (45) and downregulate LPS-induced lipid peroxidation and IL-6 in murine microglia and brain cells (46). Furthermore, α -tocopherol was found to promote recovery from LPS-induced infection in aged mice (47). These findings and our results therefore highlight the potential of α -tocopherol in the prevention of microbial infections.

Preventing or curing microbial infection can be achieved with chemical antimicrobial molecules, such as antibiotics, but also through the secretion of antimicrobial peptides on host cells (48). The antimicrobial peptide family includes multiple molecules such as HBDs. We thus demonstrated for the first time that primary human gingival fibroblasts secreted HBD-1 and HBD-2 by antimicrobial peptides and that this secretion did not increase following stimulation with α -tocopherol. In contrast, however, *P. gingivalis* LPS alone or in combination with α -tocopherol led to an increase in HBD-1 and HBD-2 secretion by these fibroblasts. HBD-1 has been shown to target a variety of bacteria, including

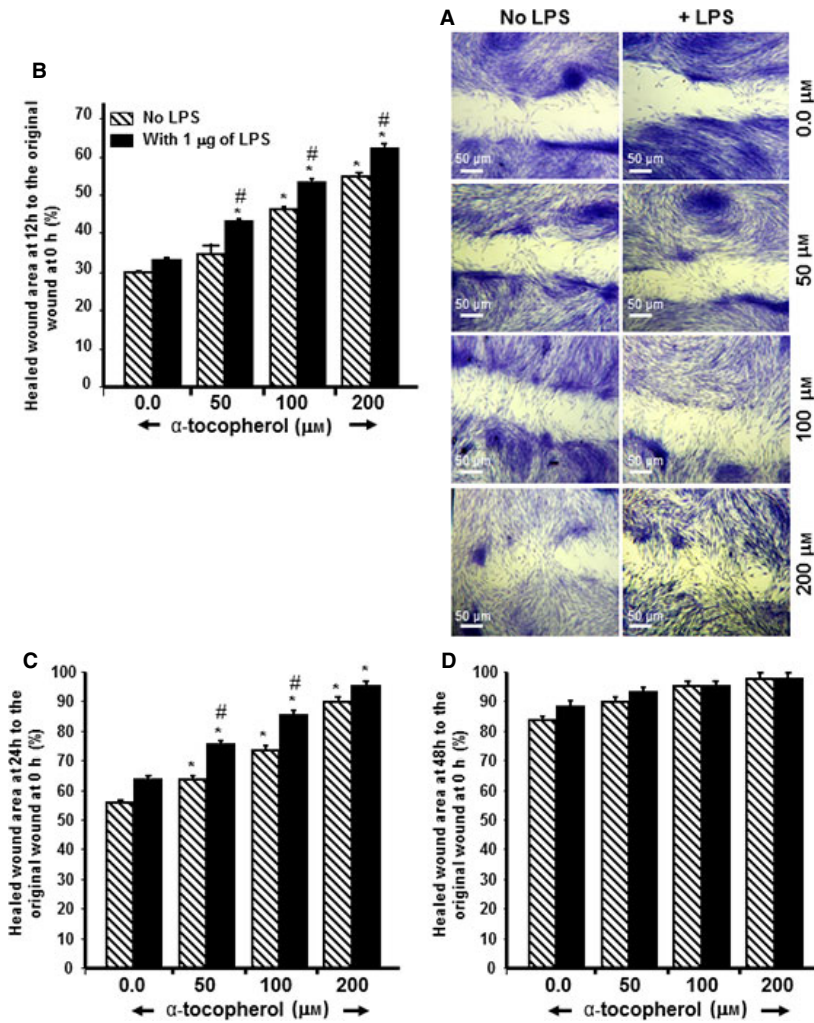


Fig. 5. α -tocopherol with or without LPS increased the wound healing rate in the primary human dermal fibroblast monolayer. Following stimulation and wounding, the percentage changes in wound size (area) over time are presented as the ratio to the initial wound size (time zero after wound). Values are given as means \pm SD ($n = 6$). The stimulated and non-stimulated cultures were compared, with the difference considered statistically significant at $p < 0.05$. (A) Wound healing after 12 h (Scale bars, 50 μ m). (B) Wound healing after 12 h. (C) Wound healing after 24 h. (D) Wound healing after 48 h. *Statistical significance between the control (0.0 μ m of α -tocopherol) and the α -tocopherol-stimulated group. #Statistical significance between the different concentrations of α -tocopherol and the presence or absence of LPS. LPS, lipopolysaccharide.

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans* and *Fusobacterium nucleatum* (49), while HBD-2 is reported active against gram-negative bacteria and *Candida albicans* but more restricted in its activity against gram-positive bacteria (50,51). This may explain the increased levels of HBD-1 and HBD-2 under *P. gingivalis* LPS stimulation and the observed upregulated activity when α -tocopherol was added to the fibroblast cultures. Our study suggests that the cells activated their defense

mechanism against LPS by producing HBD-1 and -2, which was promoted by α -tocopherol. Overall data thus suggest that α -tocopherol may modulate inflammatory reactions and tissue destruction by reducing proinflammatory cytokines and increasing antimicrobial peptides HBD-1 and HBD-2. Further studies are mandatory to elucidate the signaling mechanisms involved with α -tocopherol. Once the inflammation is controlled, the injured periodontal tissue will heal.

One of the key cells involved in periodontal wound healing is the gingival fibroblast (51–53). Fibroblasts have a proliferative phenotype and a high capacity to synthesize and deposit extracellular matrix components necessary for adequate wound healing (51–53).

In vitro, wound-healing models are often used to evaluate the effect of various agents on targeted cells (54). These models consist of scratches made on cell monolayers to create a cell-free area, allowing for an investigation of how cells migrate and cover this area. The scratch cell monolayer assay was used in this study to demonstrate the capability of α -tocopherol to promote cell migration and consequently, wound healing. α -tocopherol-treated cells occupied a significantly larger portion of the wound area, beginning at 12 h up to 48 h, with or without LPS. Results indicate that α -tocopherol may promote periodontal healing at an early stage by stimulating both gingival fibroblast growth and migration, with a noticeably greater effect when α -tocopherol is combined with LPS. This increase may be a way to overcome the negative impact of *P. gingivalis* LPS, which not only promotes inflammation but also the onset of periodontal disease. Laheij *et al.* (55) recently demonstrated that live *P. gingivalis* or its crude culture supernatant inhibited epithelial cell migration. The difference in our study laid in the use of *P. gingivalis* LPS alone, as this bacterium produces different virulence factors, which can be secreted when in contact with cells. Additional studies using live *P. gingivalis* will thus be performed in the future to shed light on the effect of *P. gingivalis* or its virulence factor combination on gingival wound healing. Our findings are in agreement with previously reported studies demonstrating enhanced gingival wound healing following vitamin E use *in vitro* (56) and vitamin E supplementation *in vivo* (57).

Conclusion

This study demonstrated that α -tocopherol downregulated the inflammatory

response of gingival fibroblasts by decreasing IL-1 β and IL-6 secretion following stimulation by LPS. Interestingly, α -tocopherol was able to promote cell innate immunity defense by increasing the secretion of HBD-1 and -2. We also demonstrated that α -tocopherol accelerated the *in vitro* wound healing of gingival fibroblasts, even in the presence of LPS. Overall data may suggest a beneficial role of α -tocopherol in preventing/curing periodontal disease.

Acknowledgements

This study was supported by funding from the Fonds Émile Beaulieu, Laval University Foundation, to MR. Further support was provided to SA and MR by the NSTIP Strategic Technologies Program (number 12-MED 2443-02) in the Kingdom of Saudi Arabia. We are also grateful to Mabrouka Salem for her technical assistance.

References

- Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N *et al.* The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J* 2013;**7**:1016–1025.
- Baek KJ, Ji S, Kim YC, Choi Y. Association of the invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. *Virulence* 2015;**6**:274–281.
- Pradeep AR, Singh SP, Martande SS, Naik SB, Kalra N, Priyanka N. Clinical and microbiological effects of levofloxacin in the treatment of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-associated periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. *J Int Acad Periodontol* 2014;**16**:67–77.
- Ardila CM, Ollarte-Sossa M, Guzmán IC. Association between immunoglobulin G1 against *Tannerella forsythia* and reduction in the loss of attachment tissue. *J Periodontol Implant Sci* 2014;**44**:274–279.
- Ardila CM, Ollarte-Sossa M, Ariza-Garcés AA. Association between the presence of *Treponema denticola* and reduced levels of antiatherogenic high density lipoprotein in periodontitis. *Quintessence Int* 2015;**46**:207–215.
- Zenobia C, Hajishengallis G. *Porphyromonas gingivalis* virulence factors involved in subversion of leukocytes and microbial dysbiosis. *Virulence* 2015;**6**:236–243.
- Konermann A, Stabenow D, Knolle PA, Held SA, Deschner J, Jäger A. Regulatory role of periodontal ligament fibroblasts for innate immune cell function and differentiation. *Innate Immun* 2012;**18**:745–752.
- Scheres N, Laine ML, de Vries TJ, Everts V, van Winkelhoff AJ. Gingival and periodontal ligament fibroblasts differ in their inflammatory response to viable *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol Res* 2010;**45**:262–270.
- Rouabhia M, Semlali A, Audoy J, Chmielewski W. Antagonistic effect of *Candida albicans* and IFN γ on E-cadherin expression and production by human primary gingival epithelial cells. *Cell Immunol* 2012;**280**:61–67.
- Yang Z, Li Y, Ma X, Shen L, Zhao Z, Jin F. Role of the epithelial cell rests of Malassez in periodontal homeostasis and regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* 2015.
- Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. *J Oral Microbiol* 2013;**5**:19804–19813.
- Fu E, Tsai MC, Chin YT *et al.* The effects of diallyl sulfide upon *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide stimulated proinflammatory cytokine expressions and nuclear factor-kappa B activation in human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res* 2015;**50**:380–388.
- Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2004;**72**:4689–4698.
- Shaddox LM, Gonçalves PF, Vovk A *et al.* LPS-induced inflammatory response after therapy of aggressive periodontitis. *J Dent Res* 2013;**92**:702–708.
- González-Navajas JM, Corr MP, Raz E. The immediate protective response to microbial challenge. *Eur J Immunol* 2014;**44**:2536–2549.
- Wara-aswapati N, Chayasadam A, Surarit R *et al.* Induction of toll-like receptor expression by *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol* 2013;**84**:1010–1018.
- Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. *Porphyromonas gingivalis*-epithelial cell interactions in periodontitis. *J Dent Res* 2006;**85**:392–403.
- Kato H, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. *Porphyromonas gingivalis* LPS inhibits osteoblastic differentiation and promotes pro-inflammatory cytokine production in human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol* 2014;**59**:167–175.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2014;**64**:57–80.
- Sgolastra F, Gatto R, Petrucci A, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as adjunctive therapy to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontol* 2012;**83**:1257–1269.
- Soares GM, Mendes JA, Silva MP *et al.* Metronidazole alone or with amoxicillin as adjuncts to non-surgical treatment of chronic periodontitis: a secondary analysis of microbiological results from a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014;**41**:366–376.
- Puertollano MA, Puertollano E, de Cienfuegos GÁ, de Pablo MA. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr Top Med Chem* 2011;**11**:1752–1766.
- Leal ML, de Camargo EV, Ross DH, Molento MB, Lopes ST, da Rocha JB. Effect of selenium and vitamin E on oxidative stress in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Res Commun* 2010;**34**:549–555.
- Eggermont E. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *Eur J Pediatr* 2006;**165**:429–434.
- Smith A, Madden KB, Yeung KJ *et al.* Deficiencies in selenium and/or vitamin E lower the resistance of mice to *Heligmosomoides polygyrus* infections. *J Nutr* 2005;**135**:830–836.
- Campoccia D, Visai L, Renò F *et al.* Bacterial adhesion to poly-(D,L)lactic acid blended with vitamin E: toward gentle anti-infective biomaterials. *J Biomed Mater Res A* 2015;**103**:1447–1458.
- Darveau RP, Hancock RE. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. *J Bacteriol* 1983;**155**:831–838.
- Triantafyllou M, Triantafyllou K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* 2002;**23**:301–304.
- Laflamme C, Rouabhia M. Effect of BMP-2 and BMP-7 homodimers and a mixture of BMP-2/BMP-7 homodimers on osteoblast adhesion and growth following culture on a collagen scaffold. *Biomed Mater* 2008;**3**:015008.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248–254.
- Semlali A, Chakir J, Rouabhia M. Effects of whole cigarette smoke on human gingival fibroblast adhesion, growth, and migration. *J Toxicol Environ Health A* 2011;**74**:848–862.
- Kuzuya M, Naito M, Funaki C *et al.* Antioxidants stimulate endothelial cell

- proliferation in culture. *Artery* 1991;**18**:115–124.
33. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem* 1991;**266**:6188–6194.
 34. Ozer NK, Palozza P, Boscoboinik D, Azzi A. d- α -Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1993;**322**:307–310.
 35. Yamaji Y, Kubota T, Sasaguri K *et al*. Inflammatory cytokine gene expression in human periodontal ligament fibroblasts stimulated with bacterial lipopolysaccharides. *Infect Immun* 1995;**63**:3576–3581.
 36. Hattar K, Savai R, Subtil FS *et al*. Endotoxin induces proliferation of NSCLC in vitro and in vivo: role of COX-2 and EGFR activation. *Cancer Immunol Immunother* 2013;**62**:309–320.
 37. Tang J, Jiang Y, Tang Y *et al*. Effects of propofol on damage of rat intestinal epithelial cells induced by heat stress and lipopolysaccharides. *Braz J Med Biol Res* 2013;**46**:507–512.
 38. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF *et al*. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2014;**12**:612–623.
 39. Andrukhov O, Ertlschweiger S, Moritz A, Bantleon HP, Rausch-Fan X. Different effects of *P. gingivalis* LPS and *E. coli* LPS on the expression of interleukin-6 in human gingival fibroblasts. *Acta Odontol Scand* 2014;**72**:337–345.
 40. Herath TD, Wang Y, Seneviratne CJ *et al*. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide lipid A heterogeneity differentially modulates the expression of IL-6 and IL-8 in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol* 2011;**38**:694–701.
 41. Bamias G, Corridoni D, Pizarro TT, Cominelli F. New insights into the dichotomous role of innate cytokines in gut homeostasis and inflammation. *Cytokine* 2012;**59**:451–459.
 42. Reis C, DA Costa AV, Guimarães JT *et al*. Clinical improvement following therapy for periodontitis: association with a decrease in IL-1 and IL-6. *Exp Ther Med* 2014;**8**:323–327.
 43. Suntres ZE, Shek PN. Treatment of LPS-induced tissue injury: role of liposomal antioxidants. *Shock* 1996;**6**:S57–S64.
 44. Qureshi AA, Reis JC, Papisian CJ, Morrison DC, Qureshi N. Tocotrienols inhibit lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokines in macrophages of female mice. *Lipids Health Dis* 2010;**9**:143.
 45. Shibata H, Katsuki H, Okawara M, Kume T, Akaike A. c-Jun N-terminal kinase inhibition and α -tocopherol protect midbrain dopaminergic neurons from interferon- γ /lipopolysaccharide-induced injury without affecting nitric oxide production. *J Neurosci Res* 2006;**83**:102–109.
 46. Godbout JP, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. alpha-Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *J Neuroimmunol* 2004;**149**:101–109.
 47. Berg BM, Godbout JP, Chen J, Kelley KW, Johnson RW. alpha-Tocopherol and selenium facilitate recovery from lipopolysaccharide-induced sickness in aged mice. *J Nutr* 2005;**135**:1157–1163.
 48. Stempel N, Strehmel J, Overhage J. Potential application of antimicrobial peptides in the treatment of bacterial biofilm infections. *Curr Pharm Des* 2014;**21**:67–84.
 49. Gorr SU, Abdolhosseini M. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2011;**38**:126–141.
 50. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol* 2005;**7**:119–133.
 51. Cáceres M, Oyarzun A, Smith PC. Defective wound-healing in aging gingival tissue. *J Dent Res* 2014;**93**:691–697.
 52. Bahri R, Saidane-Mosbahi D, Rouabhia M. *Candida famata* modulates toll-like receptor, β -defensin, and proinflammatory cytokine expression by normal human epithelial cells. *J Cell Physiol* 2010;**222**:209–218.
 53. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care* 2013;**22**:407–408, 410–412.
 54. Semlali A, Chakir J, Goulet JP, Chmielewski W, Rouabhia M. Whole cigarette smoke promotes human gingival epithelial cell apoptosis and inhibits cell repair processes. *J Periodontol Res* 2011;**46**:533–541.
 55. Laheij AM, de Soet JJ, Veerman EC, Bolscher JG, van Loveren C. The influence of oral bacteria on epithelial cell migration *in vitro*. *Mediators Inflamm* 2013;**2013**:154532.
 56. Nizam N, Discioglu F, Saygun I *et al*. The effect of α -Tocopherol and selenium on human gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontol* 2014;**85**:636–644.
 57. Kim JE, Shklar G. The effect of vitamin E on the healing of gingival wounds in rats. *J Periodontol* 1983;**54**:305–308.